

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-507351

(P2020-507351A)

(43) 公表日 令和2年3月12日(2020.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/81 (2006.01)	C 1 2 N 15/81 Z	4 B 0 6 4
C 1 2 P 17/06 (2006.01)	C 1 2 P 17/06 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 P 17/16 (2006.01)	C 1 2 P 17/16	4 C 0 3 7
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 6 2
C 1 2 N 15/52 (2006.01)	C 1 2 N 15/52 Z	4 C 0 7 1
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 169 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-565595 (P2019-565595)
 (86) (22) 出願日 平成30年2月19日 (2018. 2. 19)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年10月16日 (2019. 10. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2018/050189
 (87) 国際公開番号 WO2018/148848
 (87) 国際公開日 平成30年8月23日 (2018. 8. 23)
 (31) 優先権主張番号 62/460, 526
 (32) 優先日 平成29年2月17日 (2017. 2. 17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 519298754
 ヒヤシンス・バイオリジカルズ・インコーポレイテッド
 カナダ・ケベック・H2 X・1 Y 4・モン
 トリオール・アヴニュ・デュ・プレジダン
 -ケネディ・1 4 1・ローカル・エスピー
 -5 2 3 0
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母における植物性カンナビノイド及び植物性カンナビノイドアナログの生成のための方法及び細胞株

(57) 【要約】

酵母において植物性カンナビノイド及び植物性カンナビノイドアナログを生成するための方法及び細胞株。この方法は、ポリケチドシンターゼCDS及び細胞質性プレニルトランスフェラーゼCDSで形質転換された酵母細胞を適用し、細胞株はこの細胞を含む。ポリケチドシンターゼ酵素は、オリベトール又はメチル-オリベトールの合成を触媒し、アサのオリベトール酸シンターゼ又はキイロタマホコリカビのポリケチドシンターゼ(「DiPKS」)を含んでもよい。酵母細胞は、DiPKSの活性を増加させるためのホスホパンテチエニルトランスフェラーゼを含むように改変することができる。酵母細胞は、オリベトール又はメチル-オリベトールを合成するのに適用可能なマロニル-CoAを増加させるために、ミトコンドリアのアセトアルデヒド異化を軽減するように改変することができる。プレニルトランスフェラーゼ酵素は、カンナビゲロール又はカンナビゲロールアナログの合成を触媒し、ストレプトマイセス種CL190由来の細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素を含んでもよい。酵母細胞は、プレニル化に利用可能なゲラニルピロリン酸を

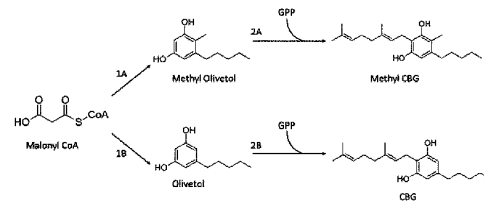


Fig. 10

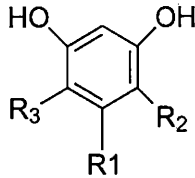
【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを生成する方法であって、ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチド及び細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチドを含む酵母細胞を提供する工程であって、

ポリケチドシンターゼ酵素が、マロニル-CoAから少なくとも1つの前駆化学物質を生成するためのものであり、前駆化学物質が、構造I:

【化1】



を有し、構造Iにおいて、R1が、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、H、カルボキシル、又はメチルであり、R3が、H、カルボキシル、又はメチルであり、

細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素が、少なくとも1つの前駆化学物質をプレニル化するためのものであり、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種を提供する、工程と、

酵母細胞培養物をもたらすために前記酵母細胞を増殖させる工程とを含む、方法。

【請求項2】

酵母細胞が、ヘキサノイルシンターゼ酵素をコードする第3のポリヌクレオチドを含み、

ポリケチドシンターゼ酵素が、アサ由来のOAS酵素を含み、

酵母細胞を増殖させる工程が、ヘキサン酸を含む栄養調製物中で酵母細胞を増殖させる工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

酵母細胞が、アサのポリケチドシクラーゼ酵素を含まず、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種が、脱炭酸植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号45の塩基3841から4995によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するアサ由来のOAS酵素のコード配列を含む、請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号45の塩基3841から4995と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

R1が、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、Hであり、R3が、Hである、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

R1が、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、カルボキシルであり、R3が、Hである、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

R1が、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、メチルであり、R3が、Hである、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

R1が、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、カルボキシルであり、R3が、メチルである、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ポリケチドシンターゼ酵素が、キイロタマホコリカビ由来のDiPKSポリケチドシンターゼ酵素を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号46の塩基535から9978によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKSポリケチドシンターゼ酵素のコード配列を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号46の塩基535から9978と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R2においてメチル基を含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種が、メチル化植物性カンナビノイドアナログを含む、請求項10から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

DiPKSポリケチドシンターゼ酵素が、少なくとも1つの前駆化学物質のメチル化を軽減するためにC-Metドメインの活性部位に影響を及ぼす変異を含み、その結果、R2がメチルであり、R3がHである第1の前駆化学物質、及びR2がHであり、R3がHである第2の前駆化学物質を含む少なくとも1つの前駆化学物質を生じ、

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種が、メチル化植物性カンナビノイドアナログ及び非メチル化植物性カンナビノイドを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 15】

DiPKSポリケチドシンターゼが、DiPKS^{G1516D; G1518A}ポリケチドシンターゼ酵素を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号37の塩基523から9966によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKS^{G1516D; G1518A}ポリケチドシンターゼ酵素のコード配列を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号37の塩基523から9966と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

DiPKSポリケチドシンターゼが、DiPKS^{G1516R}ポリケチドシンターゼ酵素を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 19】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号38の塩基523から9966によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKS^{G1516R}ポリケチドシンターゼ酵素のコード配列を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号38の塩基523から9966と80%から100%の間の塩基配

10

20

30

40

50

列相同性を有する、請求項19に記載の方法。

【請求項 2 1】

DiPKSポリケチドシンターゼ酵素が、少なくとも1つの前駆化学物質のメチル化を防止するために、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素のC-Metドメインの活性部位における活性を低減する変異を含み、その結果、水素R2基及び水素R3基を有する少なくとも1つの前駆化学物質を生じ、

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種が、脱炭酸植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 2 2】

酵母細胞が、DiPKSの活性を増加させるために、ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第3のポリヌクレオチドを含む、請求項10から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

ホスホパンテティニルトランスフェラーゼが、A.ニデュランス由来のNpgAホスホパンテティニルトランスフェラーゼ酵素を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 2 4】

第3のポリヌクレオチドが、配列番号10の塩基1170から2201によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するA.ニデュランス由来のNpgAホスホパンテティニルトランスフェラーゼ酵素のコード配列を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 5】

第3のポリヌクレオチドが、配列番号10の塩基1170から2201と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項 2 6】

ポリケチドシンターゼ酵素が、より長鎖のケチル-CoAを用いずにマロニル-CoAから少なくとも1つの前駆化学物質を合成するための活性部位を含む、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1においてペンチル基を含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種が、ペンチル-植物性カンナビノイド又はメチル化ペンチル-植物性カンナビノイドアナログを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 2 8】

少なくとも1つの前駆化学物質が、オリベトール、オリベトール酸、メチル-オリベトール、又はメチル-オリベトール酸のうちの少なくとも1つを含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種が、CBG、CBGa、meCBG、又はmeCBGaのうちの少なくとも1つを含む、請求項27に記載の方法。

【請求項 2 9】

細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素が、ストレプトマイセス種CL190由来のNphBプレニルトランスフェラーゼ酵素を含む、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

第2のポリヌクレオチドが、配列番号44の塩基987から1913によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するストレプトマイセス種CL190由来のNphBプレニルトランスフェラーゼ酵素のコード配列を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 3 1】

第2のポリヌクレオチドが、配列番号44の塩基987から1913と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 2】

10

20

30

40

50

R1が、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、Hであり、R3が、Hである、請求項1から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

R1が、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、カルボキシルであり、R3が、Hである、請求項1から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

R1が、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、メチルであり、R3が、Hである、請求項1から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

R1が、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、カルボキシルであり、R3が、メチルである、請求項1から31のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項36】

酵母細胞が、利用可能なゲラニルピロリン酸を増加させる遺伝子改変を含む、請求項1から35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

遺伝子改変が、Erg20酵素の不活性化を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

酵母細胞が、配列番号3によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するErg20^{K197E}のコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む、請求項37に記載の方法。

20

【請求項39】

第3のポリヌクレオチドが、配列番号3と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

酵母細胞が、利用可能なマロニル-CoAを増加させる遺伝子改変を含む、請求項1から39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

遺伝子改変が、Maf1の発現の増加を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

酵母細胞が、配列番号8の塩基936から2123によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するMaf1のコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む、請求項41に記載の方法。

30

【請求項43】

第3のポリヌクレオチドが、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号8と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

遺伝子改変が、アルデヒドデヒドロゲナーゼ及びアセチル-CoAシンターゼの細胞質発現を増加させるための改変を含む、請求項40に記載の方法。

40

【請求項45】

酵母細胞が、配列番号4の塩基3938から5893によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS.エンテリカ由来のAcs^{L641P}のコード配列、及び配列番号4の塩基1494から2999によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS.セレピシエ由来のAld6のコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

第3のポリヌクレオチドが、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号4の塩基51から7114と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、

50

請求項45に記載の方法。

【請求項 47】

遺伝子改変が、マロニル-CoAシンターゼの活性を増加させるための改変を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項 48】

酵母細胞が、S.セレビスエ由来のAcc1^{S659A; S1167A}のコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項 49】

第3のポリヌクレオチドが、Acc1^{S659A; S1167A}酵素のコード配列を含み、該酵素の一部が、配列番号7の塩基9から1716によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質部分Acc1^{S659A; S1167A}と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する、請求項48に記載の方法。

10

【請求項 50】

第3のポリヌクレオチドが、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号7と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項49に記載の方法。

【請求項 51】

酵母細胞が、構成的プロモーターの調節下にあるS.セレビスエ由来のAcc1のコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項 52】

構成的プロモーターが、S.セレビスエ由来のPGK1プロモーターを含む、請求項51に記載の方法。

20

【請求項 53】

PGK1プロモーターが、配列番号6の塩基7から750と80%から100%の間のヌクレオチド相同性を有する、請求項52に記載の方法。

【請求項 54】

遺伝子改変が、ステロール生合成の活性化因子の発現の増加を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項 55】

酵母細胞が、配列番号9の塩基975から3701によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS.セレビスエ由来のUpc2^{E888D}のコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む、請求項54に記載の方法。

30

【請求項 56】

第3のポリヌクレオチドが、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号9と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項55に記載の方法。

【請求項 57】

第2のポリヌクレオチドが、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35又は配列番号36のいずれか1つと80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素のコード配列を含む、請求項1から28又は請求項31から56のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 58】

酵母細胞培養物から植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうち少なくとも1つの種を抽出する工程を更に含む、請求項1から57のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

50

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを生成するための酵母細胞であって、

ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチド、及び細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチドを含む、酵母細胞。

【請求項60】

方法の請求項1から57のいずれか一項において提供される酵母細胞に関連して規定される酵母細胞、第1のポリヌクレオチド、又は第2のポリヌクレオチドのうちの1つ以上についての特徴を更に含む、請求項59に記載の酵母細胞。

【請求項61】

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログの生成のために酵母細胞を形質転換する方法であって、

ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチドを酵母細胞株へと導入する工程、及び

細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチドを前記酵母へと導入する工程

を含む、方法。

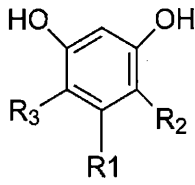
【請求項62】

方法の請求項1から57のいずれか一項において提供される酵母細胞に関連して規定される、酵母細胞、第1のポリヌクレオチド、又は第2のポリヌクレオチドのうちの1つ以上についての特徴を更に含む、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

以下の構造II:

【化2】



を有する植物性カンナビノイドアナログであって、

構造IIにおいて、R1が、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基であり、

R2が、メチル基であり、

R3が、H、カルボキシル基、又はメチル基である、植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項64】

R1が、炭素数5の鎖長を有し、R3が、Hである、請求項63に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項65】

酵母における生合成によって生成される、請求項63に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項66】

以下の構造III:

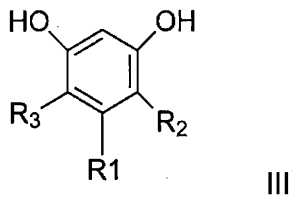
10

20

30

40

【化3】



10

を有する植物性カンナビノイドアナログであって、
 構造IIIにおいて、R1が、ペンチル基であり、
 R2が、メチル基であり、
 R3が、Hである、植物性カンナビノイドアナログ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、参照によりその全体が本出願に組み込まれる、2017年2月17日に出願された、酵母における植物性カンナビノイドの生成のための方法及び細胞株と題される、米国仮特許出願第62/460,526号の優先権の利益を主張する。

20

【0002】

本開示は、一般的に、酵母における植物性カンナビノイド及び植物性カンナビノイドのアナログの生成に関する。

【背景技術】

【0003】

植物性カンナビノイドは、アサ(*Cannabis sativa*)、他の植物、及び一部の真菌において天然に生成される。105種を超える植物性カンナビノイドが、アサにおいて生合成されるか、又はアサにおいて生合成された植物性カンナビノイドからの熱分解若しくは他の分解により生じることが知られている。アサ植物は、穀物、繊維、及び他の材料の貴重な供給源でもあるが、一方、特に、室内で、植物性カンナビノイドを生成するためにアサを生育させることは、エネルギー及び労力の点で高価である。次に、アサ植物から植物性カンナビノイドを抽出、精製、及び分画化することは、労力及びエネルギー集約的でもある。

30

【0004】

植物性カンナビノイドは、アサの医学的作用及び向精神性作用に寄与する薬理的に活性な分子である。アサにおける植物性カンナビノイドの生合成の規模は、他の農業プロジェクトと同様である。他の農業プロジェクトと同様に、アサを生育させることによる植物性カンナビノイドの大規模生成には、様々な投入(例えば、栄養、光、有害生物防除、CO₂等)が必要とされる。アサを栽培するために必要とされる投入は、提供されなければならない。更に、許可される場合、アサの栽培は、現在、植物から調製される生成物が商業的使用を目的とする場合、重い規制、税、及び厳しい品質管理の対象であり、費用はますます増加している。植物性カンナビノイドアナログは、構造上、植物性カンナビノイドに類似する薬理的に活性な分子である。植物性カンナビノイドアナログは、化学的に合成されることが多く、労力集約的であり高価である可能性がある。結果として、ロバスト且つスケラブルな発酵性生物において植物性カンナビノイド及び植物性カンナビノイドアナログを生成することが経済的となり得る。サッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)は、工業的規模の同様の分子を生成するために使用される発酵性生物の一例である。

40

【0005】

天然に存在する植物性カンナビノイドの生成のためにアサを生育させるのに関わる時間

50

、エネルギー、及び労力によって、酵母において植物性カンナビノイドを生成するためにトランスジェニック細胞株を生成する動機付けが与えられる。このような試みの一例が、Poulos及びFarniaの米国特許出願公開第2016/0010126号に提供される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第2016/0010126号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Gietz、R. D.及びSchiestl、R. H.、「High-efficiency yeast transformation using LiAc/SS carrier DNA/PEG method.」Nat. Protoc. 2、31~34(2007) 10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

酵母において植物性カンナビノイドを生成するための以前の手法、及び植物性カンナビノイドアナログを生成するための以前の手法のうち少なくとも1つの不利益を取り除くか又は軽減することが、本開示の目的である。アサにおいて発見された105種の植物性カンナビノイドの多くは、酵母で合成することができ、酵母に基づく生成を改良することが望ましい場合がある。同様に、労力集約的合成の必要のない植物性カンナビノイドアナログの生成を可能にする手法が望ましい場合がある。 20

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明において提供される方法及び細胞株は、ストレプトマイセス・セリカラー(*Streptomyces coelicolor*) (「CL190」)由来のNphBプレニルトランスフェラーゼ酵素(「AltPT」)をコードする遺伝子で形質転換されたトランスジェニックサッカロマイセス・セレピシエを適用してもよく、含んでもよい。AltPTは、(「ABBA」)タイプのプレニルトランスフェラーゼ酵素である。AltPTは、オリベトール酸及びゲラニルピロリン酸(「GPP」)からのカンナビゲロール酸(「CBGa」)の合成を触媒する。AltPTはまた、オリベトール及びGPPからのカンナビゲロール(「CBG」)の合成を触媒する。アサでは、プレニルトランスフェラーゼ酵素は、オリベトール酸及びGPPからのCBGaの合成を触媒する。アサのプレニルトランスフェラーゼは、膜結合性であり、*S. セレピシエ*における発現を複雑化する。対照的に、AltPTは、細胞質性であり、アサのプレニルトランスフェラーゼよりも高いレベルで、*S. セレピシエ*において発現する。AltPTは、*S. セレピシエ*において発現される場合、膜結合性のアサのプレニルトランスフェラーゼに対して有利性をもたらし、オリベトール酸及びGPPからのCBGa、又はオリベトール及びGPPからのCBGの合成を触媒することができる。*S. セレピシエ*は、Erg20、Maf1若しくはUPC2、又はGPPを消費する代謝経路をサポートする酵素又は他のタンパク質に対する他の遺伝子において1つ又は複数の変異を有する場合があります。1つ又は複数の変異は、利用可能なGPPを増加させるためのものである。或いは、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)、クルイウェロマイセス・マルキシアヌス(*Kluyveromyces marxianus*)、クルイウェロマイセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)、ロドスポリジウム・トルロイデス(*Rhodospiridium toruloides*)、クリプトコッカス・カルパタス(*Cryptococcus curvatus*)、トリコスポロン・プルランス(*Trichosporon pullulan*)及びリポマイセス・リポフェラス(*Lipomyces lipoferetc*)を含む他の種の酵母を適用してもよい。 30 40

【0010】

本発明において提供される一部の方法及び細胞株では、トランスジェニック*S. セレピシエ*は、アサのポリケチドシンターゼ(オリベトール酸シンターゼ又は「OAS」とも称される)の遺伝子を含む。OASは、マロニル-CoA及びヘキサノイル-CoAからのオリベトールの合成を触媒する。この反応は、マロニル-CoA対ヘキサノイル-CoA対オリベトール酸の2:1:1の化学量論比を有する。アサでは、オリベトールは、オリベトール酸シクラーゼ(「OAC」) 50

又は別のポリケチドシクラーゼの存在下でカルボキシル化されてオリベトール酸となり、AltPT及び膜結合性プレニルトランスフェラーゼによってアサにおいて触媒される他の細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素に関連して上述したCBGa合成代謝経路へと送り込まれる。アサ由来のOAC酵素は、トランスジェニックS.セレピシエから除外され、AltPTによってCBGaよりもむしろCBGの合成を駆動してもよい。

【0011】

本発明において提供される一部の方法及び細胞株では、トランスジェニックS.セレピシエは、キイロタマホコリカビ(Dictyostelium discoideum)のポリケチドシンターゼ(「DiPKS」)の遺伝子を含む。DiPKSは、I型脂肪酸シンターゼ(「FAS」)とポリケチドシンターゼの両方からなる融合タンパク質であり、ハイブリッド「FAS-PKS」タンパク質と称される。DiPKSは、マロニル-CoAからのメチル-オリベトールの合成を触媒する。この反応は、マロニル-CoA対メチル-オリベトールの6:1の化学量論比を有する。AltPTは、上述のオリベトールからのCBGの合成と同様に、メチル-オリベトールからのメチルカンナビゲロール(「meCBG」)の合成を触媒する。ヘキサノール酸は、S.セレピシエに対して毒性である。OASを適用する場合、ヘキサノール-CoAは、オリベトールの合成に必要な前駆体である。オリベトール又はオリベトール酸を生成するためのOASよりもむしろメチル-オリベトールを生成するためのDiPKSを使用する場合、ヘキサノール酸を増殖培地に添加する必要はない。増殖培地におけるヘキサノール酸の非存在により、S.セレピシエ培養物の増殖の増加及びOASを使用する場合のCBGの収率と比較したmeCBGの収率の増大が、もたらされ得る。

【0012】

一部の適用では、meCBG及びmeCBGから合成され得るメチル化された下流の植物性カンナビノイドアナログ(アサにおいてCBGaから合成される下流の植物性カンナビノイドと同様に)は、貴重であり得る。他の場合では、天然に存在する植物性カンナビノイドの脱炭酸形態と構造上同一である植物性カンナビノイドがより望ましい場合がある。天然に存在する植物性カンナビノイドの脱炭酸形態と構造上同一である植物性カンナビノイドの生成のために、DiPKSが、野生型DiPKSに対して改変され、オリベトールのメチル化を低減し、その結果、meCBGよりもむしろCBGの合成がもたらされる。S.セレピシエは、DiPKSの活性を増加させるために補因子担持酵素を含んでもよい。

【0013】

オリベトール及びメチルオリベトールの合成は、細胞質におけるマロニル-CoAのレベルを増加させることによって促進されてもよい。S.セレピシエは、ネイティブアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼの過剰発現及び変異体アセチル-CoAシンターゼ又はその変異がミトコンドリアのアセトアルデヒド異化を低下させる他の遺伝子の発現を有してもよい。アセトアルデヒドをアセチル-CoA生成へと転換することによってミトコンドリアのアセトアルデヒド異化を低下させることにより、オリベトールを合成するのに利用可能なマロニル-CoAが増加する。Acc1は、ネイティブ酵母マロニルCoAシンターゼである。S.セレピシエは、Acc1の過剰発現又は活性が増加し且つ利用可能なマロニル-CoAが増加したAcc1の改変を有してもよい。S.セレピシエは、Maf1又はtRNA生合成の他の調節因子の改変された発現を含んでもよい。ネイティブMaf1を過剰発現することにより、tRNA生合成に対するイソペンチルピロリン酸(「IPP」)の損失が低減し、それによって、酵母におけるモノテルペン収率が改善されることが示された。IPPは、メバロン酸経路における中間体である。Upc2は、S.セレピシエにおけるステロール生合成の活性化因子であり、Upc2のGlu888Asp変異は、酵母におけるモノテルペン生成を増加させる場合がある。

【0014】

第1の態様では、本明細書において、酵母において植物性カンナビノイド及び植物性カンナビノイドアナログを生成するための方法及び細胞株が提供される。方法は、ポリケチドシンターゼCDS及び細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素CDSを形質転換した酵母細胞を適用し、細胞株は、これらを含む。ポリケチドシンターゼ酵素は、オリベトール又はメチル-オリベトールの合成を触媒し、アサのオリベトール酸シンターゼ又はキイロタマホコリカビのポリケチドシンターゼ(「DiPKS」)を含んでもよい。酵母細胞は、DiPKSの活

10

20

30

40

50

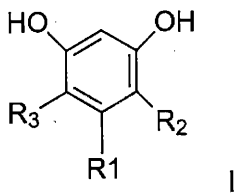
性を増加させるために、ホスホパンテチエニルトランスフェラーゼを含むように改変することができる。酵母細胞は、オリベトール又はメチル-オリベトールを合成するために利用可能なマロニル-CoAを増加させるために、ミトコンドリアのアセトアルデヒド異化を軽減するように改変することができる。プレニルトランスフェラーゼ酵素は、カンナビゲロール又はカンナビゲロールアナログの合成を触媒し、ストレプトマイセス種CL190由来の細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素を含んでもよい。酵母細胞は、プレニル化に利用可能なゲラニルピロリン酸を増加させるために、ゲラニルピロリン酸の消費を軽減するように改変することができる。

【0015】

さらなる態様では、本明細書において、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを生成する方法であって、ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチド及び細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチドを含む酵母細胞を提供する工程と、酵母細胞培養物をもたらすために酵母細胞を増殖させる工程とを含む、方法が提供される。ポリケチドシンターゼ酵素は、マロニル-CoAから少なくとも1つの前駆化学物質を生成するためのものであり、前駆化学物質は、構造I:

【0016】

【化1】



【0017】

を有する。構造Iにおいて、R1は、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、H、カルボキシル、又はメチルであり、R3は、H、カルボキシル、又はメチルである。細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素は、少なくとも1つの前駆化学物質をプレニル化するためのものであり、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種を提供する。

【0018】

一部の実施形態では、酵母細胞は、ヘキサノイルシンターゼ酵素をコードする第3のヌクレオチドを含み;ポリケチドシンターゼ酵素は、アサ由来のOAS酵素を含み;酵母細胞を増殖させる工程は、ヘキサン酸を含む栄養調製物中で酵母細胞を増殖させる工程を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、アサのポリケチドシクラーゼ酵素を含まず、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、脱炭酸植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号45の塩基3841から4995によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するアサ由来のOAS酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号45の塩基3841から4995と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号45の塩基3841から4995と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。

【0019】

一部の実施形態では、R1は、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、Hであり、R3は、Hである。

【0020】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、R1は、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、カルボキシルであり、R3は、Hである。

【0021】

一部の実施形態では、R1は、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、メチルであり、R3は、Hである。

【0022】

一部の実施形態では、R1は、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、カルボキシルであり、R3は、メチルである。

【0023】

一部の実施形態では、ポリケチドシンターゼ酵素は、キイロタマホコリカビ由来のDiPKSポリケチドシンターゼ酵素を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号46の塩基535から9978によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKSポリケチドシンターゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号46の塩基535から9978と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、少なくとも1つの前駆化学物質は、R2においてメチル基を含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、メチル化植物性カンナビノイドアナログを含む。一部の実施形態では、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素は、少なくとも1つの前駆化学物質のメチル化を軽減するためにC-Metドメインの活性部位に影響を及ぼす変異を含み、その結果、R2がメチルであり、R3がHである第1の前駆化学物質、及びR2がHであり、R3がHである第2の前駆化学物質を含む少なくとも1つの前駆化学物質を生じ;植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、メチル化植物性カンナビノイドアナログ及び非メチル化植物性カンナビノイドを含む。一部の実施形態では、DiPKSポリケチドシンターゼは、DiPKSG1516D; G1518Aポリケチドシンターゼ酵素を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号37の塩基523から9966によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するG1518Aポリケチドシンターゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号37の塩基523から9966と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、DiPKSポリケチドシンターゼは、DiPKSG1516Rポリケチドシンターゼ酵素を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号38の塩基523から9966によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKSG1516Rポリケチドシンターゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号38の塩基523から9966と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素は、少なくとも1つの前駆化学物質のメチル化を防止するために、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素のC-Metドメインの活性部位における活性を低減する変異を含み、その結果、水素R2基及び水素R3基を有する少なくとも1つの前駆化学物質を生じ;植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、脱炭酸植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、DiPKSの活性を増加させるために、ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第3のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ホスホパンテティニルトランスフェラーゼは、A. ニデュランス(A. nidulans)由来のNpgAホスホパンテティニルトランスフェラーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、配列番号10の塩基1170から2201によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するA. ニデュランス由来のNpgAホスホパンテティニルトランスフェラーゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、配列番号10の塩基1170から2201と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。

10

20

30

40

50

【0024】

一部の実施形態では、ポリケチドシンターゼ酵素は、より長鎖のケチル-CoAを用いずにマロニル-CoAから少なくとも1つの前駆化学物質を合成するための活性部位を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの前駆化学物質は、R1においてペンチル基を含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、ペンチル-植物性カンナビノイド又はメチル化ペンチル-植物性カンナビノイドアナログを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの前駆化学物質は、オリベトール、オリベトール酸、メチル-オリベトール、又はメチル-オリベトール酸のうちの少なくとも1つを含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、CBG、CBGa、meCBG、又はmeCBGaのうちの少なくとも1つを含む。

10

【0025】

一部の実施形態では、細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素は、ストレプトマイセス種CL190由来のNphBプレニルトランスフェラーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、配列番号44の塩基987から1913によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するストレプトマイセス種CL190由来のNphBプレニルトランスフェラーゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、配列番号44の塩基987から1913と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。

【0026】

一部の実施形態では、R1は、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、Hであり、R3は、Hである。

20

【0027】

一部の実施形態では、R1は、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、カルボキシルであり、R3は、Hである。

【0028】

一部の実施形態では、R1は、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、メチルであり、R3は、Hである。

【0029】

一部の実施形態では、R1は、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2は、カルボキシルであり、R3は、メチルである。

30

【0030】

一部の実施形態では、酵母細胞は、利用可能なゲラニルピロリン酸を増加させる遺伝子改変を含む。一部の実施形態では、遺伝子改変は、Erg20酵素の不活性化を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、配列番号3によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するErg20K197Eに関するコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、配列番号3と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。

【0031】

一部の実施形態では、酵母細胞は、利用可能なマロニル-CoAを増加させる遺伝子改変を含む。一部の実施形態では、遺伝子改変は、Maf1の発現の増加を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、配列番号8の塩基936から2123によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するMaf1に関するコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号8と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、遺伝子改変は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ及びアセチル-CoAシンターゼの細胞質発現を増加させるための改変を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、配列番号4の塩基3938から5893によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS.

40

50

エンテリカ(*S. enterica*)由来のAcsL641Pに関するコード配列、及び配列番号4の塩基1494から2999によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する*S. セレビシエ*由来のAld6に関するコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号4の塩基51から7114と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、遺伝子改変は、マロニル-CoAシンターゼの活性を増加させるための改変を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、*S. セレビシエ*由来のAcc1S659A; S1167Aに関するコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、Acc1S659A; S1167A酵素に関するコード配列を含み、該酵素の一部が、配列番号7の塩基9から1716によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質部分Acc1S659A; S1167Aと80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号7と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、酵母細胞は、構成的プロモーターの調節下にある*S. セレビシエ*由来のAcc1に関するコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、構成的プロモーターは、*S. セレビシエ*由来のPGK1プロモーターを含む。一部の実施形態では、PGK1プロモーターは、配列番号6の塩基7から750と80%から100%の間のヌクレオチド相同性を有する。一部の実施形態では、遺伝子改変は、ステロール生合成の活性化因子の発現の増加を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、配列番号9の塩基975から3701によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する*S. セレビシエ*由来のUpc2E888Dに関するコード配列を含む第3のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を含み、配列番号9と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。

10

20

30

40

50

【0032】

一部の実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35又は配列番号36のいずれか1つと80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素に関するコード配列を含む。

【0033】

一部の実施形態では、方法は、酵母細胞培養物から植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種を抽出する工程を含む。

【0034】

さらなる態様では、本明細書において、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを生成するための酵母細胞であって、ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチド;及び細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチドを含む、酵母細胞が提供される。

【0035】

一部の実施形態では、本明細書に記載の酵母細胞、第1のポリヌクレオチド、又は第2のポリヌクレオチドのうちの1つ又は複数についての特徴が、酵母細胞中に含まれる。

【0036】

さらなる態様では、本明細書において、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログの生成のために酵母細胞を形質転換する方法が提供される。この方法は、ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチドを酵母細胞株へと導入する工程、及び細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチドを酵母へと導入する工程を含む。

【0037】

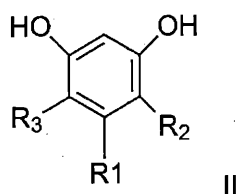
一部の実施形態では、本明細書に記載の酵母細胞、第1のポリヌクレオチド、又は第2のポリヌクレオチドのうちの1つ又は複数についての特徴は、酵母細胞を形質転換する際に適用される。

【0038】

さらなる態様では、本明細書において、以下の構造II:

【0039】

【化2】



10

【0040】

を有する植物性カンナビノイドアナログが提供される。構造IIにおいて、R1は、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基である。R2は、メチル基である。R3は、H、カルボキシル基、又はメチル基である。

20

【0041】

一部の実施形態では、R1は、炭素数5の鎖長を有し、R3は、Hである。

【0042】

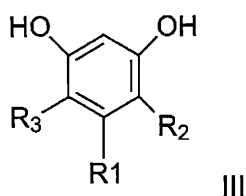
一部の実施形態では、植物性カンナビノイドアナログは、酵母における生合成によって生成される。

【0043】

さらなる態様では、本明細書において、以下の構造III:

【0044】

【化3】



30

【0045】

を有する植物性カンナビノイドアナログが提供される。構造IIIにおいて、R1は、ペンチル基であり;R2は、メチル基であり;R3は、Hである。

40

【0046】

本開示の他の態様及び特徴は、添付の図面と併せて、具体的実施形態についての以下の説明を鑑みて、当業者にとって明らかとなるであろう。

【0047】

本開示の実施形態を、ここで、ほんの一例として、添付の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】アサにおけるオリベトール酸と異なるアルキル鎖長を有する関連化合物との生合

50

成の概略図である。

【図2】アサにおけるヘキサ酸、マロニル-CoA、及びゲラニルピロリン酸からのCBGaの生合成の概略図である。

【図3】アサにおけるCBGaからの酸性形態の下流の植物性カンナビノイドの生合成の概略図である。

【図4】OAS及びAltPTによる形質転換酵母細胞におけるCBGの生合成の概略図である。

【図5】CBGからの形質転換酵母細胞における下流の植物性カンナビノイドの生合成の概略図である。

【図6】DiPKS及びAltPTによる形質転換酵母細胞におけるmeCBGの生合成の概略図である。

【図7】meCBGからの形質転換酵母細胞における下流のメチル化植物性カンナビノイドアナログの生合成の概略図である。

【図8】meCBGからの形質転換酵母細胞における下流のメチル化植物性カンナビノイドアナログの生合成の概略図である。

【図9】オリベトールのメチル化を低下させるための、C-メチルトランスフェラーゼに対する変異を有するDiPKSにおける機能的ドメインの概略図である。

【図10】DiPKS^{G1516D; G1518A}及びAltPTによる形質転換酵母細胞におけるmeCBG及びCBGの生合成の概略図である。

【図11】DiPKS^{G1516R}及びAltPTによる形質転換酵母細胞におけるCBGの生合成の概略図である。

【図12】ヘキサ酸の様々な濃度におけるS.セレビシエの増殖を示すグラフである。

【図13】ヘキサ酸が導入される前後のS.セレビシエの増殖及びオリベトール生成を示すグラフである。

【図14】ヘキサ酸が導入される前後の酵母の増殖及びCBG生成を示すグラフである。

【図15】ヘキサ酸が導入される前後の酵母の増殖及びヘキサ酸消費を示すグラフである。

【図16】S.セレビシエにおける、アサの膜結合性プレニルトランスフェラーゼ及びAltPTの細胞質発現を示すグラフである。

【図17】S.セレビシエにおける、アサのOAS及びAltPTによるCBGの生成及びDiPKS及びAltPTによるmeCBGの生成を示すグラフである。

【図18】DiPKSによるメチル-オリベトールの生成及びDiPKS^{G1516D; G1518A}によるメチル-オリベトールとオリベトールの両方の生成を示すグラフである。

【図19】S.セレビシエの2つの別々の株における、DiPKSによるメチル-オリベトールの生成を示すグラフである。

【図20】S.セレビシエの2つの別々の株における、DiPKSによるメチル-オリベトールの生成を示すグラフである。

【図21】S.セレビシエの2つの別々の株における、AltPTによるmeCBGの生成を示すグラフである。

【図22】S.セレビシエの2つの別々の株における、DiPKSによるメチル-オリベトールの生成、及びDiPKS^{G1516R}によるメチル-オリベトールとオリベトールの両方の生成を示すグラフである。

【図23】S.セレビシエの3つの別々の株における、DiPKS^{G1516R}によるオリベトールの生成を示すグラフである。

【図24】S.セレビシエの3つの株における、アサのOAS及びAltPTによるCBGの生成、DiPKS及びAltPTによるmeCBGの生成、並びにDiPKS^{G1516R}及びAltPTによるCBGの生成を示す。

【発明を実施するための形態】

【0049】

一般的に、本開示は、アサ植物において天然に生合成される植物性カンナビノイド及びメチル-オリベトールから生合成されるメチル化植物性カンナビノイドアナログを生成するための方法及び酵母細胞株を提供する。植物性カンナビノイド及び植物性カンナビノイ

10

20

30

40

50

ドアナログは、トランスジェニック酵母において生成される。本発明において提供される方法及び細胞株は、アサ植物に存在しない酵素に対する遺伝子の適用を含む。植物性カンナビノイドを生じる生合成経路における酵素をコードするアサ植物における遺伝子一式以外の遺伝子の適用により、脱炭酸植物性カンナビノイドの生合成、メチル化植物性カンナビノイドアナログの生合成、及びサッカロマイセス・セレビスエ及び他の種の酵母にとって毒性であるヘキサ酸を投入しない、植物性カンナビノイドの生合成による生成を含む1つ又は複数の利益をもたらすことができる。

【0050】

修飾語「脱炭酸」は、本明細書で使用される場合、例えば、9-テトラヒドロカンナビノール(「THC」)の2若しくは4位において、又はアサにおけるカンナビゲロール酸(「CBGa」)の生合成に対する前駆体であるオリベトール酸の4位に対応する、他の植物性カンナビノイド若しくは植物性カンナビノイドアナログにおける同等の位置において、酸性基を欠く植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログの形態を指す。植物性カンナビノイドの酸性形態は、アサにおいて、オリベトール酸から生合成される。植物性カンナビノイドの酸形態が加熱されると、植物性カンナビノイドの芳香環とカルボキシル基の間の結合が切断される。脱炭酸は、アサにおいて生成されたカルボキシル化植物性カンナビノイドを加熱することに起因し、一般的に、約110 を超える温度まで燃焼又は加熱する間に急速に起こる。簡単化のため、本明細書で使用される場合、「脱炭酸」は、植物性カンナビノイドが、真の脱炭酸の間に失われた酸性基を含んでいたか、又はカルボキシル基を有さずに生合成された否かにかかわらず、酸性基を欠く植物性カンナビノイドを指す。

【0051】

図1は、アサにおいて起こる、マロニル-CoAとヘキサノイル-CoAのポリケチド縮合産物からのオリベトール酸の生合成を示す。オリベトール酸は、CBGaに対する代謝前駆体である。CBGaは、以下に更に詳細に記載する多数の下流の植物性カンナビノイドに対する前駆体である。ほとんどの種類のアサでは、植物性カンナビノイドの大多数が、オリベトール酸から生合成され、次に、2:1の化学量論比のマロニル-CoAとヘキサノイル-CoAから合成される、ペンチル-カンナビノイドである。プロピル-カンナビノイドが観察される場合もあり、広く使用される三文字略記における「v」という添え字により特定されることが多い(例えば、テトラヒドロカンナビパリンは、通常、「THCv」と称され、カンナビジパリンは、通常、「CBDv」と称される等)。図1はまた、下流のプロピル-植物性カンナビノイドをもたらすこととなる、マロニル-CoAとn-ブチル-CoAとの縮合からのジバリノール酸の生合成を示す。

【0052】

図1はまた、下流のメチル-植物性カンナビノイドをもたらすこととなる、マロニル-CoAとアセチル-CoAとの縮合からのオルセリン酸の生合成を示す。「メチル-植物性カンナビノイド」という用語は、この文脈において、それらのアルキル側鎖がメチル基であることを意味し、ほとんどの植物性カンナビノイドが、アルキル側鎖にペンチル基を有し、varinnic植物性カンナビノイドが、アルキル側鎖にプロピル基を有する。meCBG及び他のメチル化植物性カンナビノイドアナログが「メチル化」と称される文脈は、「メチル-植物性カンナビノイド」及び図1における接頭辞としての「メチル」の使用と異なり、それに類似する。同様に、オリベトールは規定の長さの側鎖を有するため(そうでなければ、図1に示される他の3つのポリケチドのうちの一つであるか、「オリベトール」ではない)、メチル-オリベトールは、環におけるメチル化への言及であり、より短い側鎖に対する言及ではない。

【0053】

図1はまた、下流のブチル-植物性カンナビノイドをもたらすこととなる、マロニル-CoAとパレリル-CoAとの縮合からの2,4-ジオール-6-プロピル安息香酸(2,4-diol-6-propylbenzoic acid)の生合成を示す。

【0054】

図2は、図1に示されるオリベトール酸生合成工程を含む、アサにおけるヘキサ酸、マ

ロニル-CoA、及びゲラニルピロリン酸(「GPP」)からのCBGaの生合成を示す。ヘキサノール酸は、補酵素Aと共にヘキサノイル-CoAシターゼによって活性化される(「Hex1」;図2の反応1)。OAS(オリベトールを合成し、オリベトール酸を合成しないにもかかわらず、オリベトール酸シターゼとも称される)及びOACは、一緒になって、ヘキサノイルCoA及びマロニル-CoAからのオリベトール酸の生成を触媒する(図2の反応2)。プレニルトランスフェラーゼは、オリベトール酸をGPPと結び付け、図2のCBGa工程3をもたらす。

【0055】

図3は、CBGaからの、アサにおける下流の酸形態の植物性カンナビノイドの生合成を示す。CBGaは、THCaシターゼによって、9-テトラヒドロカンナビノール酸(「THCa」)へと酸化的に環化される。CBGaは、CBDaシターゼによって、カンナビジオール酸(「CBDa」)へと酸化的に環化される。カンナビクロメン酸(「CBCa」)、カンナビエルソン酸(「CBEa」)、イソ-テトラヒドロカンナビノール酸(「iso-THCa」)、カンナビシクロール酸(「CBLa」)、又はカンナビシトラン酸(「CBTa」)等の他の植物性カンナビノイドも、他のシターゼ酵素によって、又は得られる植物性カンナビノイド構造に関して酵素活性に影響を及ぼすように植物細胞内の条件を変えることによって、アサにおいて合成される。これらの一般的な植物性カンナビノイドタイプのそれぞれの酸形態を、オリベトール酸がヘキサノイル-CoA及びマロニル-CoAから合成される5位炭素鎖となるアルキル側鎖を示す一般的「R」基を用いて図3に示す。一部の場合では、カルボキシル基は、図3に示される位置とR基に対して反対側の環上の位置に、代わりに見出される(例えば、図3に示される2位よりもむしろTHCの4位等)。図3に示される植物性カンナビノイドの脱炭酸形態は、それぞれ、THC、カンナビジオール(「CBD」)、カンナビクロメン(「CBC」)、カンナビエルソイン(「CBE」)、イソ-テトラヒドロカンナビノール(「iso-THC」)、カンナビシクロール(「CBL」)、又はカンナビシトラン(「CBT」)である。

【0056】

Poulosらの米国特許出願公開第2016/0010126号には、S.セレピシエ及びK.マルキシアヌス(K. marxianus)における5つのネイティブアサ遺伝子の発現について記載されている。植物性カンナビノイド生成のための酵母におけるネイティブアサ経路由来の遺伝子の発現は、欠点を有する場合がある。アサのOASは、ポリケチド基質として、ヘキサノイル-CoAを使用する。ヘキサノール酸は、S.セレピシエ及び酵母のいくつかの他の株に対して毒性である。更に、オリベトール酸からのCBGaの合成には、真菌では十分に発現されない場合のある、膜結合性のアサのプレニルトランスフェラーゼ酵素が必要とされる。

【0057】

植物性カンナビノイド及び植物性カンナビノイドアナログの生成のために本発明において提供される方法及び酵母細胞は、ストレプトマイセス種CL 190由来のプレニルトランスフェラーゼNphBの遺伝子を形質転換したS.セレピシエを適用し、含んでもよい。ストレプトマイセス種CL 190のNphBプレニルトランスフェラーゼは、アサのプレニルトランスフェラーゼ酵素の代わりに提供し、以下で「AltPT」と称される。AltPTは、(「ABBA」)タイプのプレニルトランスフェラーゼ酵素である。AltPTは、非常に無差別であり、ほとんどのポリケチドをプレニル化に対する基質として許容する。AltPTは、テルペノイドドナーとしてGPPに特異的である。AltPTは、植物であるアサで発現される膜結合性プレニルトランスフェラーゼと対照的に、グラム陽性細菌であるストレプトマイセス種CL 190で発現される細胞質性酵素である。細菌の細胞質性酵素は、酵母において、植物の膜結合性酵素よりも高いレベルで発現する。AltPTは、アサにおける膜結合性プレニルトランスフェラーゼによって触媒される反応と同様に、オリベトール酸をCBGaにプレニル化する。AltPTはまた、オリベトールをカンナビゲロール(「CBG」)に、又はメチル-オリベトールをメチルカンナビゲロール(「meCBG」)にプレニル化することとなる。酵母に対して最適化されるAltPTの合成配列は、本明細書において、配列番号1に含まれる。AltPTを完全にコードするDNA配列(「CDS」)は、NCBI GenBankのオンラインデータベースにおいて、受託番号NCBI-AB187169で利用可能である。

【0058】

10

20

30

40

50

図4は、ヘキサノール酸、マロニル-CoA、及びGPPからCBGを生成するための、トランスジェニック酵母における生合成経路を示す。図4に示されるCBGを生成するための本発明において提供される酵母株は、ストレプトマイセス種CL190のAltPT、アサのHex1、及びアサのOASをコードする遺伝子を含んでもよい。このような酵母株の例は、「HB37」及び「HB88」として提供され、これらはそれぞれTable 7(表7)に記載されている。

【0059】

図5は、CBGからの下流の植物性カンナビノイドの生合成を示す。CBGは、THC、CBD、CBC、CBE、iso-THC、CBL、又はCBTへと酸化して環化される。これらの一般的な植物性カンナビノイドタイプのそれぞれの脱炭酸形態は、オリベトールから生合成される植物性カンナビノイドの5位炭素鎖となるアルキル側鎖を示す一般的「R」基を用いて図5に示される。

10

【0060】

図4は、Hex1による、ヘキサノール酸からのヘキサノイル-CoAの生成を示す。ヘキサノール酸は、補酵素Aと共にHex1によって活性化される(図4の反応1)。OASは、ヘキサノイルCoA及びマロニル-CoAからのオリベトールの生成を触媒する(図4の反応2)。AltPTによって、オリベトール酸はGPPと縮合し、CBGが得られる(図4の反応3)。

【0061】

図4に示される経路は、アサのHEX1及びアサのOASを含む。図4に示される経路は、アサのOACを含まない。それに対応して、図4の経路を実行するためのトランスジェニック酵母細胞は、OASに対する遺伝子を含むが、アサのOACに対する遺伝子を含まない。アサのOACは、オリベトール酸の生合成の間に、オリベトールをオリベトール酸へとカルボキシル化する。OASを用い、OAC又は別のポリケチドシクラーゼを用いない場合、オリベトール酸よりもオリベトールが生成され、これはアサにおいて生成される。結果として、AltPTによって触媒される反応は、CBGaよりもむしろCBGを生じる。次いで、植物性カンナビノイドを生成する下流の反応は、それと対応して、図5の植物性カンナビノイドを含む植物性カンナビノイドの脱炭酸種を生成し、一方、図3の植物性カンナビノイドを含む酸形態は、アサにおけるように、OAC又は別のポリケチドシクラーゼも存在する場合に生成されることとなる。

20

【0062】

図4の反応2におけるOASによって触媒されたヘキサノイル-CoAのオリベトールへの変換は、図4の経路において、代謝の傷害として特定された。図4の反応2における収率を増加させるために、複数の酵素が機能的にスクリーニングされ、1つの酵素、すなわち、マロニル-CoAから直接メチル-オリベトールを生成することができる、「DiPKS」と称されるキイロタマホコリカビ由来のポリケチドシンターゼが特定された。酵母に対してコドン最適化されるDiPKSの合成配列は、本明細書において、配列番号2に含まれる。DiPKSのCDSは、NCBI GenBankのオンラインデータベースにおいて、受託番号NC_007087.3で利用可能である。

30

【0063】

図6は、マロニル-CoA及びGPPからのmeCBGを生成するためのトランスジェニック酵母における生合成経路を示す。図6に示されるCBGを生成するための、本発明において提供される酵母株は、AltPTに対する遺伝子及び培地中にヘキサノール酸を必要とすることなく、マロニル-CoAのみからのポリケチドの生成をサポートするDiPKSに対する遺伝子を含んでもよい。DiPKSは、脂肪酸シンターゼに見られるドメイン、メチルトランスフェラーゼドメイン、及びPks IIIドメインに類似する機能的ドメインを含む(図9を参照のこと)。野生型DiPKS遺伝子をコードするコドン最適化合成配列を含む酵母株の例は、「HB84」、「HB90」、及び「HB105」として提供され、そのそれぞれはTable 7(表7)に記載されている。

40

【0064】

図6は、DiPKSによって触媒される、マロニル-CoAからのメチル-オリベトールの生成(図6の反応1)を示す。AltPTは、プレニル基のドナーとして、GPPと共にメチル-オリベトールをプレニル化し、meCBGをもたらす(図6の反応2)。OASよりもむしろDiPKSを適用することによって、ヘキサノール酸を補充せずに、植物性カンナビノイド及び植物性カンナビノイドア

50

ナログの生成が促進される。ヘキサノ酸は、S.セレビシエに対して毒性であるため、CBG又はmeCBGのための生合成経路においてヘキサノ酸に対する要求を除去することによって、OAS及びHex1を発現する酵母細胞におけるCBGの収率よりも高いCBG又はmeCBGの収率を得ることができる。

【0065】

図7及び図8は、それぞれ、THC、CBD、CBC、CBE、iso-THC、CBL、及びCBTのメチル化アナログであり、オリベトール酸又はオリベトールの代わりにメチル-オリベトールが前駆化学物質として提供される場合に調製され得る、メチル-テトラヒドロカンナビノール(「meTHC」)、メチル-カンナビジオール(「meCBD」)、メチル-カンナビクロメン(「meCBC」)、メチル-カンナビエルソイン(「meCBE」)、イソ-メチル-テトラヒドロカンナビノール(「iso-meTHC」)、メチル-カンナビシクロール(「meCBL」)、又はメチル-カンナビシトラン(「meCBT」)に対応する下流のメチル化植物性カンナビノイドアナログを示す。これらのメチル化植物性カンナビノイドアナログのそれぞれの脱炭酸形態を、合成がヘキサノイル-CoA及びマロニル-CoA、又はマロニル-CoAのみに起因する5位炭素鎖となるアルキル側鎖を示す一般的「R」基を用いて図7及び図8に示す。

10

【0066】

meCBD以外にも、図7及び図8に示される下流の植物性カンナビノイドアナログのそれぞれの構造の一部は、芳香環に結合した回転が制約された基を含む。結果として、meCBD以外の図7及び図8に示される各下流の植物性カンナビノイドアナログは、2つの回転異性体のうちの1つのmeCBGから合成され得る。合成の間のmeCBGの回転異性体によって、得られる環化されたメチル化植物性カンナビノイドアナログのメチル基は、図7のmeTHC、meCBC、meCBE、iso-meTHC、meCBL、若しくはmeCBTの異性体について示される位置、又は図8のmeTHC、meCBC、meCBE、iso-meTHC、meCBL、若しくはmeCBTの異性体について示される位置に存在し得る。本明細書におけるmeTHC、meCBC、meCBE、iso-meTHC、meCBL、又はmeCBTへの言及は、図7及び図8に示される異性体のいずれか又は両方を含む。

20

【0067】

DiPKSは、オリベトールを芳香環の4位においてメチル化するC-メチルトランスフェラーゼドメインを含む。結果として、AltPTはメチル-オリベトールをプレニル化して、アサにおいて合成されることが知られているCBGaではなく、植物性カンナビノイドアナログであるmeCBGを生じる。インプットとしてCBGa又はCBGを使用する場合に植物性カンナビノイドを生成することができる任意の下流の反応は、図7及び図8に示すメチル化植物性カンナビノイドアナログの脱炭酸種に対応して生成することになるが、一方、植物性カンナビノイドの非メチル化酸形態がアサにおいて生成されることになる(図3を参照のこと)。メチル化及びカルボキシル化の炭素は異なる位置に存在し得るため、OAC又は別のポリケチドシクラーゼが含まれる場合、メチル-オリベトールは、OAC又は他のポリケチドシクラーゼによってmeCBGaへと変換されてもよい。例えば、meCBGから合成されるmeTHCは、炭素4においてメチル化されてもよく、2位に存在し得るTHCaのカルボキシ基により、メチル-テトラヒドロカンナビノール酸(「meTHCa」)へとカルボキシル化され得る。或いは、meCBGから合成されるmeTHCは、炭素2においてメチル化されてもよく、この場合、THCaのカルボキシ基は、4位にあってもよい。THCaは、2位、又は4位にカルボキシ基を有するアサにおいて観察される。

30

40

【0068】

図9は、 β -ケトアシル-シンターゼ(「KS」)、アシルトランスアセチラーゼ(「AT」)、デヒドラターゼ(「DH」)、C-メチルトランスフェラーゼ(「C-Met」)、エノイルレダクターゼ(「ER」)、ケトレダクターゼ(「KR」)、及びアシルキャリアタンパク質(「ACP」)を示すDiPKSの機能的ドメインの概略図である。「タイプIII」のドメインは、3型ポリケチドシンターゼである。FAS-PKSタンパク質であるDiPKSについて言えば、KS、AT、DH、ER、KR、及びACP部分は、典型的には、脂肪酸シンターゼと関連する機能をもたらす。C-Metドメインは、炭素4においてオリベトールをメチル化するための触媒活性をもたらす。C-Metドメインは、図9において線で削除されており、C-Metドメインを不活性化し、メチル化の

50

機能性を軽減するか又は消失させるDiPKSタンパク質に対する改変を模式的に例証する。タイプIIIのドメインは、反復型ポリケチド伸長及びACPからタイプIIIDメインへと導入されたヘキサノ酸チオエーテルの環化を触媒する。

【0069】

図10は、マロニル-CoA及びGPPからのmeCBGとCBGの両方の生成のためのトランスジェニック酵母における生合成経路を示す。図10に示されるCBGとmeCBGの両方を生成するための本発明において提供される酵母株は、AltPTに対する遺伝子及び図9で模式的に示されるように、C-Metドメインにおいて活性の低下した変異体DiPKSに対する遺伝子を含んでもよい。DiPKSタンパク質のC-Metドメインは、DiPKSのアミノ酸残基1510から1633を含む。C-Metドメインは、3つのモチーフを含む。第1のモチーフは、残基1510から1518を含む。第2の

10

【0070】

C-Metドメインにおいて活性の低下した改変DiPKSを発現する酵母株の例は、以下の実施例Vにおいて「HB80A」として提供される。HB80Aは、野生型DiPKSタンパク質をコードする酵母のコドン最適化遺伝子において改変を含む。HB80Aは、DiPKSタンパク質がC-Metドメインの第1のモチーフにおいて改変されるようなDiPKS遺伝子における改変を含む。DiPKS遺伝子に対するこれらの改変の結果として、DiPKSタンパク質は、Gly1516Asp及びGly1518Alaの置換を有する。HB80Aは、DiPKS^{G1516D; G1518A}のみを含み、AltPTを含まず、結果として、図10の工程1A及び1Bのみを触媒し、反応2Aも2Bも触媒しない。HB80Aは、メチル-オリベトール及びオリベトールを生成する。HB80A株は、例えば、HB80AをpAltPTプラスミドで形質転換することによって、AltPTを含むように改変されてもよい(Table 6(表6)を参照のこと)。

20

【0071】

図10は、マロニル-CoAからのメチル-オリベトール(図10の反応1A)とマロニル-CoAからのオリベトール(図10の反応1B)の両方の生成を示す。反応1A及び反応1Bは、それぞれ、DiPKS^{G1516D; G1518A}によって触媒される。Gly1516Asp及びGly1518Alaの置換は、C-Metドメインの活性部位におけるものであり、オリベトール環の4位におけるメチル化のDiPKS^{G1516D; G1518A}による触媒を減少させ、インプットマロニル-CoAの一部が、反応1Aよりも反応1Bに従って触媒されるのを可能とする。無差別なABBAプレニルトランスフェラーゼであるAltPTは、GPPとメチル-オリベトール及びGPPとオリベトールの両方のプレニル化を触媒する。結果として、meCBG(図10の反応2A)及びCBG(図10の反応2B)が生成される。次いで、他の植物性カンナビノイドを生成するための任意の下流の反応は、CBGの芳香環における4位(又は下流の植物性カンナビノイドにおける対応する位置)において官能基を有さないメチル化植物性カンナビノイドアナログ及びメチル化植物性カンナビノイド種の混合物を対応して生成し、一方、酸形態はアサにおいて生成されることになる。

30

【0072】

図11は、マロニル-CoA及びGPPのみからのCBGの生成のためのトランスジェニック酵母における生合成経路を示す。図11に示されるCBGのみを生成するための本発明において提供される酵母株は、AltPTに対する遺伝子及び図9で模式的に示されるように、C-Metドメインにおいて活性の低下した変異体DiPKSに対する遺伝子を含んでもよい。

40

【0073】

C-Metドメインにおいて基本的に活性を有さない改変DiPKSを発現する酵母株の例は、以下の実施例VIII、IX及びXにおいて「HB135」、「HB137」、「HB138」及び「HB139」として提供される。HB135、HB137、HB138及びHB139のそれぞれは、野生型DiPKSタンパク質をコードする酵母のコドン最適化遺伝子において改変を含む。HB135、HB137、HB138及びHB139はそれぞれ、DiPKSタンパク質がC-Metドメインの第1のモチーフにおいて改変されるようなDiPKS遺伝子の改変を含む。DiPKS遺伝子に対するこれらの改変の結果として、DiPKSタンパク質は、Gly1516Argの置換を有する。

50

【 0 0 7 4 】

DiPKS^{G1516R}は、図11の反応1を触媒する。Gly1516Argの置換は、C-Metドメインの活性部位におけるものであり、オリベトール環の4位におけるメチル化のDiPKS^{G1516R}による触媒を減少させる。マロニル-CoAのインプットは、図11の反応1に従って触媒される。HB139はAltPTも含み、結果として、オリベトール及びCBG(図11の反応2)が生成される。次いで、他の植物性カンナビノイドを生成するための任意の下流の反応は、CBGの芳香環における4位、又は下流の植物性カンナビノイドにおける対応する位置において官能基を有さない植物性カンナビノイド種を対応して生成し、一方、酸形態はアサにおいて生成されることになる。

【 0 0 7 5 】

生合成前駆体の利用可能性の増加

図4、図6、図10及び図11において示される各生合成経路は、それぞれ、CBGa、CBG、又はmeCBGを生成するために、マロニル-CoA及びGPPを必要とする。酵母細胞は変異してもよく、他の種に由来する遺伝子が導入されてもよく、遺伝子が上方調節又は下方調節されてもよく、又はそうでなければ、酵母細胞は、マロニル-CoA、GPP、又は図4、図6、図10及び図11のいずれかの生合成経路をサポートするために必要とされる他のインプット代謝物の利用可能性を増加させるために、OAS又はDiPKS等のポリケチドシンターゼの導入以外、及びAltPT等の細胞質性プレニルトランスフェラーゼの導入以外に、遺伝子改変されてもよい。

【 0 0 7 6 】

酵母細胞は、利用可能なGPPを増加させるために改変されてもよい。S.セレピシエは、Erg20又はGPPを枯渇させる代謝経路をサポートする酵素に関する他の遺伝子に、1つ又は複数の他の変異を有してもよい。Erg20は、酵母細胞におけるGPP生成を触媒する。Erg20はまた、GPPに3-イソペンチルピロリン酸(「IPP」)の1つのサブユニットを付加し、下流のセスキテルペン及びステロールの生合成に使用される代謝物である、ファルネシルピロリン酸(「FPP」)を生じる。Erg20におけるいくつかの変異は、GPPのFPPへの変換を低減させ、細胞において利用可能なGPPを増加させることが実証されている。Erg20における置換変異Lys197Gluは、Erg20によるGPPのFPPへの変換を低下させる。Table 4(表4)に示されるように、すべての改変基本株は、Erg20^{K197E}変異体タンパク質(「HB42」、「HB82」、「HB100」、「HB106」、及び「HB110」)を発現する。同様に、HB42、HB82、HB100、HB106、又はHB110のいずれかに基づく各改変酵母株は、酵母ゲノムに組み込まれるErg20^{K197E}変異体をコードする完全ポリヌクレオチドを含む。配列番号3は、Erg20^{K197E}タンパク質及び相同組換えに関するフランキング配列をコードするCDSである。

【 0 0 7 7 】

酵母株は、利用可能なマロニル-CoAを増加させるために改変されてもよい。ミトコンドリアのアセトアルデヒド異化の低下により、エタノール異化からのアセトアルデヒドのアセチル-CoA生成への転換が生じ、次いで、マロニル-CoA及び下流のポリケチド及びテルペノイドの生成が駆動される。S.セレピシエは、残基641におけるロイシンのプロリンへの置換による改変(「Acs^{L641P}」)、及びS.セレピシエ由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ6(「Ald6」)を有するサルモネラ・エンテリカ(Salmonella enterica)由来のアセチル-CoAを発現するように改変することができる。Leu641Pro変異は、Acsの下流調節を除去し、Acs^{L641P}変異体に関して、野生型Acsよりも高い活性をもたらす。まとめると、これら2つの酵素の細胞質発現により、細胞質におけるアセチル-CoAの濃度が増加する。細胞質におけるアセチル-CoAの濃度が高くなるほど、ミトコンドリア異化は低下し、ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼ(「PDH」)を回避して、PDHバイパスをもたらす。結果として、より多くのアセチル-CoAがマロニル-CoA生成に利用可能となる。配列番号4は、pGREGプラスミドをベースとするプラスミドであり、及びAld6及びSeAcs^{L641P}に対する遺伝子、プロモーター、ターミネーター、及びクラスター化規則的間隔短鎖回文反復配列(「CRISPR」)を適用する組換えによって、Flagfeldt-部位19におけるS.セレピシエゲノムへの組み込みのための組み込み部位相同配列をコードするDNA配列を含む。以下のTable 4(表4)に示され

10

20

30

40

50

るように(「PDHバイパス」という用語によって)、基本株HB82、HB100、HB106、及びHB110は、TDH₃プロモーターの下でAld6をコードする塩基1494から2999に由来する配列番号4の一部、及びTef1_pプロモーターの下でSeAcs^{L641P}をコードする塩基3948から5893に由来する配列番号4の一部を有する。同様に、HB82、HB100、HB106、又はHB110のいずれかに基づく各改変酵母は、Ald6及びSeAcs^{L641P}をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0078】

細胞質性マロニル-CoAを増加させることに対する別のアプローチは、ネイティブ酵母マロニル-CoAシンターゼであるAcc1を上方調節することである。Acc1遺伝子のプロモーター配列は、PGK1遺伝子に対する構成的酵母プロモーターによって置き替えられた。PGK1遺伝子由来のプロモーターは、Acc1の複数の複製が細胞内に存在することを可能とする。ネイティブAcc1プロモーターは、タンパク質の単一の複製のみが同時に細胞内に存在することを可能とする。ネイティブプロモーター領域は、配列番号5に示されている。改変プロモーター領域は、配列番号6に示されている。

【0079】

Acc1の発現を上方調節することに加えて、S.セレビスシエは、Acc1活性及び細胞質性アセチル-CoA濃度を増加させるために、1つ又は複数のAcc1の改変を含んでもよい。Acc1の抑制を取り除き、より高いAcc1発現及びより多いマロニル-CoA生成をもたらす調節配列における2つの変異は、文献において特定された。配列番号7は、S.セレビスシエゲノムを相同組換えによってネイティブAcc1遺伝子において改変するために使用され得るポリヌクレオチドである。配列番号7は、Ser659Ala及びSer1167Ala改変を有するAcc1遺伝子に関するコード配列の一部を含む。結果として、この配列により形質転換されたS.セレビスシエは、Acc1^{S659A; S1167A}を発現することになる。同様の結果は、例えば、任意の適切な部位に、Tef1プロモーター、Ser659Ala及びSer1167Ala改変を有するAcc1、及びPrm9ターミネーターを有する配列を組み込むことによって達成されてもよい。最終結果は、Tef1、Acc1^{S659A; S1167A}、及びPrm9が、S.セレビスシエゲノムへの組み込みを促進するためのゲノムDNA配列に隣接することであろう。これは、Flagfeldtの部位18で試みられたが、構築物のサイズによって、代わりに、上述の配列番号7を用いるアプローチが続いて行われた。

【0080】

S.セレビスシエは、Maf1又はtRNA生合成の他の調節因子の改変された発現を含んでもよい。ネイティブMaf1の過剰発現は、tRNA生合成に対するIPPの損失を低減させ、それによって、酵母におけるモノテルペンの収率を改善することが示されている。IPPは、メバロン酸経路における中間体である。配列番号8は、Tef1プロモーターの下でのMaf1ゲノム組み込みのために、Maf1-部位5においてS.セレビスシエのゲノムへと組み込まれたポリヌクレオチドである。配列番号8は、Tef1プロモーター、ネイティブMaf1遺伝子、及びPrm9ターミネーターを含む。まとめると、Tef1、Maf1、及びPrm9は、S.セレビスシエゲノムへの組み込みを促進するためのゲノムDNA配列によって隣接する。以下のTable 4(表4)に示されるように、基本株HB100、HB106、及びHB110は、Tef1プロモーターの下でMaf1を発現する。同様に、HB100、HB106、又はHB110のいずれかに基づく各改変酵母は、Tef1プロモーターの下でMaf1に関するコード配列を含むポリヌクレオチドを含む。

【0081】

Upc2は、S.セレビスシエにおけるステロール生合成の活性化因子である。Upc2のGlu888Asp変異によって、酵母におけるモノテルペン生成が増加する。配列番号9は、Tef1プロモーターの下でUpc2^{E888D}の発現をもたらすためにゲノムへと組み込まれ得るポリヌクレオチドである。配列番号9は、Tef1プロモーター、Upc2^{E888D}遺伝子、及びPrm9ターミネーターを含む。まとめると、Tef1、Upc2^{E888D}、及びPrm9は、S.セレビスシエゲノムへの組み込みを促進するためにゲノムDNA配列に隣接する。

【0082】

上記遺伝子、Erg20^{K197E}、Acs^{L641P}、Ald6、Maf1、Acc1^{S659A; S1167A}又はUpc2^{E888D}は、プラスミドから発現されるか又はS.セレビスシエのゲノムへと組み込まれてもよい。ゲノムへの組み込みは、CRISPR組換えを含む相同組換え、又は任意の適切なアプローチによる

10

20

30

40

50

ものであってもよい。Acc1のプロモーターは、組換えによって同様に改変されてもよい。配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7、配列番号8、又は配列番号9のそれぞれにおけるコード配列及び調節配列は、発現のためのプラスミド(例えば、pYES等)又は*S. セレビシエ*ゲノムへの組み込みのための直鎖状ポリヌクレオチドに含まれてもよい。基本株HB42、HB82、HB100、HB106、又はHB110のそれぞれは、1つ又は複数の組み込まれた配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号8、又は配列番号10を含む(以下を参照のこと)。配列番号7、又は配列番号9の組み込みは、同様のアプローチによって適用されてもよい。

【0083】

DiPKS機能の増加

図9に示されるように、DiPKSは、ACPドメインを含む。DiPKSのACPドメインは、補因子としてホスホパンテテイン基を必要とする。NpgAは、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)由来の4'-ホスホパンテチエニルトランスフェラーゼである。*S. セレビシエ*に対してコドン最適化されたNpgAの複製は、*S. セレビシエ*へと導入され、例えば、相同組換えによって、*S. セレビシエ*に形質転換されてもよい。NpgA遺伝子カセットは、Flagfeldtの部位14でサッカロマイセス・セレビシエのゲノムへと組み込まれ、株HB100を作出する。組み込まれたDNAの配列は、配列番号10に示され、Tef1プロモーター、NpgAコード配列及びPrm9ターミネーターを含む。まとめると、Tef1p、NpgA、及びPrm9tは、*S. セレビシエ*ゲノムのFlagfeldtの部位14への組み込みを促進するゲノムDNA配列に隣接する。以下のTable 4(表4)に示されるように、基本株HB100、HB106、及びHB110は、この組み込みカセットを含む。或いは、配列番号10の塩基636から2782が、株HB98におけるように、発現プラスミドに含まれてもよい。

【0084】

NpgAの発現によって、DiPKSのACPドメインへとホスホパンテテイン基を負荷するという、より強い触媒作用のためのA. ニデュランスのホスホパンテチエニルトランスフェラーゼがもたらされる。結果として、DiPKSによって触媒される反応(図6の反応1)は、より早い速度で起こり、meCBGへのプレニル化のためのメチル-オリベトールをより多量にもたらし得る。

【0085】

他のプレニルトランスフェラーゼ酵素

NphBバリエーションは、ABBAプレニルトランスフェラーゼ構造に関するDELTA BLAST検索に基づいて定義された。このリストは、GPPに対して適当であり、IPP、ジメチルアリルピロリン酸、又は他のプレニル基に対しては適当でない結合ポケットを探すことによって改良された。配列番号12から配列番号33は、DELTA BLAST検索で位置を決定した真菌及び細菌由来の細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素に関する一次構造アミノ酸残基配列を提供する。アサゲノムのDELTA BLAST検索も行われ、膜結合性プレニルトランスフェラーゼ酵素は、これらの検索で位置を決定された。一部のアサの膜結合性プレニルトランスフェラーゼ酵素は、酵母の一部の種ではほとんど発現せず、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを調製するために本発明において提供される酵母株へと導入されない。

【0086】

配列番号33から配列番号36は、手作業による文献検索で位置を決定された真菌及び細菌由来の細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素に関する一次構造アミノ酸残基配列を提供する。配列番号33から配列番号36は、それぞれ、FNQ26、FNQ28、FUR7、及びNAPT9という名称の細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素に関する一次構造アミノ酸残基配列である。

【0087】

配列番号11から配列番号36のいずれかは、細胞質性プレニルトランスフェラーゼとして本発明において提供される酵母株に適用され得る。これらのプレニルトランスフェラーゼのそれぞれをTable 1(表1)にまとめる。

【0088】

【表 1 A】

配列番号	コメント
11	640387779 ATEG_00821 推定されるタンパク質[アスペルギルス・テレウス(<i>Aspergillus terreus</i>)]
12	2515835839 B100DRAFT_06502 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]
13	2516097927 B121DRAFT_00516 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]
14	2516101115 B121DRAFT_03712 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]
15	2516101748 B121DRAFT_04345 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]
16	2516099186 B121DRAFT_01777 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]
17	2516104298 B121DRAFT_06901 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]
18	2585297016 EW57DRAFT_01164 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB [ストレプトマイセス・アトラタス(<i>Streptomyces atratus</i>)]
19	2585373487 推定プレニルトランスフェラーゼ[ストレプトマイセス・シンナモネンシス(<i>Streptomyces cinnamonensis</i>)]
20	2585373644 芳香族プレニルトランスフェラーゼ[ストレプトマイセス・イアキラス(<i>Streptomyces iakyrus</i>)]
21	2585378108 ABBA プレニルトランスフェラーゼ Ptf_St [ストレプトマイセス・テンダエ(<i>Streptomyces tendae</i>)]
22	2585708813 JD81DRAFT_01144 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB [ミクロモノスポラ・サガミエンシス(<i>Micromonospora sagamiensis</i>)]
23	2516111586 B105DRAFT_07016 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]
24	2517160389 SacsadRAFT_00895 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [サッカロモノスポラ・サリフィラ(<i>Saccharomonospora saliphila</i>)]
25	2521683528 H294DRAFT_07929 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]

10

20

30

40

【表 1 B】

26	2521683684 H294DRAFT_08085 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]	
27	2524586714 H299DRAFT_04355 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]	
28	2528491298 I003DRAFT_05612 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB. [ストレプトマイセス種 CL190]	10
29	2585378750 SPLIT WT5.12c [ストレプトマイセス種 WT5 : JN402323]	
30	2585373485 SPLIT 推定プレニルトランスフェラーゼ[ストレプトマイセス・シンナモネンシスの DSM 1042 : AM384985]	
31	2552198934 SPLIT 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB [ノカルディア・コンカバ(Nocardia concava)の NBRC 100430 : NoneDRAFT_BAFX01000066_1.66]	
32	2521987056 SPLIT 芳香族プレニルトランスフェラーゼ NphB [ミクソコッカス・ステイピタータス(Myxococcus stipitatus)の DSM 14675 : CP004025]	20
33	ストレプトマイセス・シンナモネンシス由来の FNQ26	
34	S.シンナモネンシス由来の FNQ28	
35	ストレプトマイセス種(株 KO-3988)由来の FUR7	
36	ストレプトマイセス・アクレオラタス(Streptomyces aculeolatus)由来の NAPT9	30

Table 1:プレニルトランスフェラーゼ

【 0 0 9 0 】

DiPKSの改変

DiPKSは、C-Metの活性を低減又は消失させるために改変されてもよい。

【 0 0 9 1 】

配列番号37は、DiPKSが、C-metドメインの活性を一緒に破壊するGly1516Asp置換及びGly1518Ala置換を含む酵母に対してコドン最適化されるDiPKSに対する合成配列の改変形態である。S.セレピシエ培養におけるDiPKS^{G1516D}、^{G1518A}発現の結果は、株HB80Aを含む実施例IVに関連して以下に提供される。他の改変は、C-Metの活性部位全体又はC-Metのすべてを破壊するか又は消失させるために、DiPKSへと導入されてもよい。これらの改変DiPKS酵素のそれぞれは、野生型DiPKSについて説明したように、S.セレピシエへと導入されてもよい。

【 0 0 9 2 】

配列番号38は、DiPKSが、C-metドメインの活性を破壊するGly1516Arg置換を含む酵母に対してコドン最適化されるDiPKSに対する合成配列の改変形態である。S.セレピシエ培養におけるDiPKS^{G1516R}発現の結果は、株HB135を含む実施例VIII及び株HB135、HB137及びHB138を含む実施例IXに関連して以下に提供される。

10

20

30

40

50

【0093】

具体的には、DiPKS^{G1516D, G1518A}及びDiPKS^{G1516R}に加えて、以下の他の改変が、C-Metの活性部位全体又はC-Metのすべてを破壊するか又は消失させるために、DiPKSへと導入されてもよい:(a)GGGSGGGSGを有するモチーフ1の置換、(b)モチーフ1におけるGly1516Arg置換及びGGGSGGGSGを有するモチーフ2の置換、(c)モチーフ3のちょうど外側にあり、C-Metドメインの活性部位における三次構造を破壊するGlu1634Ala、並びに(d)His1608Gln置換によるC-Metドメインの活性部位の破壊。(a)から(d)のそれぞれについてコドン最適化された配列が、発現プラスミド上で酵母へと導入され、DiPKS^{G1516D, G1518A}及びDiPKS^{G1516R}の発現に対しても同様に、基本株HB100へと導入された。それぞれの場合に、オリペトールは観察されなかった。GGGSGGGSGを有するモチーフ1又はモチーフ2のいずれの置換によっても、同様に、メチル-オリペトールの生成は消失した。DiPKS^{G1634A}変異体を発現する酵母の培養によって、一例のバッチで培養物1l当たり2.67mgのメチル-オリペトールが得られた。DiPKS^{H1608N}変異体を発現する酵母の培養では、一例のバッチで培養物1l当たり3.19mgのメチル-オリペトールが得られた。

10

【0094】

酵母細胞の形質転換及び増殖

実行された方法の具体例及びこの記載に従って生成された酵母細胞の詳細を以下の実施例IからXとして提供する。これら10個の具体例のそれぞれでは、プラスミドの構築、酵母の形質転換、株増殖の定量、及び細胞内代謝物の定量に対して同様のアプローチを適用した。10個の例に共通の特徴、続いて、10個の例のうちの1つ又は複数に関連する結果及び他の詳細を以下に記載する。

20

【0095】

プラスミドの構築

本発明において提供される方法及び酵母細胞の例を適用及び調製するためにアSEMBLしたプラスミドをTable 2(表2)に示す。Table 2(表2)では、発現プラスミドpYES、及びpYES2について、配列番号39及び40は、それぞれ、発現カセットを有さないプラスミド全体を提供する。配列番号10、37、38、及び41から47の発現カセットは、Table 2(表2)に示されるプラスミドを調製するために含まれ得る。配列番号4は、PDHバイパス遺伝子に対するカセットを含むpGREGプラスミドである。

【0096】

30

【表 2 A】

プラスミド	カセット	説明	
pYES	(なし)	LEU 栄養要求株;アンピシリン耐性;配列番号 39	
pYES2	(なし)	URA 栄養要求株;アンピシリン耐性;配列番号 40	
pPDH	配列番号 4 から の塩基 1 から 7214	以下のような組み込み部位相同配列に隣接する pGREG 505/G418 においてアセンブルされたアセトアル デヒドデヒドロゲナーゼ(Ald6)及びアセチル-CoA シ ンターゼ(Acs^{L641P})に対する PDH バイパス遺伝子を有 する高複製増幅プラスミド: C1-506-BclV-部位 19 の上流領域-L0 L0-TDH3 _P -L1- Ald6 -L2-Adh1 _T -LTP1 LTP1-Tef1 _P -L3- Acs^{L641P} -L4-Prm9 _T -LTP2 LTP2-部位 19 の下流領域-C6-506	10
pNPGa	配列番号 10	LV3-Tef1 _P -L1- NpgA -L2-Prm9 _T -LV5 を有する pYES2 に おける高複製 NpgA 発現プラスミド	20
pDiPKSm1	配列番号 37	LV3-Gal1-L1- DiPKS^{G1516D; G1518A} -L2-Prm9 _T -LV5 を有す る pYES2 における高複製 DiPKS^{G1516D; G1518A} 発現プ ラスミド	
pDiPKSm2	配列番号 38	LV3-Gal1-L1- DiPKS^{G1516R} -L2-Prm9 _T -LV5 を有する pYES2 における高複製 DiPKS^{G1516R} 発現プラスミド	
pGFP	配列番号 41	LV3-Tef1 _P - GFP -Cyc _T -LV5 を有する pYES2 における高 複製 GFP 発現プラスミド	30
pPTGFP	配列番号 42	LV3-Tef1 _P - CS.PT_GFP -Cyc _T -LV5 を有する pYES2 に おける GFP と融合した高複製のアサのプレニルト ランスフェラーゼ発現プラスミド	
pAPTGFP	配列番号 43	LV3-Tef1 _P - APT_GFP -Cyc _T -LV5 を有する pYES2 にお ける GFP と融合した高複製の AltPT 発現プラスミド	
pAltPT	配列番号 44	LV3-PMA1 _P -L1- AltPT -L2-Eno2 _T -LV5 を有する pYES に おける高複製 AltPT 発現プラスミド	40
pH1OAS	配列番号 45	LV3-TDH3 _P -L1- Hex1 -L2-Adh1 _T -LTP1 TP1-Tef1 _P -L3- OAS -L4-Prm9 _T -LV5 を有する pYES2 における高複製 Hex1 及び OAS 発現プラスミド	

【表 2 B】

pDiPKS	配列番号 46	LV3-Gal1-L1-DiPKS-L2-Prm9 _T -LV5 を有する pYES2 における高複製 DiPKS 発現プラスミド
pCRISPR	配列番号 47	LV3-Tef1 _p -Cas9-Adh1 _T -LTP1 LTP1-gRNA-LV5 を有する pYES2 における高複製 Cas9 エンドヌクレアーゼ及び標的化 gRNA 発現プラスミド

10

Table 2: 酵母株を調製するために使用されるプラスミド及びカセット

【0098】

S. セレビスエへと導入するためのプラスミドを、Operon Eurofins and Phusion HF polymerase(ThermoFisher F-530S)からのプライマーを用い、Eppendorf Mastercycler ep Gradient 5341を使用して、製造業者の推奨するプロトコールに従って、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)によって増幅させた。

【0099】

すべてのプラスミドは、重複するDNA部分とS. セレビスエにおける形質転換支援組換え(transformation assisted recombination)を使用してアセンブルした。プラスミドを、Gietz, R. D.及びSchiestl, R. H.、「High-efficiency yeast transformation using LiAc/SS carrier DNA/PEG method.」Nat. Protoc. 2, 31~34(2007)に記載される酢酸リチウムヒートショック方法を使用してS. セレビスエへと形質転換した。プラスミドをアセンブルするために使用した基本酵母株をTable 3(表3)に示す。

20

【0100】

【表 3】

株	バックグラウンド	改変	コメント
HB24	-LEU	なし	プラスミドをアセンブルするために使用されるロイシン栄養要求性を有する改変されていない酵母
HB25	-URA	なし	プラスミドをアセンブルするために使用されるウラシル栄養要求性を有する改変されていない酵母

30

Table 3: 基本酵母株

40

【0101】

pAltPTプラスミドをHB24ロイシン栄養要求株においてアセンブルした。pNPGA、pDiPKSm1、pDiPKSm2、pGFP、pPTGFP、pAPTGFP、pH10AS、pDiPKS、pCRISPR、及びpPDH プラスミドをHB25ウラシル栄養要求株においてアセンブルした。形質転換S. セレビスエ細胞を、寒天ペトリ皿における栄養要求性選択によって選択した。ペトリ皿から回収したコロニーを、250RPMで振盪させながら、30℃で16時間、液体選択培地中で増殖させた。

【0102】

液体選択培地中で増殖させた後、形質転換S. セレビスエ細胞を採取し、プラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドDNAを大腸菌(Escherichia coli)へと形質転換した。形

50

質転換大腸菌は、アンピシリンを含む寒天ペトリ皿で増殖させることによって選択した。大腸菌を、プラスミドを増幅させるために培養した。大腸菌中で増殖したプラスミドを抽出し、正確な構成を確認するためにサンガーのジデオキシシークエンシングを用いてシークエンシングした。次いで、シークエンスを確認したプラスミドを、S.セレピシエのゲノム改変又は安定した形質転換のために使用した。

【0103】

S.セレピシエのゲノム改変

本明細書に記載のS.セレピシエ株は、プラスミドの安定した形質転換又はゲノム改変によって調製されてもよい。ゲノム改変は、例えば、CRISPRを活用する方法によって、相同性組換えを介して遂行されてもよい。

10

【0104】

CRISPRを適用する方法を、S.セレピシエゲノムからDNAを欠失させ、異種DNAをS.セレピシエゲノムへと導入するために適用した。Cas9エンドヌクレアーゼをS.セレピシエゲノムの所望の位置へと標的化するためのガイドRNA(「gRNA」)配列は、BenchlingオンラインDNA編集ソフトウェアを用いて設計した。オーバーラップエクステンション(「SOEing」)及びPCRによるDNAプライミングを適用して、gRNA配列をアSEMBルし、機能的gRNAカセットを含むDNA配列を増幅させた。

【0105】

機能的gRNAカセット、Cas9-発現遺伝子カセット、及びpYes2(URA)プラスミドをpCRISPRプラスミドへとアSEMBルして、標的化DNA二本鎖切断を容易にするためにS.セレピシエへと形質転換した。生じたDNA切断を、標的DNAの直鎖状断片の付加によって修復した。

20

【0106】

配列番号3に示されるErg20^{K197E}タンパク質に関するCDSを、相同性組換えによってHB13のゲノムへと組み込み、HB42基本株を得た。

【0107】

配列番号4の塩基51から7114を、CRISPRによってHB42株へと組み込み、S.セレピシエのPDHバイパス遺伝子を有するHB82基本株を得た。pPDHプラスミドは、S.セレピシエにおけるアSEMBリー後に確認した配列であった。シークエンスを確認したpPDHプラスミドを、大腸菌内で増殖させ、精製して、BciV1制限酵素で消化した。Table 2(表2)におけるように、BciV1による消化によって、Ald6及びSeAcs^{L641P}に対する遺伝子、プロモーター、ターミネーター、及びCas9によるPDH-部位19におけるS.セレピシエゲノムへの組み込みのための組み込み部位相同配列を含むポリヌクレオチドが得られた。得られた直鎖状PDHバイパスターポリヌクレオチドを、配列番号4の塩基51から7114に示されるように、ゲル分離によって精製した。

30

【0108】

単一のPDHバイパスターポリヌクレオチドに関する両方のPDHバイパス遺伝子(Ald6及びAcs^{L641P})と共に、PDHバイパスターポリヌクレオチドを、pCRISPRにより、S.セレピシエへと同時形質転換した。形質転換は、Gietzに記載されている酢酸リチウムヒートショック方法によるものであった。pCRISPRプラスミドはCas9を発現し、gRNA分子によって、S.セレピシエゲノムの選択された位置へと標的化される。この位置において、Cas9タンパク質によって、DNAの二重鎖切断が生じる。PDHバイパスターポリヌクレオチドを、CRISPR反応におけるドナーポリヌクレオチドとして使用した。Ald6、Acs^{L641P}、プロモーター、及びターミネーターを含むPDHバイパスターポリヌクレオチドを、相同性組換えによって、切断部位である部位19においてゲノムへと組み込み、株HB82を得た。

40

【0109】

配列番号10に示されるNpgAドナーポリヌクレオチドを調製し、増幅させた。DNA SOEingを使用して、NpgA組み込みのために、3つのポリヌクレオチドから単一のドナーDNA断片を作出した。第1のポリヌクレオチドは、ドナーの特定位置におけるゲノムへの組み込みを可能とするゲノム相同性の5'領域であった。第2のポリヌクレオチドは、NpgA遺伝子カセットをコードしていた。NpgA遺伝子カセットは、Tef1プロモーター、NpgAコード配列及び

50

Prm9ターミネーターを含む。第3のポリヌクレオチドは、*S. セレビシエ*ゲノムへの標的化組み込みを容易にするゲノム相同性に対する3'領域を含んだ。

【0110】

NpgAドナーポリヌクレオチドを、pCRISPRプラスミドを用いて、株HB82へと同時形質転換した。pCRISPRプラスミドが発現し、エンドヌクレアーゼCas9を、gRNA分子によって、*S. セレビシエ*ゲノムのある位置へと標的化した。この位置で、Cas9タンパク質によって、DNAの二重鎖切断が生じ、NpgAドナーポリヌクレオチドを、相同性組換えによって、切断したゲノムへと組み込み、HB100基本株を得た。

【0111】

配列番号8に示されるMaf1ドナーポリヌクレオチドを調製し、増幅させた。DNAのSOEingを使用して、Maf1組み込みのために、3つのポリヌクレオチドから単一のドナーDNA断片を作成した。第1のポリヌクレオチドは、ドナーの特定位置におけるゲノムへの組み込みを可能とするゲノム相同性の5'領域であった。第2のポリヌクレオチドは、Maf1遺伝子カセットをコードしていた。Maf1遺伝子カセットは、Tef1プロモーター、Maf1コード配列及びPrm9ターミネーターを含む。第3のポリヌクレオチドは、*S. セレビシエ*ゲノムへの標的化組み込みを容易にするゲノム相同性に対する3'領域を含んだ。

10

【0112】

Maf1ドナーポリヌクレオチドを、pCRISPRプラスミドを用いて、HB100株へと同時形質転換した。pCRISPRプラスミドが発現し、エンドヌクレアーゼCas9を、gRNA分子によって、*S. セレビシエ*ゲノムのある位置へと標的化した。この位置で、Cas9タンパク質によって、DNAの二重鎖切断が生じ、Maf1ドナーポリヌクレオチドを、相同性組換えによって、切断したゲノムへと組み込むことができる。Maf1ドナーポリヌクレオチドのHB100株への安定した形質転換により、HB106基本株が得られる。

20

【0113】

配列番号6に示されるAcc1-PGK1pドナーポリヌクレオチドを調製し、増幅させた。DNAのSOEingを使用して、Acc1-PGK1p組み込みのために、3つのポリヌクレオチドから単一のドナーDNA断片を作成した。第1のポリヌクレオチドは、ドナーの特定位置におけるゲノムへの組み込みを可能とするゲノム相同性の5'領域であった。第2のポリヌクレオチドは、PGK1プロモーター領域をコードしていた。第3のポリヌクレオチドは、*S. セレビシエ*ゲノムへの標的化組み込みを容易にするゲノム相同性に対する3'領域を含んだ。

30

【0114】

Acc1-PGK1ドナーポリヌクレオチドを、pCRISPRプラスミドを用いて同時形質転換した。pCRISPRプラスミドが発現し、エンドヌクレアーゼCas9を、gRNA分子によって、*S. セレビシエ*ゲノムのある位置へと標的化した。この位置で、Cas9タンパク質によって、DNAの二重鎖切断が生じ、Acc1-PGK1ドナーポリヌクレオチドを、相同性組換えによって、切断したゲノムへと組み込んだ。HB100株へのドナーポリヌクレオチドの安定した形質転換によって、PGK1プロモーターの調節下にあるAcc1を有するHB110基本株が得られる。

【0115】

Table 4(表4)は、*S. セレビシエ*の遺伝子改変によって調製された基本株についてのまとめを提供する。Table 4(表4)に示される各基本株は、ロイシン及びウラシル栄養要求株であり、これらはいずれもプラスミドを含まない。

40

【0116】

【表 4】

株	変更	組み込み
HB42	Erg20 ^{K197E}	配列番号 3
HB82	Erg20 ^{K197E} 、PDH バイパス	配列番号 3、4
HB100	Erg20 ^{K197E} 、PDH バイパス、NPGa(部位 14)	配列番号 3、4、10
HB106	Erg20 ^{K197E} 、PDH バイパス、NPGa(部位 14)、Maf1(部位 5)	配列番号 3、4、10、8
HB110	Erg20 ^{K197E} 、PDH バイパス、NPGa(部位 14)、Maf1(部位 5)、PGK1 ^P で置き換えられた Acc1 プロモーター	配列番号 3、4、10、8、6

10

Table 4: タンパク質発現を確認するため及び植物性カンナビノイド生成のために調製された基本の形質転換株

【0117】

20

株の構築のための安定した形質転換

Gietzによって記載されている酢酸リチウムヒートショック方法を使用して、プラスミドをS.セレビスエへと形質転換した。

【0118】

トランスジェニックS.セレビスエ株HB1、HB6、及びHB7を、Table 2(表2)からのプラスミドをTable 5(表5)において以下に示すHB25へと導入することによって、HB25基本株から調製した。株HB1、HB6、及びHB7を、S.セレビスエにおけるアサのプレニルトランスフェラーゼ及びAltPTのタンパク質発現レベルを比較するために使用した。

【0119】

【表 5】

30

株	基本株	プラスミド
HB1	HB25	pGFP
HB6	HB25	pPTGFP
HB7	HB25	pAPTGFP
HB13	HB25	pEV

40

Table 5: タンパク質発現を確認するため及び植物性カンナビノイド生成のために調製した発現プラスミドを含む形質転換酵母株

【0120】

Table 6(表6)において以下に示すように、トランスジェニックS.セレビスエHB80、HB80A、HB98、HB102、HB135、HB137及びHB138を発現プラスミドによるHB42の形質転換によって、HB42、HB100、HB106及びHB110基本株から調製し、HB80AをHB80の形質転換によって調

50

製した。HB80、HB98及びHB102はそれぞれ、DiPKSを含み、発現する。HB80Aは、DiPKS^{G1516D;G1518A}を含み、発現する。HB135、HB137及びHB138はそれぞれ、DiPKS^{G1516R}を含み、発現する。HB98は、プラスミド由来のDiPKS及びNPGaを含み、発現する。

【 0 1 2 1 】

【表 6】

株	基本株	プラスミド
HB80	HB42	pDiPKS
HB80A	HB80	pDIPKSm1
HB98	HB42	pDiPKS pNPGa
HB102	HB100	pDIPKS
HB135	HB100	pDIPKSm2
HB137	HB106	pDIPKSm2
HB138	HB110	pDIPKSm2

10

20

Table 6:ポリケチドシンターゼを発現するプラスミドを含む株

【 0 1 2 2 】

トランスジェニックS.セレピシエHB37、HB84、HB88、HB90、HB105及びHB130をTable 7(表7)において以下に示す発現プラスミドによる基本株の形質転換によって、Table 7(表7)に示す基本株から調製した。HB37及びHB88はそれぞれ、AltPT及びOASを含み、発現する。HB80、HB90及びHB105はそれぞれ、AltPT及びDiPKSを含み、発現する。HB139は、AltPT及びDiPKS^{G1516R}を含み、発現する。

30

【 0 1 2 3 】

【表7】

株	基本株	プラスミド1	プラスミド2
HB37	HB42	pAltPT	pH1OAS
HB84	HB42	pAltPT	pDiPKS
HB88	HB82	pAltPT	pH1OAS
HB90	HB82	pAltPT	pDiPKS
HB105	HB100	pAltPT	pDIPKS
HB139	HB106	pAltPT	pDIPKSm2

Table 7:細胞質性プレニルトランスフェラーゼを発現するプラスミドを含む株

10

【0124】

20

酵母の増殖及び栄養摂取条件

酵母培養物を選択培地による終夜の培養で増殖させ、種菌を得た。次いで、得られた種菌を使用して、三連で50mlの培養物を接種し、600nmで0.1の吸光度(「A600」)を有する光学密度とした。Table 8(表8)は、各株を増殖させるために使用した培地の詳細を示す。

【0125】

【表8】

株	増殖培地
HB13-HA	YNB+2%のグルコース+1.6g/L 4DO*+0.5mM のヘキサン酸
HB13-No	YNB+2%のラフィノース+2%ガラクトース+1.6g/L 4DO*
HB37-HA	YNB+2%のグルコース+1.6g/L 4DO*+0.5mM のヘキサン酸
HB84-No	YNB+2%のラフィノース+2%ガラクトース+1.6g/L 4DO*

30

Table 8:酵母に対して使用される増殖培地

40

【0126】

Table 8(表8)では、「4DO*」は、ロイシン及びウラシルを欠く、酵母の合成ドロップアウト培地補充物を指す。株HB13に関して、「HB13-HA」は、0.5mMのヘキサン酸の存在下で増殖したHB13を指し、「HB13-No」は、ヘキサン酸の非存在下で増殖したHB13を指す。Table 8(表8)では、「YNB」は、Table 9(表9)の最初の2列側に列挙した化学物質を含む栄養ブロスである。Table 9(表9)の3及び4番目の列に列挙した化学物質は、4DO*補充物に含まれる。

【0127】

【表 9】

YNB		4DO*	
化学物質	濃度	化学物質	濃度
硫酸アンモニウム	5 g/L	アデニン	18 mg/L
ビオチン	2 µg/L	p-アミノ安息香酸	8 mg/L
パントテン酸カルシウム	400 µg/L	アラニン	76 mg/ml
ヨウ酸	2 µg/L	アルギニン	76 mg/ml
イノシトール	2 mg/L	アスパラギン	76 mg/ml
ニコチン酸	400 µg/L	アスパラギン酸	76 mg/ml
p-アミノ安息香酸	200 µg/L	システイン	76 mg/ml
ピリドキシン HCl	400 µg/L	グルタミン酸	76 mg/ml
リボフラビン	200 µg/L	グルタミン	76 mg/ml
チアミン HCl	400 µg/L	グリシン	76 mg/ml
クエン酸	0.1 g/L	ヒスチジン	76 mg/ml
ホウ酸	500 µg/L	ミオ-イノシトール	76 mg/ml
硫酸銅	40 µg/L	イソロイシン	76 mg/ml
ヨウ化カリウム	100 µg/L	リシン	76 mg/ml
塩化第二鉄	200 µg/L	メチオニン	76 mg/ml
硫酸マグネシウム	400 µg/L	フェニルアラニン	76 mg/ml
モリブデン酸ナトリウム	200 µg/L	プロリン	76 mg/ml
硫酸亜鉛	400 µg/L	セリン	76 mg/ml
第一リン酸カリウム	1.0 g/L	トレオニン	76 mg/ml
硫酸マグネシウム	0.5 g/L	トリプトファン	76 mg/ml
塩化ナトリウム	0.1 g/L	チロシン	76 mg/ml
塩化カルシウム	0.1 g/L	バリン	76 mg/ml

Table 9: YNB 栄養ブロス及び 4DO* 補充物

細胞内代謝物を、メタノール抽出を使用して、*S.セレピシエ*細胞から抽出した。1mLの液体培養物を12,000 × gで3分間スピンドウンした。250 μLの得られた上清を細胞内代謝物の定量に使用した。得られた細胞ペレットを、200 μLの80%メタノール(-40)中に懸濁させた。混合物をボルテックスし、氷上で10分間冷やした。氷上で10分間冷やした後、混合物を、4 にて、15,000 × gで14分間スピンドウンした。得られた上清を採取した。更に200 μLの80%メタノール(-40)を細胞デブリペレットに添加し、混合物を氷上で10分間冷やした。氷上で10分間冷やした後、混合物を、4 にて、15,000 × gで14分間スピンドウンした。得られた200 μLの上清を、前もって採取した200 μLの上清に添加し、合計400 μLの、細胞内代謝物を含む80%メタノールを得た。

【 0 1 2 9 】

細胞内代謝物は、高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)及び質量分析(「MS」)方法を使用して定量した。Agilent 1260オートサンプラー及びThermoFinnigan LTQ質量分析計に接続したHPLCシステムを使用した。HPLCシステムは、Zorbax Eclipse C18 2.1 μm × 5.6mm × 100mmのカラムを備えていた。

【 0 1 3 0 】

代謝物を、オートサンプラーを使用して、10 μLのサンプル中に注入し、1ml/分の流速で使用するHPLCにおいて分離した。HPLC分離プロトコールは、(a)98%の溶媒A及び2%の溶媒Bの0 ~ 2分;(b)98%の溶媒Bとなるまでの2 ~ 15分;(c)98%の溶媒Bで15 ~ 16.5分;(d)98%の溶媒Aとなるまでの16.5 ~ 17.5分;及び(e)98%の溶媒Aで最終の2.5分の平衡の合計20分であった。溶媒Aは、MS水中アセトニトリル+0.1%のギ酸であり、溶媒Bは、MS水中0.1%のギ酸であった。

【 0 1 3 1 】

HPLCによる分離後、エレクトロスプレーイオン化によってサンプルを質量分析計へと注入し、ポジティブモードで分析した。キャピラリー温度は380 に保った。チューブレンズ電圧は30Vであり、キャピラリー電圧は0Vであり、スプレー電圧は5kVであった。HPLC-MS/MS後、CBGを、317.2を親イオンとして、193.1を娘イオンとして分析し、一方、meCBGを、331.2を親イオンとして分析した。同様に、HPLC-MS/MS後、オリベトールを、181.2を親イオンとして、111を娘イオンとして分析し、一方、メチル-オリベトールを、193.2を親イオンとして、125を娘イオンとして分析した。

【 0 1 3 2 】

様々な濃度の公知の標準物質を注入して、線形標準曲線を作成した。CBG及びmeCBGの標準物質は、Toronto Research Chemicalsから購入した。meCBGは、Toronto Research Chemicalsが標準物質を注文される前にその化学物質を合成したことがなかったため、リクエストして特注で調製された。オリベトール及びメチル-オリベトールの標準物質は、Sigma Aldrichから購入した。

【 0 1 3 3 】

S.セレピシエの増殖に関するヘキサンの作用

ヘキサン酸の生合成に必要とされる酵素をコードする遺伝子は、*S.セレピシエ*へと導入されなかった。代わりに、HB37等のOAS遺伝子を含む酵母細胞において、ヘキサン酸が増殖培地中に含まれた。

【 0 1 3 4 】

図12は、*S.セレピシエ*の増殖に関するヘキサン酸補充の作用を示す。HB13を、YNB+2%のグルコース+1.6g/Lの4DO*+0.5mMのヘキサン酸中で培養した。ヘキサン酸を、培養の36時間目に添加した。ヘキサン酸を添加して、0、0.5、1.0及び3.0mMの濃度の培養サンプルを分離した。ヘキサン酸は、*S.セレピシエ*に対して毒性である。ヘキサン酸の存在下では、増殖の減少が観察された。*S.セレピシエ*増殖の減少の大きさは、増殖培地におけるヘキサン酸の濃度に対応する。培養懸濁物のA₆₀₀値によって増殖速度が定量され、図12において0、0.5、1.0及び3.0mMのヘキサン酸濃度において示されている。

【 0 1 3 5 】

0.5mMのヘキサン酸の存在下では、HB13及びHB37は96時間増殖し、24時間、36時間、48

10

20

30

40

50

時間、60、72時間、84時間及び96時間の時点で試料を採取した。ヘキサノ酸の非存在下では、HB13及びHB84が増殖し、72時間目の単一の時点で採取した。HB13を両方の実験の対照として使用した。増殖培地は、Table 8(表8)及びTable 9(表9)に関連して上述されている。

【 0 1 3 6 】

【 表 1 0 】

時点	HB13-HA	HB13-No	HB37-HA	HB84-No
24 時間	5.33	(データなし)	3.33	(データなし)
36 時間	5.80	(データなし)	3.43	(データなし)
48 時間	4.67	(データなし)	3.33	(データなし)
60 時間	6.07	(データなし)	3.53	(データなし)
72 時間	8.96	10.7	4.48	6.9
84 時間	7.23	(データなし)	4.13	(データなし)
96 時間	8.28	(データなし)	4.33	(データなし)

Table 10:HB13 及び HB37(0.5mM のヘキサノ酸)並びに HB13 及び HB84(ヘキサノ酸なし)の増殖

【 0 1 3 7 】

Table 10(表10)に示されるように、HB84はHB37よりも増殖した。更に、HB84は、meCBGを生成するのにヘキサノ酸を必要とせず、一方、HB37は、CBGを生成するのにヘキサノ酸を必要とする。同様に、HB13は、0.5mMのヘキサノ酸の存在と比較して、ヘキサノ酸の非存在下で、72時間目により良好な増殖を示し、図12に示されるデータと一致した。

【 0 1 3 8 】

図13から図15はそれぞれ、Table 10(表10)に列挙したHB37培養物の A_{600} 値を示す(三角形のデータ点を有する破線)。更に、図13から図15はそれぞれ、円のデータ点を有する実線で、別のデータ系列を示す。

【 0 1 3 9 】

図13は、円のデータ点を有する実線で、オリベトール生成(培養培地1L当たりのオリベトールの μg)を示す。

【 0 1 4 0 】

図14は、円のデータ点を有する実線で、CBG生成(培養培地1L当たりのCBGの μg)を示す。

【 0 1 4 1 】

図15は、円のデータ点を有する実線で、培養物中に存在するヘキサノ酸(培養培地1L当たりのヘキサノ酸の mg)を示す。

【 0 1 4 2 】

まとめると、図13から図15は、50から60時間の間に起こるジオキシシフト(dioxic shift)と一致する。ジオキシシフトは、グルコース異化から酢酸及びエタノール異化までの代謝シフトを含む。ジオキシシフトに関して、多くの二次的代謝経路がより活

性となり、AltPT及びOASの活性も同様に増加する。

【0143】

図12から図15及びTable 10(表10)は、ヘキササン酸レベルが、50から60時間の間に下降し、次いで下降し続けるまでの、植物性カンナビノイドを生成するためのヘキササン酸の消費によって、いかなる程度にも軽減されたと考えられないヘキササン酸の毒性と一致したデータを示す。図12及び図13に示されるように、オリベトール及びCBGは、ヘキササン酸の導入から始まって、生成されていた。しかし、CBGが生成され、ヘキササン酸がオリベトールに変換された一方で、培養物の A_{600} は、オリベトール及びCBGが生成されたように急激には増加しなかった。 A_{600} は、図15に示されるように、ヘキササン酸が、50から60時間の間に枯渇され始めた後にのみ増加した。枯渇は、オリベトール生成の少なくとも部分的な結果である。しかし、培養物の A_{600} における有意な増加は、オリベトール及びCBGの生成中及びその後の36時間目におけるヘキササン酸の導入においても、ヘキササン酸濃度が枯渇するまで観察されなかった。

10

【0144】

細胞質性及び膜結合性プレニルトランスフェラーゼの発現

アサのプレニルトランスフェラーゼは、膜結合性の植物タンパク質であり、一方、AltPTは、細胞質性の細菌タンパク質である。アサのプレニルトランスフェラーゼよりもS.セレピシエのAltPTの適用によって、酵母細胞におけるよりレベルの高いタンパク質発現がもたらされる。Table 5(表5)に示されるようにHB1、HB6、HB7、及びHB13のそれぞれを、YNB、2%のグルコース、及び1.6g/Lの4D0*中で終夜増殖させた。終夜増殖させた後、得られた培養物を1.0の A_{600} に正規化し、次いで、YNB、2%のグルコース、及び1.6g/Lの4D0*中で4時間増殖させた。BD Acuri C6フローサイトメーターを使用して、各培養懸濁物から蛍光度を測定した。

20

【0145】

HB1は緑色蛍光タンパク質(「GFP」)を発現する。HB6及びHB7のそれぞれは、GFP-プレニルトランスフェラーゼ融合タンパク質を発現する。HB6もHB7もpDiPKS又はpH10ASプラスミド由来の遺伝子を含まない。それと対応して、HB6もHB7もポリケチドシンターゼ遺伝子が発現しないか又は図4、図6、又は図9のいずれかの生合成経路を完成させるための酵素のすべては含んでいない。

30

【0146】

図16は、HB13(「ネガティブ」)、HB1(「ポジティブ」)、HB6(「プレニルトランスフェラーゼ_アサ」)、及びHB7(「プレニルトランスフェラーゼ_Alt」)の細胞培養物サンプルからの平均蛍光レベルを示す。蛍光レベルはタンパク質発現レベルに対応し、HB6によるアサのプレニルトランスフェラーゼの相対的発現レベルとHB7によるAltPTの相対的発現レベルを示す。通常の膜結合性のアサのプレニルトランスフェラーゼは、S.セレピシエの細胞質における発現が低レベルである。細胞質のAltPTは、通常の膜結合性のアサのプレニルトランスフェラーゼよりも高いレベルで、S.セレピシエの細胞質で発現される。

【実施例】

【0147】

(実施例I)

Table 7(表7)において上述されている酵母株HB37を、YNB+2%のグルコース+1.6g/Lの4D0*+0.5mMのヘキササン酸培地中で培養した。グルコース及びヘキササン酸からのCBGの生成が観察され、酵母におけるCBGの直接的生成を実証した。

40

【0148】

CBGを0.85mMのヘキササン酸を含む10 µg/Lの濃度で生成した。ヘキササン酸の供給及び増殖条件を最適化した後、50 µg/LのCBGを0.5mMのヘキササン酸を用いて生成した。

【0149】

(実施例II)

Table 7(表7)において上述されている酵母株HB84を、YNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。ラフィノース及びガラクトースからのmeCBGの

50

生成が観察され、ヘキサノ酸を用いない、酵母におけるmeCBGの直接的生成を実証した。meCBGを42.63mg/Lで生成した。HB84によって生成されたmeCBGの収率は、HB37からのCBGの収率と比較して、ほぼ1,000倍の増加を表す。

【0150】

図17は、実施例IのHB37からのCBG(「CBG_C_sativa」)の収率と比較した実施例IIのHB84からのmeCBG(「HB_CBG_me」)の収率を示す。

【0151】

(実施例III)

Table 6(表6)において上述されている酵母株HB80を、YNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。ラフィノース及びガラクトースからのメチル-オリベトールの生成を観察し、HB80がAltPTを欠いているため、meCBGへの変換なしでの、酵母におけるメチル-オリベトールの直接的生成を実証した。メチル-オリベトールを3.259mg/Lの濃度で生成した。meCBGへの変換は、HB80及びAltPT又はHB139等の別のプレニルトランスフェラーゼの特徴を含む株において続くことが期待される。

【0152】

(実施例IV)

Table 6(表6)において上述されている酵母株HB80Aを、YNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。DiPKS^{G1516D; G1518A}によって触媒されるラフィノース及びガラクトースからのオリベトールとメチル-オリベトール両方の生成が観察された。このデータは、ヘキサノ酸を含まない場合の、酵母におけるオリベトールとメチル-オリベトール両方の直接的生成を実証する。HB80AはAltPTを欠くため、CBG及びmeCBGへの変換は続かなかった。CBG及びmeCBGへの変換は、pAltPTによってHB80Aを形質転換すること等によって、HB80A及びAltPT又は別のプレニルトランスフェラーゼの特徴を含んだ株で続くことが期待される。

【0153】

図18は、実施例IIIからのHB80によって生成されたメチル-オリベトール(「メチル_オリベトール HB80」)、並びにHB80Aによって生成されたオリベトール及びメチル-オリベトール(それぞれ、「メチル_オリベトール HB80A」及び「オリベトール HB80A」)の濃度を示す。培養物のサンプルを72時間目に採取した。HB80Aは、メチル-オリベトールの大半を生成し(培養物1L当たり0.010mgのオリベトールと比較して培養物1L当たり1.4mgのメチル-オリベトール)、組み合わせても、HB80により生成されるメチル-オリベトール(3.26mg/L)より少ないメチル-オリベトールとオリベトールしか生成されない。

【0154】

(実施例V)

Table 6(表6)において上述されている酵母株HB98を、YNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。DiPKSによって触媒されるラフィノース及びガラクトースからのメチル-オリベトールの生成が確認された。このデータは、ヘキサノ酸を含まない場合にも、実施例IIIに記載されているHB80と比較したメチル-オリベトール生成の増加を実証する。HB80AはAltPTを欠くため、meCBGへの変換は続かなかった。meCBGへの変換は、pAltPTによってHB98を形質転換すること又はpNPGaによってHB84を形質転換すること等によって、HB98及びAltPT又は別のプレニルトランスフェラーゼの特徴を含んだ株で続くことが期待される。

【0155】

図19は、実施例IIIからのHB80によって生成されたメチル-オリベトール(「メチル_オリベトール HB80」)、及び実施例VからのHB98によって生成されたメチル-オリベトール(「メチル_オリベトール HB98」)の濃度を示す。培養物のサンプルを72時間目に採取した。HB80は、培養物1L当たり3.26mgのメチル-オリベトールしか生成しなかったが、HB98は、29.85mg/Lのメチル-オリベトールを生成した。HB98は、HB80のほぼ10倍のメチル-オリベトールを生成した。

【0156】

10

20

30

40

50

(実施例VI)

Table 6(表6)において上述されている酵母株HB102を、YNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。ラフィノース及びガラクトースからのメチル-オリベトールの生成が観察され、29.85mg/Lのメチル-オリベトールしか生成しなかった株HB98と比較して、酵母において、42.44mg/Lのメチル-オリベトールの増加した生成が実証された。このことは、NpgAの遺伝子組み込みバージョンが機能的であることを実証した。HB102はAltPTを欠くため、meCBGへの変換は続かなかった。meCBGへの変換は、HB102及びAltPT又はHB105等の別のプレニルトランスフェラーゼの特徴を含んだ株で続くことが期待される。

【0157】

図20は、実施例Vにおける株HB98からのメチル-オリベトール(「メチル_オリベトール HB98」)の生成と比較した、実施例VIからのHB102によって生成されたメチル-オリベトール(「メチル_オリベトール HB102」)の濃度を示す。

【0158】

(実施例VII)

Table 7(表7)において上述されている酵母株HB105を、YNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。ラフィノース及びガラクトースからのmeCBGの生成が、66.3mg/Lの力価で観察され、HB84由来のCBGの収率と比較した、meCBGの生成の増加が実証された。このことは、meCBG力価に関するPDHバイパス及び組み込みNpgAのポジティブな効果を実証する。

【0159】

図21は、実施例IIにおける株HB84からのmeCBG(「メチル_CBG HB84」)の生成と比較した、実施例VIIからのHB105によって生成されるmeCBG(「メチル_CBG HB105」)の力価を示す。

【0160】

(実施例VIII)

Table 6(表6)において上述されている酵母株HB135を、YNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。ラフィノース及びガラクトースからのオリベトールの生成が観察され、いずれのヘキサノ酸も用いない、49.24mg/Lの高力価における、メチル-オリベトールの生成なしの、酵母におけるオリベトールの生成を実証する。これは、株HB102によるメチル-オリベトールの生成に匹敵し、DIPKSの変異が、メチル-オリベトールに対してオリベトールの生成に有効であることを実証する。HB135はAltPTを欠くため、CBG及びmeCBGへの変換は続かなかった。CBG及びmeCBGへの変換は、HB135及びAltPT又は別のプレニルトランスフェラーゼの特徴を含む株で続くことが期待される。

【0161】

図22は、実施例VIにおける株HB102からのメチル-オリベトールの生成と比較した、実施例VIIIからのHB135によって生成されるオリベトール及びメチル-オリベトール(それぞれ、「メチル_オリベトール HB135」及び「オリベトール HB135」)の濃度を示す。

【0162】

(実施例IX)

Table 6(表6)において上述されている酵母株HB137及びHB138を、YNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。ラフィノース及びガラクトースからのオリベトールの生成は、両方の株で観察された。株HB137が生成した61.26mg/Lのオリベトール及び株HB138が生成した74.26mg/Lのオリベトールによって、オリベトール力価に関するMaf1組み込み及びAcc1-プロモータースワップのポジティブな効果を実証した。HB137及びHB138はAltPTを欠くため、CBGへの変換は続かなかった。CBGへの変換は、HB137及びHB138及びAltPT又は別のプレニルトランスフェラーゼの特徴を含んだ株で続くことが期待される。

【0163】

図23は、実施例VIIIにおけるHB135によって生成されるオリベトールと比較した、実施

10

20

30

40

50

例IXからのHB137(「オリベトール HB137」)及びHB138(「オリベトール HB138」)によって生成されるオリベトールの濃度を示す。

【0164】

(実施例X)

Table 7(表7)において上述されている酵母株HB139をYNB+2%のラフィノース+2%のガラクトース+1.6g/Lの4D0*培地中で培養した。ラフィノース及びガラクトースからのCBGの生成が、0.03mg/Lの力価で、直接的に観察された。これは、株HB105によって生成されたmeCBGの力価よりはるかに低い。

【0165】

図24は、実施例VIIからのHB105によるmeCBGの生成(「meCBG HB105」)及び実施例IにおけるHB37によるCBGの生成(「CBG HB37」)と比較した、実施例Xから、HB139によって、ガラクトース及びラフィノースから直接的に生成されるCBG(「CBG HB139」)の濃度を示す。

10

【0166】

(参照文献)

・M. B. Austin, T. Saito, M.E. Bowman, S. Haydock, A. Kato, B.S. Moore, R.R. Kay and Noel, J. P. (2006) "Biosynthesis of Dictyostelium discoideum differentiation-inducing factor by a hybrid type I fatty acid-type III polyketide synthase" *Nature chemical biology*, 2(9), 494.

・S.W. Baba, G.I. Belogradov, J.C. Lee, P.T. Lee, J. Strahan, J.N. Shepherd and C.F. Clarke (2003) "Yeast Coq5 C-Methyltransferase Is Required for Stability of Other Polypeptides Involved in Coenzyme Q Biosynthesis" *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11): 10052-10059.

20

・C. Chambon, V. Ladeveze, A. Oulmouden, M. Servouse and E Karst (1990) "Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase" *Curr Genet*, 18: 41-46.

・M.J.C. Fischer, S. Meyer, P. Claudel, M. Bergdoll and F. Karst (2011) "Metabolic Engineering of Monoterpene Synthesis in Yeast" *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8): 1883-1892.

・Bai Flagfeldt, D., Siewers, V., Huang, L. and Nielsen, J. (2009) "Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast*, 26, 545-551.

30

・S. Gagne. "The Polyketide Origins of Cannabinoids in Cannabis Sativa." Diss. U of Saskatchewan, 2013.

・R. Ghosh, A. Chhabra, P.A. Phatale, S.K. Samrat, J. Sharma, A. Gosain, D. Mohanty, S. Saran and R.S. Gokhale (2008) "Dissecting the Functional Role of Polyketide Synthases in Dictyostelium discoideum biosynthesis of the differentiation regulating factor 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol" *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11348-11354.

・C. Huang, H. Wu, Z. Liu, J. Cai, W. Lou and M. Zong (2012) "Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*" *Biotechnology for Biofuels*, 5:4.

40

・Z. Hunkova and Z. Fencel (1977) "Toxic Effects of Fatty Acids on Yeast Cells: Dependence of Inhibitory Effects on Fatty Acid Concentration" *Biotechnology and Bioengineering*, XIX: 1623-1641.

・J. Kaminska, K. Grabinska, M. Kwapisz, J. Sikora, W.J. Smagowicz, G. Palamarczyk, T. Zoladek and M. Boguta, "The isoprenoid biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* is affected in a maf1-1 mutant with altered tRNA synthesis" (2002) *FEMS Yeast Research* 2: 31-37.

・D. Ro, E.M. Paradise, M. Ouellet, K.J. Fisher, K.L. Newman, J.M. Ndungu, K.A. Ho, R.A. Eachus, T.S. Ham, J. Kirby, M.C.Y. Chang, S.T. Withers, Y. Shiba, R. Sa

50

rpong and J.D. Keasling (2006) "Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast" *Nature Letters* 440: 930-943.

• S. Shi, Y. Chen, V. Siewers and J. Nielsen, "Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of Acc1" (2014) *American Society for Microbiology* 5(3): e01130-14. doi:10.1128/mBio.01130-14.

• Y. Shiba, E.M. Paradise, J. Kirby, D. Ro and J.D. Keasling "Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids" (2007) *Metabolic Engineering* 9: 160-168.

• M.A. Skiba, A.P. Sikkema, W.D. Fiers, W.H. Gerwick, D.H. Sherman, C.C. Aldrich and J.L. Smith "Domain Organization and Active Site Architecture of a Polyketide Synthase C-methyltransferase" *ACS Chem. Biol.*; Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acscchembio.6b00759 • Publication Date (Web): 10 Oct 2016. Downloaded from <http://pubs.acs.org> on October 11, 2016.

• M. Telloa, T. Kuzuyama, L. Heidec, J. P. Noela, and S. B. Richarda (2008) "The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity" *Cell Mol Life Sci.*; 65(10): 1459-1463.

• C.A. Viegas, M.F. Rosa, I.Sa-Correia and J.M. Novais "Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation" (1989) *Applied and Environmental Microbiology* 55(1): 21-28.

【 0 1 6 7 】

配列

以下の配列は、この出願と共に電子的に提出されるが、本発明にも含まれる。

10

20

【表 1 1 - 1】

SEQUENCE LISTING

<110>	Hyasynth Biologicals Inc.		
<120>	METHOD AND CELL LINE FOR PRODUCTION OF PHYTOCANNABINOLIDS AND PHYTOCANNABINOID ANALOGUES IN YEAST		
<130>	PAT 85146W-90		
<140>	PCT/CA2018/050189		
<141>	2018-02-19		10
<150>	US 62/460,526		
<151>	2017-02-17		
<160>	47		
<170>	PatentIn version 3.5		
<210>	1		
<211>	927		
<212>	DNA		
<213>	Streptomyces coelicolor species 190		
<400>	1		20
	atgtctgaag cgcctgatgt cgaaagagtt tacgccgcta tggagagggc cgctggtttg	60	
	ttgggtggtt cctgtgctag agacaagatt taccattgt tatccacctt ccaagatact	120	
	ttggttgaag gtggttctgt tgcgttttct tctatggcct ccggtagaca ctccaccgaa	180	
	ttggacttct ctatttctgt tccaacttct catgggtgatc catacgccac tgcgtttgaa	240	
	aagggtttat ttctgctac tggtcaccca gttgacgatt tgtagctga cactcaaaag	300	
	cacttacctg tttctatggt cgctattgac ggtgaagtta ccggtggttt caaaaagact	360	
	tacgccttct tccaactga caatatgcca ggtgttgctg aattgtctgc tatcccatcc	420	30
	atgccaccag ccggtgccga gaatgctgaa ttgttcgctc gttatggttt ggacaaggtc	480	
	caaatgacct ccatggacta caagaaaaga caagtcaact tgtatttctc cgaattgtct	540	
	gctcaaactt tagaagccga atctgttttg gcttttggtta gagaattagg tttgcacggt	600	
	ccaaacgaat tgggtttgaa gttttgtaa cgttcttctct ctgtttatcc aactttgaac	660	
	tgggaaaccg gtaaaatcga cagattgtgc ttogctgtca tctctaacga cccaaccttg	720	
	gtcccatcct ccgatgaagg tgatatcgaa aagttccaca actacgccac taaggctcct	780	
	tacgcttacg tcggtgagaa acgtaccttg gtctatggtt tgactttatc cccaaaggag	840	
	gaatactaca agttgggtgc ttactaccac attaccgacg tccaaagagg tttgttaaag	900	
	gccttcgact ctttagaaga cggctga	927	40

【表 1 1 - 2】

<210>	2		
<211>	9444		
<212>	DNA		
<213>	Dictyostelium discoideum		
<220>			
<221>	Motif 1		
<222>	(4528)..(4554)		10
<220>			
<221>	C-methyltransferase domain		
<222>	(4528)..(4890)		
<220>			
<221>	Motif 2		
<222>	(4787)..(4809)		
<220>			
<221>	Motif 3		
<222>	(4867)..(4899)		20
<400>	2		
atgaacaaga	actccaaaat	ccagtcccca	aactcttctg atggtgctgt tattggtggt 60
ggtttttagat	tcccaggtaa	ctctaatagac	ccagaatctt tgtggaacaa ctggttggat 120
ggtttcgatg	ctattaccca	agtcccaaaa	gaaagatggg ctacttcttt tagagagatg 180
ggtttgatca	agaacaagtt	cggtggtttc	ttgaaggatt ctgaatggaa gaatttcgac 240
cctttgttct	ttggtatcgg	tccaaaagaa	gctccattca ttgatccaca acaaaggttg 300
ttgttgtcca	tcgtttgga	atctttggaa	gatgcttaca tcagaccaga tgaattgaga 360
ggttctaaca	ctggtgtttt	catcgggtgt	tctaacaacg attacaccaa gttgggtttc 420
caagacaact	actctatttc	tccatacaact	atgaccggct ctaactcttc attgaactcc 480
aacagaatth	cctactgctt	cgatthttaga	ggthccatcca ttactgttga taccgcttgt 540
tcttcttct	tggthtctgt	taatthgggt	gtccaatcca tccaatggg tgaatgtaag 600
attgctatth	gcggtggtgt	taacgctthg	thtgatccat ctacatctgt tgcctthtcc 660
aagthgggtg	thttgtctga	aaatggcaga	tgcaactctt thagtgatca agcctctggt 720
tacgthtagat	ctgaaggtgc	tggthtthgt	gthttgaaagt cthttggaaca agctaagthg 780
gatggtgata	gaactctacg	tgttatcaag	ggtgthtctc ctaatgaaga tggthgcttct 840
aatggtgaca	agaactctth	gaactctcca	tthtthgaaag cccaatccat taacatthtct 900
aaggctatgg	aaaaggctc	ctthgtctcca	tctgatatct attacatthg agccatggt 960
actggtactc	cagthggtga	tccaatthgaa	gthtaaggctc thtccaagat cthtctccaac 1020

30

40

【表 1 1 - 3】

tctaacaaca	accagttgaa	caacttctct	accgatggta	atgataacga	tgatgatgat	1080	
gacgataaca	cctctccaga	accattattg	attggctcat	tcaagtccaa	catcggtcat	1140	
ttggaatctg	ctgctgggat	tgcttctttg	attaagtgtt	gcttgatggt	gaagaacagg	1200	
atggttggtc	catccattaa	ctgctcta	ttgaacccat	ccattccatt	cgatcagtac	1260	
aacatctccg	ttatcagaga	aatcagacaa	ttcccaaccg	ataagttggt	taacatcggt	1320	
atcaattctt	tcggtttcgg	tggttcta	tgccatttga	ttattcaaga	gtacaacaac	1380	
aacttcaaga	acaactctac	catctgcaat	aacaacaaca	acaacaataa	caacatcgac	1440	10
tacttgatcc	caatctctc	taagactaag	aagtccttgg	ataagtactt	gattttgatc	1500	
aagaccaact	ccaactacca	caaggatatt	tctttcgatg	acttcgtcaa	gttccaaatc	1560	
aagtctaagc	agtacaactt	gtccaacaga	atgactacca	ttgctaacga	ttggaactcc	1620	
ttcattiaagg	gttctaacga	attccacaac	ttgatcgaat	ctaaggatgg	tgaaggtggt	1680	
tcttcatctt	ctaacagagg	tattgattcc	gccaatcaaa	tcaacactac	tactacctct	1740	
accatcaacg	atatcgaacc	tttgttgggt	ttcgttttct	gtggtcaagg	tccacaatgg	1800	
aatggtatga	ttaagacctt	gtacaactcc	gagaacgttt	tcaagaacac	cgttgatcat	1860	
gttgacagca	tcttgtaaaa	gtacttcggg	tactccattt	tgaacgtctt	gtctaagatc	1920	
gatgataacg	acgattccat	caaccatcca	atagttgctc	aaccatcttt	gttcttgttg	1980	20
caaattggtt	tggtcagagt	gtttaagtac	tggggtatct	acccatctat	ctctgttggg	2040	
cattctttcg	gtgaagtctc	ttcttattac	ttgtccggta	tcatctcttt	ggaaaccgct	2100	
tgtaaaatcg	tctacgtcag	atcctcta	cagaacaaaa	ctatgggttc	cggtaaagatg	2160	
ttggttggtt	ctatgggtt	taagcaatgg	aacgatcaat	tctctgctga	atggtcogat	2220	
attgaaattg	cttggttaca	cgctccagat	tccatagttg	ttactggtaa	cgaagaaaga	2280	
ttgaaagaat	tgtccatcaa	gttgtccgac	gaatccaatc	aaattttcaa	caccttcttg	2340	
aggtccccat	gttcttttca	ttcttcccat	caagaagtca	tcaagggttc	tatggtcgaa	2400	
gagttgtcta	acttgcaatc	tactggtgaa	accgaaatcc	ctttgttctc	tactgttact	2460	
ggtagacaag	ttttgtctgg	tcatgttact	gctcaacaca	tctacgataa	tgttagagaa	2520	30
ccagtcttgt	tccaaaagac	gattgaaatc	attacctcct	acatcaagtc	tcactaccca	2580	
tccaatcaaa	aggttatcta	cgttgaaatt	gctccacacc	caaccttgtt	ttcattgatc	2640	
aaaaagtcca	tcccatctc	caacaagaat	tcctcttctg	ttttgtgtcc	attgaacaga	2700	
aaagaaaact	ccaacaactc	ctacaagaag	ttcgtttctc	agttgtactt	caacgggtgtt	2760	
aacggtgact	tcaacttcca	gttgaactcc	atgtgcgata	acgttaacaa	cgatcaccat	2820	
ttgaacaacg	tcaagcaaaa	ctccttcaaa	gagactacca	attccttgcc	aagataccaa	2880	
tgggaacaag	atgaatattg	gtccgaacca	ttgatctcca	gaaagaatag	attggaaggt	2940	
ccaactactt	ccttgttggg	tcatagaatt	atctacagct	tcccagtttt	ccaatccggt	3000	
ttggacttgc	aatctgacaa	ctacaaatac	ttgttggacc	acttggttaa	cggtaaagcca	3060	40

【表 1 1 - 4】

gttttccag	gtgctggta	tttgatata	atcatcgaat	tottcgacta	coaaaagcag	3120	
cagttgaatt	cctctgattc	ctctaactcc	tacatcatca	acgttgacia	gatccaattc	3180	
ttgaacccaa	ttcacttgac	cgaaaacaag	ttgcaaacct	tgcaatcttc	tttcgaacct	3240	
atcgttacta	agaagtctgc	cttctctggt	aacttcttca	tcaaggatac	cgtcgaggat	3300	
caatctaagg	ttaagtctat	gtctgacgaa	acttgacta	acaacttgta	ggctaccatt	3360	
tccttggaac	aacaacagcc	atctccatct	tctactttga	ctttgtctaa	gaagcaagac	3420	
ttgcagatct	tgagaaacag	atgcgatatt	agcaagctag	acaagtttga	gttgtacgac	3480	10
aagatctcta	agaatttggg	cttgcagtac	aactccttgt	ttcaagttgt	tgataccatc	3540	
gaaactggta	aggattgctc	ttttgctact	ttgtctttgc	cagaagatac	tttgttcacc	3600	
accattttga	acccatgctt	gttggataac	tgtttccatg	gtttgttgac	cttgatcaac	3660	
gaaaaggggt	ctttcgttgt	cgagtccatt	tcttctgttt	ctatctactt	ggagaacatc	3720	
ggttccttca	atcaaaacttc	tgttggtaac	gtccagttct	acttgtacac	cactatttct	3780	
aaagccacct	cctttagttc	tgaaggtaact	tgtaagttgt	tcaccaagga	tggttcoctg	3840	
atthttgteta	tcggtaagtt	catcatcaag	tccaccaatc	caaagtctac	taagaccaac	3900	
gaaactatcg	aatctccatt	ggacgaaacc	ttctctattg	aatggcaatc	taaggattct	3960	
ccaattccaa	cccacaaca	aatocaaca	caatctccat	tgaactctaa	cccatccttc	4020	20
attagatcta	ccatcttga	ggacatccag	ttcgaacaat	actgctcctc	cattatccac	4080	
aaagaattga	tcaaccacga	aaagtacaag	aaccagcaat	ccttcgatat	caactccttg	4140	
gaaaaccact	tgaacgatga	ccaattgatg	gaatccttgt	ccatctccaa	agaatacttg	4200	
agattcttca	ccaggatcat	ctccatcatt	aagcaatacc	caaagatctt	gaacgaaaaa	4260	
gagctaaaag	aattgaaaga	aatcatogaa	ttgaagtacc	catccgaagt	tcagttggtg	4320	
gaattcgaag	ttatcgagaa	ggtgtccatg	attatcccaa	agttgttgtt	cgaaaacgac	4380	
aagcaatctt	ccatgacctt	gttccaagat	aacttgttga	ccaggttcta	ctccaattct	4440	
aactctacca	gattctactt	ggaaaggggt	tccgaaatgg	tcttggaaac	tattagacca	4500	
atcgtcagag	aaaagaggggt	gttcagaatt	ttggaaattg	gtgctggtac	aggctctttg	4560	30
tctaattggtg	ttttgactaa	gttgaacacc	tacttgtcca	ccttgaattc	taatgggtggt	4620	
tctggttaca	acatcatcat	tgagtacacc	ttcaccgata	tttccgcaa	cttcattatt	4680	
ggtgaaatcc	agaaaccat	gtgcaacttg	tacccaaacg	ttactttcaa	gttctccgtc	4740	
ttggacttgg	agaaagagat	tattaactcc	tccgatttct	tgatgggtga	ttacgatata	4800	
gttttgatgg	cctacgttat	ccatgcccgtt	tctaacatta	agttctccat	cgaacagttg	4860	
tacaagttgt	tgtctccaag	aggttgggtg	ttgtgtattg	aacctaaagtc	caacgttgtg	4920	
ttctccgatt	tggttttcgg	ttgttttaaat	cagtgggtgga	actactacga	tgatattaga	4980	
actaccact	gctccttgtc	tgaatctcaa	tggaaatcagt	tgttgttgaa	ccagtccttg	5040	40
aacaacgaat	cctcttcttc	ttctaactgt	tacgggtggtt	tctccaacgt	ttcttttatt	5100	

【表 1 1 - 5】

ggtggtgaaa	aggatgtcga	ctcccattct	ttcatattgc	actgccaaaa	agaatccatc	5160	
tcccaaatga	agttagccac	cactattaac	aacggtttgt	catctgggtc	catcgttatc	5220	
gttttgaact	ctcaacaatt	gaccaacatg	aagtcctacc	caaaggttat	tgagtatatt	5280	
caagaggcta	cctctttgtg	caagaccatt	gaaattatcg	attccaagga	cgctctgaac	5340	
tctaccaatt	cagttttgga	aaagatccaa	aagtccttgt	tgggtttctg	tttgttgggt	5400	
tatgacttgt	tggagaacaa	ctaccaagaa	cagtctttcg	aatacgtaa	gttgttgaac	5460	
ttgatctcta	ctaccgcctc	ttcatctaat	gataagaaac	caccaaaggt	cttgttgatc	5520	10
accaagcaat	ctgaaagaat	ctccaggctc	ttctactcca	gatccttgat	tggattttcc	5580	
agaacctcta	tgaacgagta	cccaaatttg	tccattacct	ctatcgattt	ggataccaac	5640	
gactactcat	tgcagctctt	gttgaagcca	atcttcagca	actctaagtt	ttccgacaac	5700	
gagttcatct	tcaaaaaggg	cttgatgttc	gtgtccagga	tctttaagaa	caagcagttg	5760	
ctagaatcct	ccaacgcttt	tgaaactgac	tcttctaact	tgtactgtaa	ggcctcttct	5820	
gacttgtctt	acaagtacgc	tattaagcag	tctatgttga	ccgaaaatca	gatcgaaatc	5880	
aaggttgaat	gcgtcgggat	taacttcaag	gacaacctat	tctacaaggg	cttgttgcca	5940	
caagaaattt	tcagaatggg	tgacatctac	aatccaccat	atgggtttgga	atgctctggt	6000	
gttattacca	gaattgggtc	taacgtcacc	gaatactcag	ttggtcaaaa	tgtttttggt	6060	20
ttcgccagac	attctttggg	ttctcatggt	gttaccaaca	aggatttggg	tatcttgaag	6120	
ccagatacca	tctcattttc	tgaagctgct	tctatcccag	ttgtttactg	tactgcttgg	6180	
tactccttgt	tcaacattgg	tcagttgtct	aacgaagaat	ccatccta	tcattctgct	6240	
actggtggtg	taggtttggc	ttctttgaa	ttggtgaaaa	tgaagaatca	gcaacagcaa	6300	
ccattgacca	atgtttatgc	tactgttggc	tctaacgaga	agaagaagtt	cttgatcgat	6360	
aacttcaaca	acttgttcaa	agaggacggc	gaaaacattt	tctctaccag	agacaaagaa	6420	
tactccaacc	agttggaatc	caagatcgat	gttattttga	acacctgtc	cggtgaattc	6480	
gtcgaatcta	atctcaagtc	cttgagatcc	ttcggtagat	tgattgattt	gtctgctact	6540	
cacgtttacg	ccaatcaaca	aattggtcta	ggtaacttca	agttogacca	cttgtattct	6600	30
gctgttgact	tggaaagatt	gatcgacgaa	aaacctaagt	tgttgcagtc	catcttgcaa	6660	
agaattacca	actctatcgt	caacggttcc	ttggaaaaaa	ttccaattac	catcttccca	6720	
tccaccgaaa	ctaaggatgc	tatcgaatta	ttgtccaaga	gatcccatat	cggtaaagtt	6780	
gtttagat	gcaccgatat	ctctaagtgt	aatcctgttg	gtgatgtgat	caccaacttc	6840	
tctatgagat	tgccaaagcc	aaactaccag	ttgaatttga	actccacctt	gttgattact	6900	
ggtcagctctg	gtttgtctat	ccctttgttg	aattggttgt	tgtctaagtc	tgggtgtaac	6960	
gttaagaacg	ttgtcatcat	ttctaagtc	accatgaagt	ggaagttgca	gactatgatt	7020	
tcccatttctg	tttccggttt	cggtatccat	tttaactacg	ttcaagtoga	catctccaac	7080	
tacgatgctt	tgtctgaagc	tattaagcaa	ttgccatctg	atgtgccacc	aatcacctct	7140	40

【表 1 1 - 6】

gtttttcatt	tggctgctat	ctacaacgat	gttccaatgg	atcaagttac	catgtctacc	7200	
gttgaatctg	ttcataaacc	taaagttttg	ggtgccgta	acttgcatag	aatctctggt	7260	
tcttttggtt	ggaagttgaa	ccacttcgtc	ttgttctctt	ctattactgc	tattaccggt	7320	
taccagacc	aatctatcta	caattctgcc	aactctatth	tggacgcttt	gtccaacttt	7380	
agaaggttta	tgggtttgcc	atccttctcc	attaacttgg	gtccaatgaa	ggatgaagg	7440	
aaggtttcta	ccaacaagag	catcaagaag	ctattcaagt	ctagaggtht	gccaagccta	7500	
tccttgaaca	agttattht	tttghtggag	gtcgtcatca	acaaccoatc	taatcatggt	7560	10
atcccatccc	aattgatttg	ctccccaatc	gatttcaaga	cctacatcga	atctttctca	7620	
actatgaggc	caaagttggt	acaottgcaa	cctaccattt	ccaagcagca	atcttctatc	7680	
attaacgatt	ctaccaaggc	ttcctccaac	atthcattgc	aagataagat	cacctccaag	7740	
gtgtctgatt	tgttgtccat	tccaatctcc	aagatcaact	tcgatcatcc	attgaaacac	7800	
tacggcttgg	attctttggt	gacogttcaa	ttcaaatcct	ggatcgacaa	agaattcgaa	7860	
aagaacttgt	tcaccatata	ccaattggcc	accatctcta	ttaactcatt	cttggaaaag	7920	
gtgaacggct	tgtctacaaa	caataacaac	aacaacaatt	ccaacgtcaa	gtcctctcca	7980	
tccattgtca	aagaagaaat	cgttaccttg	gacaaggatc	aacaaccatt	gctattgaaa	8040	
gaacaccagc	acattatcat	ctccccagat	attagaatca	acaagccaaa	gagggaaatc	8100	20
ttgattagaa	ccccaatctt	gaacaaatc	aaccagatca	ccgaatccat	tatcactcca	8160	
tctacaccat	ctttgtccca	atcogatggt	ttgaaaactc	caccaatcaa	gtctttgaa	8220	
aacactaaga	actccagctt	gattaacacc	ccaccaattc	aatctgtcca	acaacatcaa	8280	
aagcaacaac	aaaaggcca	agtcattcca	caacagcaac	aaccattatc	cagattgtcc	8340	
tacaagagca	acaacaactc	tttctgtttg	ggtatcggta	tttctgttcc	aggtgaaact	8400	
atthcccaac	aatccttgaa	agactccatc	tccaatgact	tttctgataa	ggctgaaact	8460	
aacgagaagg	tcaagagaat	ctttgagcaa	tctcaaatca	agaccagaca	cttgggttaga	8520	
gattacacta	agccagagaa	ctccatcaag	ttcagacatt	tggaaaccat	taccgatgtg	8580	
aacaaccagt	tcaagaaaat	tgttccagat	ttggctcaac	aagcctgtht	gagagcttht	8640	30
aaagattggg	gtgggtgata	gggtgatatt	accatataag	tttctgttac	ctccaccggt	8700	
attatcatcc	cagatgttaa	tttcaagttg	atcgacttgt	tgggcttgaa	caaggatggt	8760	
gaaagagtgt	ctttgaaact	aatgggttgt	ttggctggtt	tgagttcttt	gagaactgct	8820	
gcttcttttg	ctaaggcttc	tccaagaaat	agaatthtgg	ttgtctgtac	cgaagtctgc	8880	
tccttgcatt	tttctaatac	tgatggtggt	gatcaaatgg	tcgcctcttc	tattthtgt	8940	
gatggttctg	ctgcttacet	tattggttgt	aaccaagaa	ttgaagaaac	cccattatac	9000	
gaagtcatgt	gtccatttaa	cagatctthc	ccaaataccg	aaaacgccat	ggthtgggat	9060	
ttggaaaaag	aaggttgaa	cttgggttht	gatgcttcta	ttccaattgt	cattggttct	9120	40
ggtattgaag	ccttctgtga	tactthtgtg	gataaggcta	agttgcaaac	ttccactgct	9180	

【表 1 1 - 7】

atctctgcta aggattgcga attccttgatt catactgggtg gcaagtccat cttgatgaac	9240	
atcgaaaatt ccttgggtat cgacccaaag caaactaaga atacttggga tgtttaccat	9300	
gcctacggca atatgtcatc tgcctctgtt attttcgtta tggatcatgc cagaaagtcc	9360	
aagtctttgc caacttactc aatttccttg gcttttggtc caggtttggc ttttgaaggt	9420	
tgtttcttga agaacgtcgt ctaa	9444	
<210> 3		
<211> 1059		10
<212> DNA		
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<400> 3		
atggcttcag aaaaagaaat taggagagag agattcctga acgttttccc taaattagta	60	
gaggaattga acgcatcgct tttggcttac ggtatgccta aggaagcatg tgactggtat	120	
gccactcat tgaactacaa cactccaggc ggtaagctaa atagaggttt gtccgttgtg	180	
gacacgtatg ctattctctc caacaagacc gttgaacaat tggggcaaga agaatacgaa	240	
aaggttgcca ttctaggttg gtgcattgag ttggtgcagg cttacttctt ggtcgccgat	300	
gatatgatgg acaagtccat taccagaaga ggccaacccat gttggtacaa ggttcctgaa	360	20
gttggggaaa ttgccatcaa tgacgcattc atggttagagg ctgctatcta caagcttttg	420	
aaatctcact tcagaaacga aaaatactac atagatatca ccgaattggt ccatgaggtc	480	
accttccaaa ccgaattggg ccaattgatg gacttaatca ctgcacctga agacaaagtc	540	
gacttgagta agttctccct aaagaagcac tccttcatag ttactttcga gactgcttac	600	
tattctttct acttgctctg cgcattggcc atgtacgctg ccggatcac ggatgaaaag	660	
gatttgaaac aagccagaga tgtccttgatt ccattgggtg aatacttcca aattcaagat	720	
gactacttag actgcttcgg taccacagaa cagatcggta agatcggtag agatatccaa	780	
gataacaaat gttcttgggt aatcaacaag gcattggaac ttgcttccgc agaacaaaga	840	
aagactttag acgaaaatta cggtaagaag gactcagtcg cagaagccaa atgcaaaaag	900	30
atcttcaatg acttgaaaat tgaacagcta taccacgaat atgaagagtc tattgccaag	960	
gatttgaagg ccaaaatttc tcaggtcgat gagtctcgtg gcttcaaagc tgatgtctta	1020	
actgcgttct tgaacaaagt ttacaagaga agcaataa	1059	
<210> 4		
<211> 14025		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Plasmid		40

【表 1 1 - 8】

<220>		
<221>	C1:p506 primer homology	
<222>	(1)..(50)	
<220>		
<221>	19 UP	
<222>	(51)..(761)	
<220>		10
<221>	L0	
<222>	(762)..(800)	
<220>		
<221>	THD3p	
<222>	(801)..(1453)	
<220>		
<221>	L1	
<222>	(1454)..(1493)	
<220>		20
<221>	ALD6	
<222>	(1494)..(2999)	
<220>		
<221>	L2	
<222>	(3000)..(3039)	
<220>		
<221>	LTP1	
<222>	(3364)..(3403)	
<220>		30
<221>	Tef1p	
<222>	(3404)..(3897)	
<220>		
<221>	L3	
<222>	(3898)..(3937)	
<220>		
<221>	Acs L641P	
<222>	(3938)..(5893)	
<220>		40

【表 1 1 - 9】

<221>	L4						
<222>	(5894)..(5933)						
<220>							
<221>	PRM9t						
<222>	(5934)..(6471)						
<220>							
<221>	LTP2						10
<222>	(6472)..(6511)						
<400>	4						
taaccctcac	taaaggggaac	aaaagctgga	gctcgtttta	acggcgcgcc	caccggagct		60
tgatatgat	aaacgaaata	ttcttgaatc	gtgagatcgc	ctgttttcaa	aaccgttggga		120
ggcagaaaca	atthttgtcac	aagatgggca	ttctacocca	tccttgctgt	attattgtag		180
tctcgttttc	ttttatgctg	gacaaatgag	actactgcac	atthtttatac	gttcttggtt		240
ttttttaaag	gtgtgggtttc	ggcattatcc	tgccgcacgt	ttcttggata	attcatcctg		300
attctctatt	ttaaacgctt	cagcctatca	ggatttgggt	ttgatacata	ctgcaagagt		360
gtatctcggg	aacagtcatt	tattccgcaa	caaacttaat	tgcggaacgc	gttaggcgat		420
ttctagcata	tatcaaatac	cgttcgcgat	ttcttctggg	ttcgtctctt	ttcttttaaa		480
tacttattaa	cgtactcaaa	caactacact	tcgttgtatc	tcagaatgag	atccctcagt		540
atgacaatac	atcattctaa	acgttcgtaa	aacacatatg	aaacaacttt	ataacaaagc		600
gaacaaaatg	ggcaacatga	gatgaaatc	cgcgtccctt	agctgaacta	cccaaacgta		660
cgaatgcctg	aacaattagt	ttagatccga	gattccgcgc	ttccatcatt	tagtataatc		720
catatthttat	ataatatata	ggataagtaa	cagcccgcga	aaaacaacaa	ataatcataa		780
aaatthttaga	actagacata	tcgagthttat	cattatcaat	actgccattt	caagaatac		840
gtaaataatt	aatagtagtg	atthttcctaa	ctthtttttag	tcaaaaaatt	agcctthttaa		900
ttctgctgta	accggtacat	gcccanaata	gggggcgggt	tacacagaat	atataacatc		960
gtagggtgtct	gggtgaacag	tttattcctg	gcattccacta	aatataatgg	agcccgtthtt		1020
ttaagctggc	atccagaaaa	aaaaagaatc	ccagcaccaa	aatattgthtt	tcttcaccaa		1080
ccatcagthtc	ataggtccat	tctcttagcg	caactacaga	gaacaggggc	acaacaggc		1140
aaaaaacggg	cacaacctca	atggagtgat	gcaacctgcc	tggagtaaat	gatgacacaa		1200
ggcaattgac	ccacgcatgt	atctatctca	thttcttaca	ccttctatta	ccttctgctc		1260
tctctgattt	ggaaaaagct	gaaaaaaaag	gttgaaacca	gttccctgaa	attattcccc		1320
tacttgacta	ataagtatat	aaagacggtg	ggtattgatt	gtaattctgt	aaatctatthtt		1380
cttaaaccttc	ttaaattcta	ctthttatagt	tagtctthttt	thttagthttta	aaacaccaag		1440
aacttagthtt	cgactagaaa	atthttatata	aaaggaagag	aaataattaa	acaatgacta		1500

【表 1 1 - 1 0】

agctacactt	tgacactgct	gaaccagtca	agatcacact	tccaaatggt	ttgacatacy	1560	
agcaaccaac	cggctctatc	attaacaaca	agtttatgaa	agctcaagac	ggtaagacct	1620	
atcccgtoga	agatccttcc	actgaaaaca	ccgtttgtga	ggctctcttct	gccaccactg	1680	
aagatgttga	atatgctatc	gaatgtgccc	accgtgcttt	ccacgacact	gaatgggcta	1740	
cccaagacc	aagagaaaga	ggccgtctac	taagtaagtt	ggctgacgaa	ttggaaagcc	1800	
aaattgactt	ggtttcttcc	attgaagctt	tggacaatgg	taaaactttg	gccttagccc	1860	
gtggggatgt	taccattgca	atcaactgtc	taagagatgc	tgctgcctat	gccgacaaag	1920	10
tcaacggtag	aacaatcaac	accggtgacg	gctacatgaa	cttcaccacc	ttagagccaa	1980	
tcgggtgtctg	tgggtcaaatt	attccatgga	actttccaat	aatgatgttg	gcttggaaaga	2040	
tcgccccagc	attggccatg	ggtaacgtct	gtatcttgaa	accgctgct	gtcacacctt	2100	
taaatgcct	atactttgct	tctttatgta	agaaggttgg	tattccagct	ggtgtcgtca	2160	
acatcgttcc	aggctctggt	agaactgttg	gtgctgcttt	gaccaacgac	ccaagaatca	2220	
gaaagctggc	ttttaccggt	tctacagaag	tcggtaagag	tgttgctgtc	gactcttctg	2280	
aatctaactt	gaagaaaatc	actttggaac	taggtggtaa	gtccgcccac	ttggtctttg	2340	
acgatgctaa	cattaagaag	actttaccaa	atctagtaaa	cggtatcttc	agaacgctg	2400	
gtcaaatttg	ttcctctggt	tctagaatth	acgttcaaga	aggtatttac	gacgaactat	2460	20
tggctgcttt	caaggcttac	ttggaaaccg	aatcaaaagt	tggtaatcca	ttgacaagg	2520	
ctaacttcca	agggtctatc	actaacctgc	aacaattcga	cacaattatg	aactacatcg	2580	
atatcggtaa	gaaagaaggc	gccaagatct	taactggtgg	cgaaaaagtt	ggtgacaagg	2640	
gttacttcat	cagaccaacc	gttttctacg	atgttaatga	agacatgaga	attgttaagg	2700	
aagaaattht	tggaccagtt	gtcactgtcg	caaagttcaa	gactttagaa	gaaggtgtcg	2760	
aaatggctaa	cagctctgaa	ttcggctctag	gttctatggg	tatcgaaaca	gaatctttga	2820	
gcacaggtht	gaaggtggcc	aagatgttga	aggccggtac	cgtctggatc	aacacataca	2880	
acgattttga	ctccagagtt	ccattcggty	gtgttaagca	atctggttac	ggtagagaaa	2940	
tgggtgaaga	agtctacat	gcatacactg	aagtaaaagc	tgtcagaatt	aagttgtaaa	3000	30
gacataaaac	tgaacaaca	ccaattaata	atagaactth	ggacttcttc	gccagaggth	3060	
tggtaagtc	tccaatcaag	gttgtcggct	tgtctacctt	gccagaaatt	tacgaaaaga	3120	
tggaaaagg	tcaaatcgth	ggtagatacy	ttgttgacac	ttctaataaa	gcgaatthct	3180	
tatgattht	gattthtatt	attaataaag	ttataaaaaa	aataagtgta	tacaaattht	3240	
aaagtgactc	ttaggthtth	aaacgaaaat	tcttattctt	gagtaactct	ttcctgtagg	3300	
tcaggthtct	ttctcaggta	tagcatgagg	tcgctcttat	tgaccacacc	tctaccggca	3360	
tggcttaaat	aacatactca	tcactaaaca	ttcttaacaa	tcaaagcaac	aggcgcgtht	3420	
gactthttht	tttcgaggac	cgcgaaactc	tacatcacac	ccaatcccc	acaagtgatc	3480	40
ccccacacac	catagctthc	aaatgthtct	actccttht	tactctthc	gattthctcg	3540	

【表 1 1 - 1 1】

gactccgogc atcgccgtac cacttcaaaa cacccaagca cagcatacta aatttcccct	3600
ctttcttcoot ctagggtgtc gttaattacc cgtactaaag gtttggaana gaaaaaagag	3660
accgcctcgt ttctttttct tcgtcgaaaa aggcaataaa aattttttatc acgtttcttt	3720
ttcttgaaaa tttttttttt tgattttttt ctctttogot gacctcccat tgatatttaa	3780
gttaataaac ggtcttcaat ttctcaagtt tcagtttcat ttttcttggt ctattacaac	3840
tttttttact tcttgctcat tagaaagaaa gcatagcaat ctaatctaag ttttaataca	3900
tctaccagtc aacagccaac aattaactaa ttaaacaatg tcccaaactc ataagcacgc	3960
tattccagct aatattgctg atagatgctt gatcaacca gaacagtacg aaactaagta	4020
caagcaatcc atcaacgatc cagatacttt ttggggtgaa caaggtaaga ttttgattg	4080
gattacocca taccaaaagg tcaagaatac ttcttttgct ccaggcaacg tttccattaa	4140
gtggtatgaa gatggtactt tgaacttggc tgctaactgt ttggatagac acttgcaaga	4200
aaacgggtgat agaaccgcta ttatttggga aggtgatgat acctcccaat ccaaacatat	4260
ctcttacaga gaattgcaca gagatgtctg tagattcgtc aacactttgt tggatttggg	4320
catcaaaaag ggtgatgttg ttgctatcta tatgccaatg gttcctgaag ctgctgttgc	4380
tatggttggt tgtgctagaa ttgggtgctg tcattctggt attttccgtg gtttttcacc	4440
agaagctggt gccggtagaa ttatcgattc ttcctocaga ttggttatca ccgctgatga	4500
aggtgtaga gctggttagat ctattccatt gaaaaagaac gttgatgacg ccttgaagaa	4560
cccaaatggt acttctgttg aacacgtcat cgttttgaag agaactgggt ctgatatcga	4620
ttggcaagag ggtagagatt tgtggtggag agatttgatt gaaaaggcct ctccagaaca	4680
tcaaccagaa gctatgaacg ctgaagatcc tttgtttata ttgtacactt ctggttctac	4740
tggtgaagcca aaagggtgtt tacacactac tgggtggttat ttggtttacg ctgctactac	4800
tttcaagtac gttttcgatt atcaccagc tgatatctat tgggtgactg ctgatgttgg	4860
ttgggttact ggtcattctt atttgttga tgggtccattg gcttgtggtg ctactacatt	4920
gatggttgaa ggtggttcaa attggccaac tccagctaga atgtgtcaag ttgttgacaa	4980
acaccaagtc aacatcttgt aactgctcc aactgctatt agagctttga tggctgaagg	5040
tgataaggct attgaaggta ctgatagatc ctcttgaga atcttgggtt ctggttggta	5100
acctattaac cctgaagcct gggaatggta ttggaagaaa atttgtaaag aaaagtgcc	5160
agttgttgat acttgggtggc aaactgaaac tgggtggttt atgattactc cattgccagg	5220
tgctattgaa ttgaaagctg gttctgctac tagaccattt tttgggtgtc aaccagcttt	5280
ggttgataac gaaggtcatc cacaagaagg tgctactgaa ggtaatttgg ttattactga	5340
ttcttggtcca ggtcaagcta gaactttggt tgggtgatcac gaaagattcg aacagactta	5400
cttctctaac ttcaagaaca tgtacttctc tgggtgatggt gctagaagag atgaagatgg	5460
ttactattgg attaccggtg gagttgatga tgtcttgaat gtttctggtc acagattagg	5520
tactgccgaa attgaatctg ctttggttgc tcatccaaag attgctgaag ctgcagttgt	5580

10

20

30

40

【表 1 1 - 1 2】

tggtattcca	catgctatta	agggcacaagc	tatctacgct	taogttactt	tgaatcatgg	5640	
tgaagaacca	totocagaat	tatacgcctga	agttagaaac	tgggtcagaa	aagaaattgg	5700	
tccattagct	accccagatg	ttttacattg	gactgattct	ttgccaaaga	ccagatcagg	5760	
taagatcatg	agaagaatct	tgagaaagat	tgctgctggg	gatacttcta	acttgggtga	5820	
tacttcaaca	ttagctgatc	caggtgttgt	tgaaaagcct	ttggaagaaa	aacaagctat	5880	
tgccatgcca	tcctaataat	taaatactat	tttcaaaatt	ctacttaaaa	ataacagaag	5940	
acgggagaca	ctagcacaca	actttaccag	gcaaggtatt	tgacgctagc	atgtgtccaa	6000	10
ttcagtgcca	tttatgattt	tttgtagtag	gatataaata	tatacagcgc	tccaaatagt	6060	
gcggttgccc	caaaaacacc	acggaacctc	atctgttctc	gtactttggt	gtgacaaagt	6120	
agctcaactg	cttattatca	cattttcatt	atgcaacgct	tcggaaaata	cgatgttgaa	6180	
aatgcctcta	gagatgaaaa	acaatcgtaa	aagggctcctg	cgtaattgaa	acatttgatc	6240	
agtatgcagt	ggcacagaaa	caaccaggaa	tactatagtc	ataggcaata	caaggtatat	6300	
attggctatg	cagaccctc	cagaaagtac	cgacgtcaag	ttagatacac	ttaacgaacc	6360	
tagtgcacat	ttaattgaga	aaaatgtggc	tcttctaag	gacatattcc	gttcgtactt	6420	
gagttattgg	atctatgaaa	tcgctcgcta	tacaccagtc	atgattttgt	cattgcaag	6480	
actatactga	tatatgaatt	taaactagag	cggaccaact	atcatccgct	aattactgac	6540	20
attaccaaat	gagatctgtg	aatgggcaag	ataaaaaaca	aaaattgaaa	tgtttgacgt	6600	
tatgtaaaac	tattaattcc	ttcgctttcg	gcggtcacag	aatttgctg	tagctgactc	6660	
ttgttcaatc	aatatcattt	gttactttat	ttgaaagtct	gtattactgc	gcctattgct	6720	
atccgtacca	aagaacgtca	aaaagaaaca	agataatttt	tgtgcttaca	ccatttatag	6780	
atcaactgac	ccagaatata	gctggagctc	agtgtgaagt	gcatgaacac	aactctgact	6840	
gatcgcacat	attgccgtta	tcataaatac	tagttgtact	tgtcaatgcg	acgaatggca	6900	
tcatgcctat	tattacgttc	ctctttttcc	gtttcatggt	tccagaatgc	tattgaaatc	6960	
aacacttcaa	ttataaaaaa	gaataaatcc	gcaataattt	taggctaatt	gttgtaactgt	7020	
caagcgaacc	taatgggtta	aattcagagg	aaccttcgac	gtagtctgat	cgctacttct	7080	30
atatcttatg	ttcccagtca	atcaaaagtt	gatactataa	tagctgccat	ttatacctgt	7140	
tagttatggc	gatcgtttat	cacggcggcc	gcggtaccta	ataacttcgt	atagcataca	7200	
ttatacgaag	ttatattaag	ggttctcgac	gttttcgaca	ctggatggcg	gcgttagtat	7260	
cgaatcgaca	gcagtatagc	gaccagcatt	cacatacgat	tgacgcatga	tattactttc	7320	
tgcgcaacta	acttcgcatc	tgggcagatg	atgtcgaggc	gaaaaaaaaat	ataaatcacg	7380	
ctaacatttg	attaaaaatag	aacaactaca	atataaaaaa	actatacaaa	tgacaagtcc	7440	
ttgaaaacaa	gaatcttttt	attgtcagta	ctgattagaa	aaactcatcg	agcatcaaat	7500	
gaaactgcaa	tttattcata	tcaggattat	caataccata	tttttgaaaa	agccgtttct	7560	
gtaatgaagg	agaaaactca	ccgaggcagt	tccataggat	ggcaagatcc	tggtatcggt	7620	40

【表 1 1 - 1 3】

ctgcgattcc	gactcgtcca	acatcaatac	aacctattaa	tttcccctcg	tcaaaaataa	7680	
ggttatcaag	tgagaaatca	ccatgagtga	cgactgaate	cggtgagaat	ggcaaaagct	7740	
tatgcatttc	tttccagact	tgttcaacag	gccagccatt	acgctcgtca	tcaaaatcac	7800	
tcgcatcaac	caaaccgtta	ttcattcgtg	attgocgctg	agcgagacga	aatacgcat	7860	
cgctgttaaa	aggacaatta	caaacaggaa	tcgaatgcaa	cggcgagagg	aacactgcca	7920	
gcgcatcaac	aatatthttca	cctgaatcag	gatattcttc	taataacctg	aatgctgttt	7980	
tgccggggat	cgcagtggtg	agtaacctg	catcatcagg	agtacggata	aaatgcttga	8040	10
tggtcgggaag	aggcataaat	tccgtcagcc	agtttagtct	gaccatctca	tctgtaacat	8100	
cattggcaac	gctacctttg	ccatgtttca	gaaacaacte	tggcgcatcg	ggcttcccat	8160	
acaatcgata	gattgtcgca	cctgattgcc	cgacattatc	ggagagccat	ttatacccat	8220	
ataaatcagc	atccatgttg	gaatttaate	gcggcctcga	aacgtgagtc	ttttccttac	8280	
ccatggttgt	ttatgttcgg	atgtgatgtg	agaactgtat	cctagcaaga	ttttaaagg	8340	
aagtatatga	aagaagaacc	tcagtggaac	atcctaacct	tttatatttc	tctacagggg	8400	
cgcgcggtg	ggacaattca	acgcgtctgt	gaggggagcg	tttccctgct	cgcaggtctg	8460	
cagcgaggag	ccgtaattht	tgcttcgctg	cgtgcggcca	tcaaaatgta	tggatgcaaa	8520	
tgattataca	tggggatgta	tgggctaaat	gtacgggoga	cagtcacatc	atgccctga	8580	20
gctgcgcacg	tcaagactgt	caaggagggt	attctgggce	tccatgtcgc	tggccgggtg	8640	
accggcggg	gacgaggcaa	gctaaacaga	tctctagacc	taataacttc	gtatagcata	8700	
cattatacga	agttatatta	agggttgtct	taattaaggg	tgcccaattc	gcctatagt	8760	
gagtcgtatt	acgcgcgctc	actggcgcct	gttttacaac	gtcgtgactg	ggaaaacct	8820	
ggcgttacc	aacttaatcg	ccttgacgca	catccccctt	tggccagctg	gcgtaatagc	8880	
gaagaggccc	gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgca	gcctgaatgg	cgaatggcgc	8940	
gacgcgccct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	9000	
gctacacttg	ccagcgccct	agcgcccgt	cctttcgtct	tcttcccttc	ctttctcgcc	9060	
acgttcgccc	gctttccccg	tcaagcteta	aatcgggggc	tccctttagg	gttccgattt	9120	30
agtgccttac	ggcacctcga	ccccaaaaa	cttgattagg	gtgatggttc	acgtagtggg	9180	
ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacgtt	ctttaatagt	9240	
ggactcttgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggtctattc	ttttgattta	9300	
taagggattt	tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	9360	
aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgttt	acaatttctc	gatgcggtat	tttctcctta	9420	
cgcatctgtg	cggtatttca	caccgcatag	atccgtogag	ttcaagagaa	aaaaaaagaa	9480	
aaagcaaaaa	gaaaaaagga	aagcgcgcct	cgttcagaat	gacacgtata	gaatgatgca	9540	
ttaccttgct	atcttcagta	tcatactggt	cgtatacata	cttactgaca	ttcataggta	9600	40
tacatatata	cacatgtata	tatatcgtat	gctgcagctt	taaataatcg	gtgtcaatgt	9660	

【表 1 1 - 1 4】

ctgcccctat	gtctgcccct	aagaagatcg	tcgttttgcc	aggtgaccac	gttgggtcaag	9720	
aatcacagc	cgaagccatt	aaggttctta	aagctatttc	tgatgttctg	tccaatgtca	9780	
agttcgattt	cgaaaatcat	ttaattgggtg	gtgctgctat	cgatgctaca	ggtgtcccac	9840	
ttccagatga	ggcgtgga	gcctccaaga	aggttgatgc	cgttttgtta	ggtgctgtgg	9900	
gtggtcctaa	atggggtgcc	ggtagtgta	gacctgaaca	aggtttacta	aaaatccgta	9960	
aagaacttca	attgtacgcc	aacttaagac	catgtaactt	tgcatccgac	tctcttttag	10020	
acttatctcc	aatcaagcca	caatttgcta	aaggactga	cttcgttggt	gtcagagaat	10080	10
tagtgggagg	tatttacttt	ggtaagagaa	aggaagacga	tggtgatggt	gtcgcttggg	10140	
atagtgaaca	atacaccggt	ccagaagtgc	aaagaatcac	agaatggcc	gctttcatgg	10200	
ccctacaaca	tgagccacca	ttgcctattt	ggctcttggg	taaagcta	gttttggcct	10260	
cttcaagatt	atggagaaaa	actgtggagg	aaaccatcaa	gaacgaattc	cctacattga	10320	
aggttcaaca	tcaattgatt	gattctgccg	ccatgatcct	agttaagaac	ccaaccacc	10380	
taaatggtat	tataatcacc	agcaacatgt	ttggtgat	catctccgat	gaagcctcog	10440	
ttatcccagg	ttccttgggt	ttggtgccat	ctgcgtcctt	ggcctctttg	ccagacaaga	10500	
acaccgcatt	tggtttgtac	gaaccatgcc	acggttctgc	tccagatttg	caaagaata	10560	
aggttgaccc	tatcgccact	atcttgtctg	ctgcaatgat	gttgaaattg	tcattgaact	10620	20
tgcctgaaga	aggtgaagcc	attgaagatg	cagttaaaa	ggttttggat	gcaggatca	10680	
gaactggtga	tttaggtggt	tccaacagta	ccaccgaagt	cggtgatgct	gtcgccgaag	10740	
aagttaagaa	aatccttgc	taactttgcc	ttcgtttatc	ttgcctgctc	attttttagt	10800	
atattcttcg	aagaaatcac	attactttat	ataatgtata	attcattatg	tgataatgcc	10860	
aatcgctaag	aaaaaaaaag	agtcacccgc	taggggaaaa	aaaaaaaaatga	aatcattac	10920	
cgaggcataa	aaaaatatag	agtgacttag	aggaggccaa	gagtaataga	aaaagaaaat	10980	
tgcgggaaaag	gactgtgta	tgacttccct	gactaatgcc	gtgttcaaac	gataacctg	11040	
agtgactcct	agcgtcacc	aagctcttaa	aacgggaatt	tatggtgcac	tctcagtaca	11100	
atctgctctg	atgccgcata	gttaagccag	ccccgacacc	cgccaacacg	cgtctccggg	11160	30
ccctgacggg	cttgtctgct	cccggcatcc	gcttacagac	aagctgtgac	cgtctccggg	11220	
agctgcatgt	gtcagagggt	ttcaccgtca	tcaccgaaac	gcgcgagacg	aaagggcctc	11280	
gtgatacgcc	tatttttata	ggttaatgtc	atgataataa	tggtttctta	ggacggatcg	11340	
cttgctgta	acttacacgc	gcctcgtatc	ttttaatgat	ggaataattt	gggaatttac	11400	
tctgtgttta	tttattttta	tgttttgat	ttggatttta	gaaagtaaat	aaagaaggta	11460	
gaagagttac	ggaatgaaga	aaaaaaaaata	aacaaagggt	taaaaaattt	caacaaaaag	11520	
cgtactttac	atatatattt	attagacaag	aaaagcagat	taaatagata	tacattcgat	11580	
taacgataag	taaaatgtaa	aatcacagga	ttttcgtgtg	tggtcttcta	cacagacaag	11640	
atgaaacaat	tcggcattaa	tacctgagag	caggaagagc	aagataaaag	gtagtatttg	11700	40

【表 1 1 - 1 5】

ttggcgatcc	ccctagagtc	ttttacatct	tcggaaaaca	aaaactat	tttctttaat	11760	
ttcttttttt	actttctatt	tttaatttat	atatttata	taaaaaatt	aaattataat	11820	
tatttttata	gcacgtgatg	aaaaggaccc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	11880	
aaccctatt	tgtttat	tctaaataca	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	11940	
accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	12000	
tgtcgccctt	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttct	gtttttgctc	accagaaac	12060	
gctggtgaaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	12120	10
ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	12180	
gagcactttt	aaagtctctg	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	cogggcaaga	12240	
gcaactcggg	cgccgcatac	actatttctc	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	12300	
agaaaagcat	cttacggatg	gcatgacagt	aagagaatta	tgacgtgctg	ccataacat	12360	
gagtgataac	actgcggcca	acttacttct	gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	12420	
cgcttttttg	cacaacatgg	gggatcatgt	aactcgctt	gatcggtggg	aaocggagct	12480	
gaatgaagcc	ataccaaaag	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggaacaac	12540	
gttgcgcaaa	ctattaactg	gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	12600	
ctggatggag	gcgataaag	ttgcaggacc	acttctgctc	tcggcccttc	oggtggctg	12660	20
gtttattgct	gataaatctg	gagccggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	12720	
ggggccagat	ggtaagccct	cccgatctgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	12780	
tatggatgaa	cgaaatagac	agatcgctga	gatagggtgc	tactgatta	agcattggta	12840	
actgtcagac	caagtttact	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atTTTTAATT	12900	
taaaaggatc	taggtgaaga	tcotTTTTga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	12960	
gttttcgctc	cactgagcgt	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	13020	
ttttttctg	cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtggt	13080	
ttggttgccg	gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	13140	
gcagatacca	aactactgtc	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	13200	30
tgtagcaccg	cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	13260	
cgataagtcg	tgtcttaccg	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	13320	
gtcgggctga	acggggggtt	cgtgcacaca	gccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	13380	
actgagatac	ctacagcgtg	agctatgaga	aagcggcagc	cttcccgaag	ggagaaaggc	13440	
ggacaggtat	ccgtaagcgc	gcagggctcg	aacaggagag	cgacagagg	agcttccagg	13500	
gggaaacgcc	tggatctttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	13560	
atTTTTgtga	tgctcgtcag	gggggcgag	cctatggaaa	aacggcagca	acgggcctt	13620	
tttacggctc	ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttctg	cgttatcccc	13680	40
tgattctgtg	gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	13740	

【表 1 1 - 1 6】

aacgaccgag	cgcagcgagt	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	13800	
gcctctcccc	gcgcgttggc	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgactg	13860	
gaaagcgggc	agtgagcgca	acgcaattaa	tgtgagttac	ctcactcatt	aggcacccca	13920	
ggcttttacac	tttatgcttc	cgctcctat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	13980	
tcacacagga	aacagctatg	accatgatta	cgccaagcgc	gcaat		14025	
<210>	5						
<211>	684						10
<212>	DNA						
<213>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
<220>							
<221>	Accl promoter						
<222>	(1)..(463)						
<220>							
<221>	gRNA_3						
<222>	(53)..(72)						
<220>							20
<221>	gRNA_2						
<222>	(265)..(284)						
<220>							
<221>	gRNA_1						
<222>	(339)..(358)						
<400>	5						
ggtagaaact	tgatTTTTTc	taatTTTTtG	cgctgTTTTcG	ggaacggaaa	aaaattaagc	60	
tagaagacga	atcggttatt	atactattat	atTTgtatag	tatagtagcg	tgTcgtatcg	120	
tatcgtgtcg	tatcgtatcg	tatcgttaaa	agaaaataca	cgaataaata	ataatatgtg	180	30
gagaagaaaa	agggaagttt	cttGtctctt	Gctctgaatc	tgaattccaa	ttcaagttca	240	
aattgttctc	tagtttattg	tccaaaaata	aggatgaagc	gggagggaag	ggcagagggga	300	
aaagtTogta	tagtagaatg	aataaaacttt	tataaacaca	tgcaccgatc	actcacagag	360	
gataaaaaaaaa	tggcacaaca	aatatatata	tatagatgca	aatggcgatt	gcaaattagg	420	
gaattggctt	tgttGTTTTt	tatcttcagg	taaactgtac	gaaagggata	aaaagagtag	480	
aataaggaaa	ggaaaattga	agagagcaga	acaattgtag	aaccgataac	aattgtgaca	540	
gtgattgtgc	taggctatac	tgtgccagaa	tacgaotggg	agtGctgttc	ttcttatata	600	
tcttggcgct	gattgagcgt	atagcctagt	tcaccaagca	gtagagagag	tggcaatgag	660	
cggttgaatt	tcgactgcga	cttg				684	40

【 0 1 6 8】

【表 1 1 - 1 7】

<210>	6		
<211>	971		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	PGK1 promoter and integration sequences for <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Accl promoter		10
<220>			
<221>	PGK1p		
<222>	(7)..(750)		
<400>	6		
	tgttttatat ttgttgtaaa aagtagataa ttacttcctt gatgatctgt aaaaaagaga	60	
	aaaagaaagc atctaagaac ttgaaaaact acgaattaga aaagaccaa tatgtatttc	120	
	ttgcattgac caatttatgc aagtttatat atatgtaa atgtaagttca cgaggttcta	180	
	ctaaactaaa ccacccctt ggttagaaga aaagagtgtg tgagaacagg ctggtgtgtg	240	
	cacacgattc ggacaattct gtttgaaaga gagagagtaa cagtacgatc gaacgaactt	300	20
	tgctctggag atcacagtgg gcatcatagc atgtggtact aaacccttc cgcattcc	360	
	agaacctcg attgcttgtt acaaaacctg tgagccgtcg ctaggacctt gttgtgtgac	420	
	gaaattggaa gctgcaatca ataggaagac aggaagtcga gcggtgtctgg gttttttcag	480	
	ttttgttctt ttgcaaaca aatcacgagc gacggtaatt tctttctcga taagaggcca	540	
	cgtgctttat gagggtaaca tcaattcaag aaggaggaa aacttctt tttctgccc	600	
	tgataatagt atgaggtga agccaaaata aaggattcgc gcccaatcg gcatctttaa	660	
	atgcaggtat gcgatagttc ctactcttt cttactcac gagtaattct tgcaaatgcc	720	
	tattatgcag atgttataat atctgtgctg agggataaaa agagtagaat aaggaaagga	780	
	aaattgaaga gagcagaaca attgtagaac cgataacaat tgtgacagtg attgtgctag	840	30
	gctatactgt gccagaatac gactgggagt gctgttcttc ttatatactc tggcgctgat	900	
	tgagcgtata gcctagttca ccaagcagta gagagagtgg caatgagcgg ttgaatttcg	960	
	actgogactt g	971	
<210>	7		
<211>	1724		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Cassette with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Accl (S659A; S1167A)		40

【表 1 1 - 1 8】

coding sequence, regulatory sequences and integration sequences			
<220>			
<221>	T-G Ser659Ala		
<222>	(108)..(108)		
<220>			
<221>	T-G ser1167ala		
<222>	(1602)..(1602)		10
<400>	7		
ggcgcgcoga	gggtaaaaga	tacaagttca	cggtcgctaa atccggtaat gaccgctaca 60
cattatattat	caatggttct	aatgtgata	tcatactgcg tcaactagct gatggtgggc 120
tgctgatogc	tatcggcgct	aatcgcata	ccatctattg gaaagaagaa gttgctgcta 180
caagattatc	cgttgactct	atgactactt	tgttggaagt tgaaaacgat ccaaccagct 240
tgcgtactcc	atcccctggg	aaattgggta	aattcttggg ggaaaatggg gaacacatta 300
tcaagggcca	accatatgca	gaaattgaag	ttatgaaaat gcaaatgcct ttggtttctc 360
aagaaaatgg	tatcgtccag	ttattaaagc	aacctggttc taccattggt gcaggtgata 420
tcattggctat	tatgactctt	gacgatccat	ccaaggtcaa gcacgctcta ccatttgaag 480 20
gtatgctgcc	agatcttggg	tctccagtta	tcgaaggaac caaacctgcc tataaattca 540
agtcattagt	gtctactttg	gaaaacattt	tgaagggtta tgacaaccaa gttattatga 600
acgcttcctt	gcaacaattg	atagaagttt	tgagaaatcc aaaactgcct tactcagaat 660
ggaaactaca	catctctgct	ttacattcaa	gattgcctgc taagctagat gaacaaatgg 720
aagagttagt	tgacagttct	ttgagacgtg	gtgctgtttt cccagctaga caattaagta 780
aattgattga	tatggccgtg	aagaatcctg	aatacaacc cgcacaaattg ctgggcgcag 840
tcgtggaacc	attggcggat	attgctcata	agtactctaa cggggttagaa gcccatgaac 900
attctatatt	tgtccatttc	ttggaagaat	attacgaagt tgaaaagtta ttcaatggtc 960
caaatgttcg	tgaggaaaat	atcattctga	aattgcgtga tgaaaaccct aaagatctag 1020 30
ataaagttgc	gctaactggt	ttgtctcatt	cgaaagtttc agcgaagaat aacctgatcc 1080
tagctatctt	gaaacattat	caaccattgt	gcaagttatc ttctaaagtt tctgccattt 1140
tctctactcc	tctacaacat	attggtgaac	tagaatctaa ggctaccgct aaggtcgctc 1200
tacaagcaag	agaaatcttg	attcaaggcg	ctttaccttc ggtcaaggaa agaactgaac 1260
aaattgaaca	tatcttaaaa	tcctctgttg	tgaaggttgc ctatggctca tccaatccaa 1320
agcgcctctga	accagatctg	aatatcttga	aggacttgat cgattctaat tacgttgtgt 1380
tcgatgtttt	acttcaattc	ctaaccatc	aagaccaggt tgtgactgct gcagctgctc 1440
aagtctatat	tcgtcgtgct	tatcgtgctt	acaccatagg agatattaga gttcacgaag 1500
gtgtcacagt	tccaattggt	gaatggaaat	tccaactacc ttcagctgcg ttctccacct 1560 40

【 0 1 6 9 】

【表 1 1 - 1 9】

ttccgactgt gaagtctaag atgggtatga acagggctgt tgctgtttca gatttgcatt	1620	
atgttgcaaa cagtcagtca tctccgttaa gagaaggat ttgatggct gtggatcatt	1680	
tagatgatgt tgatgaaatt ttgtcacaaa gtttggggcg cgcc	1724	
<210> 8		
<211> 3256		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Cassette with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Maf1 coding sequence, regulatory sequences and integration sequences		
<220>		
<221> L0		
<222> (362)..(401)		
<220>		
<221> Tef1		
<222> (402)..(895)		20
<220>		
<221> L1		
<222> (896)..(935)		
<220>		
<221> MAF1		
<222> (936)..(2123)		
<220>		
<221> L2		
<222> (2124)..(2163)		30
<220>		
<221> PRM9t		
<222> (2164)..(2701)		
<220>		
<221> LTP2		
<222> (2702)..(2741)		
<400> 8		
aatgatttaa gcgtgctga agataaact acaatccatt ttaaagcaac atccacattg	60	
agtgtatata ccacaaagg ttttcaggg cgtttttctc gccactttat gttgacccaa	120	40

【表 1 1 - 2 0】

attattaatg gaacttaciaa cgtttccaaa agttagttaa atacatacgt ctatttacta	180	
agcaagaaat atatcatgac aagcccaaat attatattgt tatgtttaca aaaaaaaaaat	240	
ggctatatac atcaagtctg gaggcttttt ataacaagca agtggggtaa cttagacata	300	
agattgactt ctttgaattc aacaaaaata catacttttg atgatttcaa tggtagaagc	360	
ataaacaaca aataatcata aaaattttag aactagacat aaagcaacag gcgcgttggg	420	
cttttaattt tcgaggaccg cgaatcctta catcacaccc aatccccac aagtgatccc	480	
ccacacacca tagcttcaaa atgtttctac tcctttttta ctcttcaga ttttctogga	540	10
ctccgcgat cgccgtacca cttcaaaaca cccaagcaca gcatactaaa tttcccctct	600	
ttcttctctt aggggtgctg taattaccog tactaaagggt ttggaaaaga aaaaagagac	660	
cgctctggtt ctttttcttc gtcgaaaaag gcaataaaaa tttttatcac gtttcttttt	720	
cttgaaaatt tttttttttg atttttttct ctttcgatga cctcccattg atatttaagt	780	
taataaacgg tcttcaattt ctcaagtttc agtttcatth ttcttgttct attacaactt	840	
tttttacttc ttgctcatta gaaagaaagc atagcaatct aatctaagtt ttaatctaga	900	
aaatttatta taaaaggaag agaaataatt aaacaatgaa atttattgat gagctagata	960	
tagagagagt gaatcaaac ctcaatctcg agacaaatga ctgtaaaatc gtgggcagtt	1020	
gcgatatttt cacaacaaag gcggttgcat cagatagaaa attatataaa actattgatc	1080	20
agcatttgga tactatttta caggaaaatg agaattacaa tgctaccctt cagcaacagc	1140	
tagctgctcc cgaaacaaac caatcacctt gctcgtcgcc attttattct aataggaggg	1200	
atagcaactc tttttgggag caaaagagaa gaatatcttt tagtgaatac aatagcaata	1260	
ataacactaa caacagtaat ggcaatagca gtaataacaa taactattct ggacctaatg	1320	
gttcttctcc agcaactttt cccaaaagtg ccaagctaaa tgaccaaaat ttaaaagaat	1380	
tagtctcgaa ttacgattct ggctctatga gctcatcgtc tcttgattct tcttctaaga	1440	
atgatgagag gataagaaga aggagcagta gcagtattag cagtttcaaa agtggtaaat	1500	
catcgaacaa taattacagt tctggtacag caaccaacaa tgtaacaaa agaagaaaat	1560	
cttcgataaa cgaaaggcca agcaatttaa gtttgggtcc gtttgggtccc ataaacgaac	1620	30
cgtaagccg caaaatattt gcttatctga ttgctatcct caacgcttct tatcctgacc	1680	
atgatttttc atcggttgag ccaacggatt ttgtcaaac atcattgaaa acttttattt	1740	
caaaatttga aaacacctta tattctcttg gtagacaacc agaggaaatgg gtctgggag	1800	
taattaatte tcacatgact ctttctgatt gcgtcctttt tcaatattca ctttcaaact	1860	
cttttttggg agatgagcct ggctatcttt ggaatcttat aggttttctt tacaacagga	1920	
aaaggaaaag agtggcttac ctttacttga tttgctcgcg tctaaattcg agtacaggcg	1980	
aagtggaaga tgccttggca aaaaaacctc agggaaagct tataatagat gatggctcaa	2040	
atgaatacga aggagaatac gatttcactt atgatgagaa tgtaatagat gataaatcag	2100	40
atcaagaaga atccctacag tagagacata aaactgaaac aacaccaatt aataatagac	2160	

【表 1 1 - 2 1】

tttaçagaag acgggagaca ctagcacaca actttaccag gcaaggtatt tgacgctagc	2220	
atgtgtccaa ttcagtgtca tttatgattt tttgtagtag gatataaata tatacagcgc	2280	
tccaaatagt gcggttgccc caaaaacacc acggaacctc atctgttctc gtactttggt	2340	
gtgacaaagt agctcactgc cttattatca ctttttcatt atgcaacgct tcggaaaata	2400	
cgatgttgaa aatgcctcta gagatgaaaa acaatcgtaa aagggtcctg cgtaattgaa	2460	
acatttgatc agtatgcagt ggcacagaaa caaccaggaa tactatagtc ataggcaata	2520	
caaggtatat attggctatg cagaccctc cagaaagtac cgacgtcaag ttagatacac	2580	10
ttaacgaacc tagtgcacat ttaattgaga aaaatgtggc tcttcttaag gacatattcc	2640	
gttcgtactt gagttattgg atctatgaaa tcgctcgcta tacaccagtc atgattttgt	2700	
ccttaataaa catactcatc actaaacatt cttaacaatc agaaaacaac gcgtcatgaa	2760	
aaagagttac tgaaccttca gatcctactt attgtaatgc ttcgcgacat ccaatccatt	2820	
taataatcaa tttaaaacta gagttggtag agttccttgt tgaacgtgat aacccaaaag	2880	
cataatacga gtaatgtttc agtattgcta ttatatgttt acacaaggaa aacatataat	2940	
aacaaacctc taatccggta gtacttaaga aactatagtt tctatgtaca aaaaggtaac	3000	
tatgtaattc ttacatttac ataacgtata gaagggtcca ataaacttac taaacttact	3060	
accttgttgt atataggcta gatcgtaatc cactacgtca acataaaaa aacttaagaa	3120	20
gtttgaattt tatgtacaaa cagattgtta aatataata taagattatg gaaacgaact	3180	
tgctctaaaa aaaatttaaa gttttataaa atcctcgaac tatcgtgttt atacatgatg	3240	
tccccaagc gtgtac	3256	
<210> 9		
<211> 4662		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Cassette with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UPC2E888D coding sequence, regulatory sequences and integration sequences		30
<220>		
<221> L0		
<222> (401)..(440)		
<220>		
<221> Tef1		
<222> (441)..(934)		
<220>		
<221> L1		40

【表 1 1 - 2 2】

<222>	(935)..(974)						
<220>							
<221>	UPC2-1						
<222>	(975)..(3701)						
<220>							
<221>	g-a G888D						
<222>	(3637)..(3637)		10				
<220>							
<221>	L2						
<222>	(3702)..(3741)						
<220>							
<221>	PRM9t						
<222>	(3742)..(4279)						
<220>							
<221>	LTP2						
<222>	(4280)..(4319)		20				
<400>	9						
cccagttggt	tgtagctggt	tcatatntag	cggaattct	ctggtgcgta	aatgaaaata	60	
ttaatgtaaa	caaaaaaaga	ccaaaacatt	ttagcagtggt	aagaagggtg	actgatacaa	120	
aatgtgttta	gagtctactg	atatgttact	gaccgttcgt	tgggaaaaaa	atactgtatc	180	
atattattaat	caaaagcgac	ttttggtgga	atattatgat	atgtgttggt	aaaatatgac	240	
gtaatnttag	aattgtctga	ttcgtattca	aatttgggtga	aggaataacg	cagagttgac	300	
aatttaatatag	aatggattaa	tcgtaatttt	cagaaacgta	gaaaaagaaa	aacaattaaa	360	
acattatatt	aagattattg	atgtgccttt	taagggtcca	taaacaacaa	ataatcataa	420	
aaatnttaga	actagacata	aagcaacagg	cgcgttggac	ttttaatttt	cgaggaccgc	480	30
gaatccttac	atcacacca	atccccaca	agtgatcccc	cacacacat	agcttcaaaa	540	
tgtttctact	ccttttttac	tcttccagat	tttctcggac	tccgcgcac	gccgtaccac	600	
ttcaaaacac	ccaagcacag	catactaaat	ttccctctt	tcttccctta	gggtgctggt	660	
aattaccogt	actaaagggt	tggaaaagaa	aaaagagacc	gcctcgtttc	tttttcttcg	720	
tcgaaaaagg	caataaaaat	ttttatcacg	tttctttttc	ttgaaaattt	ttttttttga	780	
tttttttctc	tttcgatgac	ctcccattga	tatttaagtt	aataaacggt	cttcaatttc	840	
tcaagtttca	gtttcatttt	tcttgttcta	ttacaacttt	ttttacttct	tgctcattag	900	
aaagaaagca	tagcaatcta	atctaagttt	taatctagaa	aattttattat	aaaaggaaga	960	
gaaataatta	aacaatgagc	gaagtcggta	tacagaatca	caagaaagcg	gtgacaaaac	1020	40

【表 1 1 - 2 3】

ccagaagaag	agaaaaagtc	atcgagctaa	ttgaagtgga	cggcaaaaag	gtgagtacga	1080	
cttcaaccgg	taaacgtaaa	ttccataaca	aatcaaagaa	tgggtgogat	aactgtaaaa	1140	
gaagaagagt	taagtgtgat	gaagggaagc	cagcctgtag	gaagtgcaca	aatatgaagt	1200	
tggaatgtca	gtatacacca	atccatttaa	ggaaaggtag	aggagcaaca	gtagtgaagt	1260	
atgtcacgag	aaaggcagac	ggtagcgtgg	agtctgattc	atcggtagat	ttacctccta	1320	
cgatcaagaa	ggagcagaca	ccgttcaatg	atatccaatc	agcggtaaaa	gcttcaggct	1380	
catccaatga	ttcctttcca	tcaagcgctt	ctacaactaa	gagtgcagagc	gaggaaaagt	1440	10
catcggcccc	tatagaggac	aaaaacaata	tgactcctct	aagtatgggc	ctccagggta	1500	
coatcaataa	gaaagatatg	atgaataact	ttttctctca	aatggcact	attggttttg	1560	
gttctcctga	aagattgaat	tcaggtatcg	atggcttact	attaccgcca	ttgccttctg	1620	
gaaatatggg	tgcgttccaa	cttcagcaac	agcagcaagt	gcagcagcaa	tctcaaccac	1680	
agaccaagc	gcagcaagca	agtggaaactc	caaacgagag	atatggttca	ttcgatcttg	1740	
cgggtagtcc	tgcatgcaa	tccacgggaa	tgagcttatac	aatagtcta	agcgggatgt	1800	
tactatgtaa	caggattcct	tccggccaaa	actaacctca	acaacaatta	caatatcaat	1860	
tacaccagca	gctgcaattg	caacagcattc	agcaagttca	gctgcagcag	tatcaacaat	1920	
tacgtcagga	acaacaccaa	caagttcagc	aacaacaaca	ggaacaactc	cagcaatacc	1980	20
aacaacattt	tttgcaacag	cagcaacaag	tactgcttca	gcaagagcaa	caacctaacc	2040	
atgaggaagg	tggcgttcag	gaagaaaaca	gcaaaaaggt	aaaggaagg	cctttacaat	2100	
cacaaacaag	cgaaactact	ttaaacagcg	atgctgctac	attacaagct	gatgcattat	2160	
ctcagttaag	taagatgggg	ctaagcctaa	agtcgttaag	tacctttcca	acagctggta	2220	
ttggtggtgt	ttcctatgac	tttcaggaac	tgtaggtat	taagtttcca	ataaataacg	2280	
gcaattcaag	agctactaag	gccagcaacg	cagaggaagc	tttggccaat	atgcaagagc	2340	
atcatgaacg	tgtagctgct	tctgtaaagg	agaatgatgg	tcagctctct	gatacgaaga	2400	
gtccagcgcc	atcgaataac	gccaagggg	gaagtgctag	tattatggaa	cctcagggcg	2460	
ctgatgcggt	ttcgacaatg	gcgctatat	caatgattga	aagaaacatg	aacagaaaaca	2520	30
gcaacatttc	tccatcaacg	ccctctgcag	tgtagaatga	taggcaagag	atgcaagatt	2580	
ctataagttc	tctaggaat	ctgacaaaag	cagccttgga	gaacaacgaa	ccaacgataa	2640	
gtttacaaac	atcacagaca	gagaatgaag	acgatgcatac	gcggcaagac	atgacctcaa	2700	
aaattaataa	cgaagctgac	cgaagttctg	tttctgctgg	taccagtaac	atcgetaagc	2760	
ttttagatct	ttctaccaa	ggcaatctga	acctgataga	catgaaactg	tttcatcatt	2820	
attgcacaaa	ggtctggcct	acgattacag	cggccaaagt	ttctgggcct	gaaatatgga	2880	
gggactacat	accggagtta	gcatttgact	atccatTTTT	aatgcacgct	ttgttggcat	2940	
tcagtgccac	ccatctttcg	aggactgaaa	ctggactgga	gcaatacgtt	tcctctcac	3000	40
gcttagacgc	tctgagatta	ttaagagaag	ctgtttttaga	aatatctgag	aataacaccg	3060	

【表 1 1 - 2 4】

atgcgctagt	tgccagcgcc	ctgatactaa	tcatggactc	gttagcaaat	gctagtggtg	3120	
acggcactgt	aggaaaccaa	agtttgaata	gcatgtcacc	aagcgcttgg	atctttcatg	3180	
tcaaaggtgc	tgcaacaatt	ttaaccgctg	tgtggccttt	gagtgaaaga	tctaaatttc	3240	
ataacattat	atctgttgat	cttagcgatt	taggcgatgt	cattaaccct	gatggttgaa	3300	
caattactga	attggatgt	tttgatgaaa	gtattgccga	tttgtatcct	gtcggcttag	3360	
attcgccata	tttgataaca	ctagcttatt	tagataaatt	gcaccgtgaa	aaaaccagg	3420	
gtgattttat	tctgcgggta	tttacatttc	cagcattgct	agacaagaca	ttcctggcat	3480	10
tactgatgac	aggtgattta	ggtgcaatga	gaattatgag	atcatattat	aaactacttc	3540	
gaggatttgc	cacagaggtc	aaggataaag	tctggtttct	cgaaggagtc	acgcaggtgc	3600	
tgctcaaga	cgttgatgag	tacaggggag	gtggtgatat	gcatatgatg	ctaggattac	3660	
catcgatgac	aacaacaaat	ttctctgatt	tttcgttatg	aagacataaa	actgaaacaa	3720	
caccaattaa	taatagactt	tacagaagac	gggagacact	agcacacaac	ttaccaggc	3780	
aaggtatttg	acgctagcat	gtgtccaatt	cagtgtcatt	tatgattttt	tgtagtagga	3840	
tataaatata	tacagcgctc	caaatagtgc	ggttgcccca	aaaacaccac	ggaacctcat	3900	
ctgttctcgt	actttgttgt	gacaaagtag	ctcactgcct	tattatcaca	ttttcattat	3960	
gcaacgcttc	ggaaaatacg	atggtgaaaa	tgctctaga	gatgaaaaac	aatcgtaaaa	4020	20
gggtcctgcg	taattgaaac	atgtgatcag	tatgcagtgg	cacagaaaca	accaggaata	4080	
ctatagtcat	aggcaatata	aggtatatat	tggctatgoa	gaccctcca	gaaagtaccg	4140	
acgtcaagtt	agatacactt	aacgaaccta	gtgcacattt	aattgagaaa	aatgtggctc	4200	
ttcctaagga	catattccgt	tcgtacttga	gttattggat	ctatgaaatc	gctcgctata	4260	
caccagtcat	gattttgtcc	ttaaataaca	tactcatcac	taaacattct	taacaatcac	4320	
gatggatgat	gattggttct	tatcataatt	tgatttcggc	agaagcaata	ttagaggtat	4380	
tgttgtaacg	aaattccaat	gtcatctgct	tagtattatt	aatgttacct	gcatattatc	4440	
acatgccgct	taaaaatgtg	ttataagtat	taaaatctag	tgaaagttga	aatgtaatct	4500	
aataggataa	tgaaacatat	gaaacggaat	gaggaataat	cgttgtatta	ctatgtagag	4560	30
atatcgattt	cattttgagg	attcctatat	tcttggggag	aacttctact	atattctgta	4620	
tacatgatat	aatagccttt	accaacaatg	gaatgccaac	aa		4662	
<210>	10						
<211>	3564						
<212>	DNA						
<213>	Artificial Sequence						
<220>							
<223>	Cassette with <i>Aspergillus nidulans</i> NpgA coding sequence, regulatory sequences and integration sequences						40

【表 1 1 - 2 5】

<220>			
<221>	LTP1 (L0)		
<222>	(596)..(635)		
<220>			
<221>	Tef1p		
<222>	(636)..(1129)		
<220>			10
<221>	L1		
<222>	(1130)..(1169)		
<220>			
<221>	NpgA		
<222>	(1170)..(2201)		
<220>			
<221>	L2		
<222>	(2205)..(2244)		
<220>			20
<221>	PRM9t		
<222>	(2245)..(2782)		
<220>			
<221>	LTP2		
<222>	(2783)..(2822)		
<400>	10		
tcaatcaaag caaccacaa atcctaggct gaatcatgat atcgatggaa gcaatcaaca		60	
attttatcaa gaccgcacca aagcacgact atctgacagg cggagttcat cattctggta		120	
atgtagacgt gttacaatta agcggcaata aagaagatgg tagtttagta tggaaccata		180	30
cttttgttga tgtagacaac aatgtggtag ctaagtttga agacgctctc gaaaaacttg		240	
aaagtttgca cggcgctca tcctcatcca caggcaatga agaacacgct aacgtttaac		300	
cgaggggagt cacttcataa tgatgtgaga aataagtga tattgtaata attgttggga		360	
ctccattgtc aacaaaagct ataatgtagg tatacagtat atactagaag ttctcctcga		420	
ggatcttgga atccacaaaa gggagtcgat aaatctatat aataaaaatt actttatctt		480	
ctttcgtttt atacgttgtc gtttattatc ctattacggt atcaatcttc gcatttcagc		540	
tttcattaga tttgatgact gtttctcaaa ctttatgtca ttttcttaca cgcataaac		600	
aacaaataat cataaaaatt ttagaactag acataaagca acaggcgcgt tggactttta		660	
attttcgagg accgcgaatc cttacatcac acccaatccc ccacaagtga tccccacac		720	40

【表 1 1 - 2 6】

accatagctt	caaaatgttt	ctactccttt	tttactcttc	cagattttct	cggactccgc	780	
gcategccgt	accacttcaa	aacacccaag	cacagcatac	taaatttccc	ctctttcttc	840	
ctctaggggtg	tcgttaatta	cccgtactaa	aggtttggaa	aagaaaaaag	agaccgcctc	900	
gtttctttttt	cttcgctgaa	aaaggcaata	aaaattttta	tcacgtttct	ttttcttgaa	960	
aatTTTTTTTT	tttgattttt	ttctctttcg	atgacctccc	attgatattt	aagttaataa	1020	
acggctcttca	atTTctcaag	tttcagtttc	atTTTTcttg	ttctattaca	actTTTTtta	1080	
cttcttgctc	attagaaaga	aagcatagca	atctaatac	agttttaatc	tagaaaattt	1140	10
attataaaag	gaagagaaat	aattaacaa	tggttcaaga	tacctcttct	gcttctacct	1200	
ctccaatttt	gactagatgg	tacattgata	ccagaccatt	gactgcttct	actgctgctt	1260	
tgccattatt	ggaaacttta	caaccagccg	atcaaatac	cgttcaaaag	tactatcact	1320	
tgaaggacaa	gcacatgtct	ttggcttcta	acttgttgaa	gtacttgttc	gttcacagaa	1380	
actgcagaat	tccatggctc	tctatcgTTa	tttctagaac	tccagatcca	catagaaggc	1440	
catgttatat	tccaccatct	ggttctcaag	aggattcttt	taaagatgg	tacaccggt	1500	
tcaacgtoga	gtttaatgTT	tctcatcaag	cctccatgg	tgctattgct	ggtactgctt	1560	
ttactccaaa	ttctggTgg	gattctaagt	tgaaccaga	agttggTatc	gatattacct	1620	
gcgtcaacga	aagacaagg	agaaatggTg	aagaaaggTc	cttggaatct	ttgagacagt	1680	20
acatcgatat	cttctccgaa	gttttctcta	ctgctgaaat	ggccaacatt	agaagattgg	1740	
atggTgtctc	ttcttctca	ttgtctgctg	atagattggT	tgattatggc	tacaggTtgt	1800	
tctatactta	ctgggctttg	aaagaagcct	acattaagat	gactggTgaa	gccttgTtgg	1860	
ctccatggTt	gagagaattg	gaattctcta	atgTtggTgc	tccagctgct	gttgcTgaat	1920	
ctggTgattc	tgctggTgat	ttggTgaa	catatactgg	tgTtagaacc	accttgTaca	1980	
agaactTggT	tgaagatgTt	agaattgaag	ttgctgcttt	gggTggTgat	tactTgTttg	2040	
ctactgctgc	tagaggTggT	ggTattggTg	cttctcttag	accaggTggT	ggTccagatg	2100	
gttctggTat	tagatctcaa	gatcctTgga	ggccattcaa	gaagTtggat	attgaaaggg	2160	
atattcaacc	atgtgctact	ggTgatgTa	actgctTgTc	ttaaagacat	aaaactgaaa	2220	30
caacaccaat	taataataga	ctttacagaa	gacgggagac	actagcacac	aactttacca	2280	
ggcaaggTat	ttgacgctag	catgtgtcca	attcagTgTc	atTtatgatt	ttttgtagTa	2340	
ggatataaat	atatacagcg	ctccaaatag	tgcggTtgc	ccaaaaacac	cacggaacct	2400	
catctgTtct	cgtactTtTg	tgtgacaaag	tagctcactg	ccttattatc	acattTtcat	2460	
tatgcaacgc	ttcggaaaat	acgatgTtga	aatgctctct	agagatgaaa	aacaatcgTa	2520	
aaagggtcct	gcgtaattga	aacattTgat	cagTatgcag	tggcacagaa	acaaccagga	2580	
atactatagt	cataggcaat	acaaggTata	tattggctat	gcagaccctc	ccagaaagTa	2640	
ccgacgtcaa	gTtagataca	cttaacgaac	ctagTgcaca	tttaattgag	aaaaatgTgg	2700	40
ctcttctctaa	ggacatattc	cgttctgact	tgagTtattg	gatctatgaa	atcgctcgct	2760	

【表 1 1 - 3 0】

Trp	Thr	Gln	Asp	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Ser	Tyr	Tyr	Gln	Leu	
		275					280					285				
Pro	Ala	Gly	Tyr	Glu	Pro	Ile	Arg	Gln	Met	Glu	Ile	His	Lys	Glu	Gln	
		290				295						300				
Gly																
305																
<210>	13															10
<211>	299															
<212>	PRT															
<213>	Streptomyces sp CL190															
<400>	13															
Met	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Leu	Glu	Thr	Val	Phe	Ser	Ala	Val	Glu	Glu	
1				5					10					15		
Thr	Ala	Arg	Leu	Val	Asp	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Glu	Lys	Val	Trp	Pro	
			20					25					30			
Ala	Leu	Glu	Thr	Phe	Gly	Arg	Trp	Phe	Asp	Asp	Ala	His	Ile	Ile	Phe	
			35				40					45				
Ser	Met	Gly	Thr	Gly	His	Lys	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Ala	Phe	Asp	Phe	
		50				55						60				
Thr	Val	Pro	Pro	Glu	Ala	Gly	Asp	Pro	Tyr	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Gly	
65					70					75					80	
Gly	Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Asp	His	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	Phe	Ser	Glu	
				85					90					95		
Ile	Gly	Asp	Arg	Phe	Pro	Val	Asp	Ala	Tyr	Ala	Val	Asp	Tyr	Gly	Val	
			100					105					110			30
Arg	Gly	Gly	Phe	Lys	Lys	Ala	Cys	Val	Phe	Phe	Pro	Leu	Ala	Arg	Pro	
			115				120						125			
Gln	Ser	Met	Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Pro	Ala	Leu	
						135						140				
Ala	Ala	His	Ala	Glu	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Asp	Gly	Lys	Val	
145					150					155					160	
Ser	Cys	Ile	Gly	Ile	Asp	Tyr	Gly	Ser	Arg	Thr	Trp	Asn	Leu	Tyr	Ile	
				165					170					175		40

【表 1 1 - 3 1】

Ser Gly Leu Thr Pro Asp Tyr Thr Arg Pro Asp Ala Ile Val Ala Thr		
180	185	190
Leu Gly Glu Met Gly Leu Ser Lys Pro Ser Glu His Met Leu Glu Phe		
195	200	205
Ile Ser Thr Ser Phe Ala Met Tyr Pro Thr Phe Gly Trp Asp Thr Thr		
210	215	220
Arg Ile Glu Arg Met Cys Phe Ser Thr Arg Thr Ser Asp Pro Asn Leu		10
225	230	235 240
Leu Pro Ala Arg Ile Glu Pro Asp Val Ala Lys Phe Ala Arg Asp Met		
245	250	255
Pro Thr Val His Gly Gly Glu Pro Ser Tyr Val Tyr Ala Gly Thr Val		
260	265	270
Ala Arg Gly Glu Glu Phe Phe Lys Leu Ala Ser Tyr Tyr Gln Met Ser		
275	280	285
Ser Lys Val Ser Glu Arg Val Arg Pro Ala Asp		20
290	295	
<210> 14		
<211> 304		
<212> PRT		
<213> Streptomyces sp CL190		
<400> 14		
Met Ser Gly Ala Lys Asp Val Glu Arg Val Tyr Ser Ala Met Glu Glu		
1	5	10 15
Ala Ala Gly Leu Leu Asn Val Pro Val Ala Arg Asp Lys Ile Trp Pro		30
20	25	30
Val Leu Thr Ala Tyr Gln Asp Ala Leu Ala Asp Ala Val Ile Val Phe		
35	40	45
Ser Met Ala Gly Gly Arg Arg Ser Thr Glu Leu Asp Phe Ser Ile Ser		
50	55	60
Val Pro Thr Asp His Gly Asp Pro Phe Thr Thr Ala Leu Glu Arg Gly		
65	70	75 80
Leu Thr Glu Lys Glu Asn His Pro Val Asp Asn Leu Leu Ala Glu Leu		40
85	90	95

【表 1 1 - 3 2】

Arg Asp Gly Phe Pro Leu Gly Met Tyr Ala Ile Asp Gly Met Val Thr		
100	105	110
Thr Gly Phe Lys Lys Ala Tyr Ala Ser Phe Pro Thr Asn Glu Pro Gln		
115	120	125
Pro Leu Thr Ala Leu Leu Asp Leu Pro Ser Met Pro Glu Ser Ala Arg		
130	135	140
Ala Asn Ala Glu Leu Phe Ala Arg Tyr Gly Leu Asp Lys Val Gln Met		10
145	150	155
Val Ser Val Asp Tyr Pro Lys Arg Gln Val Asn Leu Tyr Phe Ser Asp		
165	170	175
Leu Asn Ala Asp His Leu Thr Pro Glu Glu Val Lys Ser Thr Ala Ser		
180	185	190
Glu Met Gly Leu Val Glu Pro Thr Asp Met Ala Leu Asp Phe Ala Thr		
195	200	205
Gly Ser Phe Ala Val Tyr Pro Thr Leu Gly Tyr Asp Ser Asp Val Val		20
210	215	220
Asp Arg Ile Thr Tyr Ala Val Ile Ser Val Asp Pro Thr Leu Ala Pro		
225	230	235
Thr Thr Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ile Thr Thr Tyr Ala Asn Ser		
245	250	255
Ala Pro Tyr Ala Tyr Ala Gly Glu Asn Arg Thr Leu Val Tyr Gly Phe		
260	265	270
Thr Leu Thr Ser Lys Glu Glu Tyr Tyr Lys Leu Gly Ser Tyr Tyr Gln		30
275	280	285
Ile Thr Asp Leu Gln Arg Thr Leu Val Lys Ala Phe Glu Ala Leu Asp		
290	295	300
<210> 15		
<211> 299		
<212> PRT		
<213> Streptomyces sp CL190		
<400> 15		
Met Ser Ala Glu Pro Ala Ile Glu Arg Leu Cys Val Ala Ala Glu Asp		40
1	5	10
		15

【表 1 1 - 3 3】

Ala Ala Gly Ile Val Gly Leu Glu Cys Pro Arg Glu Lys Met Thr Ala		
20	25	30
Val Leu Thr Ala Phe Pro Asn Val Val Thr Asp Ser Thr Val Val Phe		
35	40	45
Asn Val Val Asn Lys Gly Gly Arg Val Gly Asp Met Ser Phe Asp Phe		
50	55	60
Thr Val Pro Leu Ala Ala Gly Asp Pro Tyr Glu Arg Ala Leu Ala His		10
65	70	75
Gly Leu Ala Glu Lys Thr Asn His Pro Val Arg Gly Met Phe Ala Asp		
85	90	95
Met Leu Thr Thr Leu Pro Val Asp Cys Tyr Gly Val Asp Tyr Gly Val		
100	105	110
Asn Gly Gly Phe Asn Lys Ala Tyr Ala Val Phe Pro Met Gly Arg Leu		
115	120	125
Gln Glu Leu Asp Lys Leu Ala Ala Val Pro Ala Met Ala Asp Thr Leu		20
130	135	140
Ser Lys Trp Met Gly Gln Leu Val Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Arg Val		
145	150	155
Ser Thr Val Ala Val Asp His Ala Asn Arg Thr Trp Asn Val Tyr Phe		
165	170	175
Asn Gly Leu Ser Ala Glu His Phe Glu Arg Pro Thr Leu Gln Ala Met		
180	185	190
Ile Arg Asp Phe Gly Leu Pro Glu Pro Ser Ala Gln Leu Leu Asp Phe		30
195	200	205
Ala Glu Thr Ser Ser Ala Leu Tyr Pro Thr Phe Ser Trp Asp Ser Pro		
210	215	220
Glu Ile Glu Arg Val Ser Phe Ser Thr Arg Thr Thr Asp Pro Asn Ala		
225	230	235
Leu Pro Ala His Val Glu Pro Lys Leu Gly Ala Leu Ala Ala Asn Ala		
245	250	255
Pro Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Arg Arg Leu Val Phe Ala Gly Ala Leu		
260	265	270
Thr Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Lys Leu Ala Thr Tyr Tyr Gln Met Ala		40
275	280	285

【表 1 1 - 3 6】

Pro Ala Ala Arg Leu Ala Glu Ile Pro Ser Val Pro Arg Ala Val Ala		
130	135	140
Asp Asn Ala Gly Leu Phe Ala Arg Tyr Gly Leu Asp Arg Val Ala Met		
145	150	155 160
Val Gly Val Asp Tyr Gln Arg Arg Thr Met Asn Leu Tyr Phe Gln Phe		
	165	170 175
Thr Pro Asp Gly Arg Pro Glu Pro Gly Ala Leu Arg Ser Met Leu Arg		10
	180	185 190
Glu Ile Gly Leu His Glu Ala Asp Glu Gly Met Leu Glu Phe Ala Ser		
	195	200 205
Arg Ser Met Arg Ala Asn Ile Thr Phe Ser Trp Asp Thr Ser Arg Ile		
	210	215 220
Val Arg Val Ala Phe Ala Pro Pro Pro Gly Lys Gly Leu Asp Pro Ala		
225	230	235 240
Ala Val Pro Ala Pro Ile Glu Pro His Ile Ala Arg Phe Ala Thr Ser		20
	245	250 255
Ala Pro Tyr Ala Tyr Ala Gly Glu Arg Met Asn Leu Phe Gly Val Lys		
	260	265 270
Trp Phe Pro Asp Gly Glu Phe Ile Asp Val Cys Ala Tyr Tyr Gln Leu		
	275	280 285
Ser Ala Gly Tyr Glu Pro Val Arg Leu Met Glu Thr His Lys Asn Pro		
	290	295 300
Thr		
305		30
<210> 18		
<211> 296		
<212> PRT		
<213> Streptomyces atratus		
<400> 18		
Met Ser Gly Thr Pro Glu Val Ala Glu Leu Tyr Ser Ala Ile Glu Glu		
1	5	10 15
Ser Ala Arg Leu Leu Asp Val Ala Cys Ser Arg Asp Lys Val Trp Pro		
	20	25 30
		40

【表 1 1 - 3 9】

Glu Arg Ile Cys Tyr Ala Pro Pro Pro Ala Arg Gly Trp Asp Pro Ala		
225	230	235 240
Ala Leu Pro Ala Glu Ile Thr Glu Gln Val Arg Gly Phe Val Asp Gly		
	245	250 255
Ala Pro Arg Ala Tyr Glu Gly Glu Pro Ile Val Ile Ala Ala Val Lys		
	260	265 270
Trp Ala Pro Glu Gly Pro Tyr Leu Asn Leu Gly Pro Tyr Tyr Gln Leu		10
	275	280 285
Ser Pro Leu Met Arg Lys Val Ile Ser Ala Val His Asn Lys Glu Ile		
	290	295 300
<210>	20	
<211>	303	
<212>	PRT	
<213>	Streptomyces iakyrus	
<400>	20	20
Met Glu Gly Glu Met Ser Glu Ala Ser Glu Leu Ala Val Ile Tyr Ser		
1	5	10 15
Ala Ile Glu Glu Thr Ala Gln Leu Leu Asp Val Pro Cys Ser Arg Asp		
	20	25 30
Lys Val Gln Pro Ala Leu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Leu Thr Asp Ala		
	35	40 45
His Ile Val Phe Ser Met Ala Thr Gly Glu Arg Tyr Lys Gly Glu Leu		
	50	55 60
Ala Phe Asp Phe Thr Val Pro Thr Ala Ala Gly Asp Pro Tyr Ala Ile		30
65	70	75 80
Ala Leu Ala Asn Gly Leu Val Asp Glu Thr Asp His Pro Ile Arg Ser		
	85	90 95
Leu Phe Ser Asp Val Gln Glu Arg Cys Pro Val Asp Ser Tyr Gly Val		
	100	105 110
Asp Tyr Gly Leu Val Gly Gly Phe Lys Lys Thr Tyr Val Ser Phe Pro		
	115	120 125
Leu Gly Asp Leu Gln Gly Leu Ser Thr Leu Val Asp Val Pro Ser Met		40
	130	135 140

【表 1 1 - 4 0】

Pro Arg Ala Leu Ala Glu His Ala Asp Phe Phe Ala Ser His Gly Leu	
145	150 155 160
Asp Asp Lys Val Ser Ala Ile Ala Ile Asp Tyr Ala His Arg Thr Trp	
	165 170 175
Asn Val Tyr Phe Ser Gly Ile Pro Ala Glu Val Lys Glu Pro Gln Thr	
	180 185 190
Leu Arg Ser Val Leu Gln Arg Phe Gly Leu Pro Glu Pro Ser Glu Arg	10
	195 200 205
Leu Met Glu Phe Ile Arg Thr Ser Phe Ala Met Tyr Thr Thr Phe Gly	
	210 215 220
Trp Asp Ser Thr Lys Ala Glu Arg Ile Cys Phe Ser Ala Arg Ser Ser	
225	230 235 240
Asp Pro Met Ala Leu Pro Ala Gln Phe Glu Pro Gln Ile Ala Lys Phe	
	245 250 255
Ala Lys Ser Ala Pro Tyr Thr Tyr Thr Gly Glu Arg Val Leu Thr Tyr	20
	260 265 270
Ala Gly Ala Leu Ser Pro Ser Glu Glu Phe Tyr Lys Leu Ala Ser Phe	
	275 280 285
Tyr Gln Lys Thr Ser Lys Leu Ser Asp Arg Val Arg Pro Ala Thr	
	290 295 300
<210> 21	
<211> 305	
<212> PRT	
<213> Streptomyces tendae	30
<400> 21	
Met Ser Gly Ala Ala Asp Val Glu Arg Val Tyr Ala Ala Met Glu Glu	
1	5 10 15
Ala Ala Gly Leu Leu Asp Val Ser Cys Ala Arg Glu Lys Ile Tyr Pro	
	20 25 30
Leu Leu Thr Val Phe Gln Asp Thr Leu Thr Asp Gly Val Val Val Phe	
	35 40 45
Ser Met Ala Ser Gly Arg Arg Ser Thr Glu Leu Asp Phe Ser Ile Ser	40
	50 55 60

【表 1 1 - 4 2】

<212> PRT

<213> *Micromonospora sagamiensis*

<400> 22

Met	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ala	Ala	Glu	Leu	Cys	Ser	Thr	Ile	Glu	Glu	
1				5					10					15		
Ser	Ala	Arg	Leu	Leu	Asn	Val	Ala	Tyr	Ser	Arg	Asp	Arg	Val	Trp	Ser	
			20					25					30			10
Leu	Leu	Ser	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Phe	Ala	His	Pro	Gly	Ala	Val	Val	
		35					40					45				
Ala	Phe	Arg	Val	Ala	Thr	Ala	Met	Arg	His	Val	Gly	Glu	Leu	Asp	Cys	
		50					55				60					
Arg	Phe	Thr	Thr	His	Pro	Asp	Asp	Arg	Asp	Pro	Tyr	Ala	Arg	Ala	Leu	
65					70					75					80	
Ser	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Thr	Asp	His	Pro	Val	Gly	Ser	Leu	Leu	
				85						90				95		20
Ala	Glu	Val	Gln	Gly	Arg	Cys	Pro	Val	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Asp	Phe	
			100						105					110		
Gly	Val	Val	Gly	Gly	Phe	Lys	Lys	Ile	Tyr	Ala	Phe	Phe	Thr	Pro	Asp	
			115					120					125			
Asp	Leu	Gln	Lys	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Glu	Ile	Pro	Ala	Met	Pro	Arg	
						135							140			
Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Phe	Phe	Ala	Arg	His	Gly	Leu	Asp	Asp	
145					150					155					160	
Arg	Val	Gly	Val	Phe	Gly	Ile	Asp	Tyr	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asn	Val	
				165						170				175		30
Tyr	Phe	Asn	Asp	Val	Pro	Ala	Gly	Ser	Phe	Asp	Pro	Glu	Thr	Ile	Arg	
			180					185					190			
Ser	Thr	Leu	Arg	Glu	Ile	Gly	Met	Ala	Ala	Pro	Ser	Glu	Arg	Met	Leu	
		195					200						205			
Lys	Leu	Gly	Glu	Lys	Ala	Phe	Gly	Leu	Tyr	Val	Thr	Leu	Gly	Trp	Glu	
			210				215						220			
Ser	Ser	Arg	Ile	Glu	Arg	Ile	Cys	Tyr	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Asp	Leu	
225					230						235				240	40

【表 1 1 - 4 3】

Thr Thr Leu Pro Val Pro Val Glu Pro Glu Ile Glu Lys Phe Val Arg		
	245	250
Ser Val Pro Tyr Gly Gly Asp Asp Arg Lys Phe Val Tyr Gly Val Ala		
	260	265
Leu Thr Pro Gln Gly Glu Tyr Tyr Lys Leu Glu Ser His Tyr Arg Trp		
	275	280
		285
Lys Pro Gly Ala Met Asp Phe Ile		
	290	295
<210>	23	
<211>	293	
<212>	PRT	
<213>	Streptomyces sp.	
<400>	23	
Met Ser Ala Gln Ala Asp Val Glu Thr Val His Ser Ala Ile Glu Lys		
1	5	10
		15
Ala Ala Gly Leu Leu Asn Leu Thr Cys Ser Pro Gly Thr Val Arg Pro		
	20	25
		30
Ile Leu Glu Ala Phe Gly Pro Phe Glu Gly Gly Val Ile Phe Ser Ala		
	35	40
		45
Ser Ala Gly Glu Gly His Ala Gly Asp Leu Asp Leu Thr Ile Gln Val		
	50	55
		60
Pro Arg Ala Ile Asp Asp Pro Tyr Thr His Ala Leu Thr His Gly Phe		
65	70	75
		80
Val Pro His Thr Asp His Pro Val Ser Thr Leu Leu Ser Asp Leu Lys		
	85	90
		95
Glu His Val Ser Val Asp Glu Phe Leu Ile Asp Phe Gly Val Ile Ala		
	100	105
		110
Gly Phe Asn Lys Ile Tyr Val His Phe Pro Arg Asp Leu Gln Gly Val		
	115	120
		125
Ala Gln Leu Ala Ala Leu Pro Ser Met Pro Arg Ala Leu Ala Asp Asn		
	130	135
		140
Ala Gln Leu Phe Ala Arg His Gly Leu Asp Lys Val Ala Met Leu Ser		
145	150	155
		160

10

20

30

40

【表 1 1 - 4 4】

Ile Asp Tyr His Lys Arg Thr Ile Asn Pro Phe Phe Thr Phe Pro Asn		
	165	170
Gly Leu Glu Ala Lys Thr Ile Ser Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Val		
	180	185
Glu Glu Pro Asp Glu Glu Leu Val Glu Ser Ser Ser Lys Ile Phe Arg		
	195	200
Ala Tyr Pro Thr Leu Gly Trp Glu Ser Ser Lys Ile Asp Arg Ile Ser		
	210	215
Phe Ala Arg Ser Leu Asp Leu Pro Thr Ile Arg Pro Arg Val Ala Pro		
	225	230
Glu Ile Val Arg Phe Val Thr Gly Thr Pro Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp		
	245	250
Arg Phe Ser Ile Ser Ile Val Lys Trp Ser Pro Asp Asp Thr Trp Phe		
	260	265
Asn Val Gly Ser Tyr Phe Gln Phe Gly Pro Leu Gln Arg Glu Val Leu		
	275	280
Gly Lys Val Leu Arg		
	290	
<210>	24	
<211>	309	
<212>	PRT	
<213>	Saccharomonospora saliphila	
<400>	24	
Val Pro Lys Asp Ala Asp Pro Arg Ser Ser Val Tyr Ser Ala Ile Glu		
1	5	10
Glu Ala Ala Gly Leu Met Gly Ala Pro Cys Ser Arg Glu Arg Val Trp		
	20	25
Pro Ile Leu Thr Ala Tyr Gly Asp Gly Ile Ser Glu Ala Gly Ile Val		
	35	40
Phe Ser Val Gln Thr Gly Glu Arg His Ala Gly Glu Leu Asp Tyr Thr		
	50	55
Ile Thr Val Pro Ala Asp Gly Pro Asp Pro Tyr Thr Ser Ala Leu Ser		
	65	70
		75
		80

10

20

30

40

【表 1 1 - 4 5】

Asn Gly Phe Leu Glu Ala Thr Gln His Pro Val Gly Thr Leu Leu Ser		
	85	90
Asp Ile Arg Ala Arg Cys His Ile Ser Glu Tyr Phe Ile Asp Cys Gly		
	100	105
Val Val Gly Gly Phe Asn Lys Val Tyr Ala His Phe Pro His Asp Pro		
	115	120
Leu Ser Val Glu Arg Leu Ala Glu Val Pro Ser Leu Pro Arg Ser Leu		
	130	135
Ala Asp Asn Leu Gly Phe Phe Leu Arg His Ala Leu Arg Asp Val Ala		
145	150	155
Met Ile Ala Ile Asp Tyr Arg Lys Lys Thr Val Asn Leu Tyr Phe Ala		
	165	170
Gln Leu Ser Ala Glu Cys Leu Arg Ser Ala Asn Ile Arg Ala Met Leu		
	180	185
Arg Glu Ser Gly Leu Ser Glu Leu Asp Gly Pro Met Leu Asp Phe Ala		
	195	200
Leu Gly Ser Phe Arg Ile Tyr Val Thr Leu Ala Trp Asp Ser Ala Gly		
	210	215
Val Glu Arg Ile Ser Phe Ala Ser Leu Met Ser Ser Gly Trp Val Asn		
225	230	235
Ala Ala Leu Ser Glu Phe Pro Val Arg Ile Glu Pro Glu Ile Glu Arg		
	245	250
Phe Val Lys Asn Ala Pro Gln Ala Tyr Ser Gly Asp Arg Val Arg Ile		
	260	265
Leu Ala Ile Lys Ser Ser Pro Gly Asp Glu Cys Leu Asn Phe Gly Ser		
	275	280
Tyr Tyr Gln Ile Ser Pro Val Val Arg Asn Leu Leu Ala Ala Arg Ala		
	290	295
Gly Asp Ala Glu Gln		300
305		
<210>	25	
<211>	298	
<212>	PRT	
<213>	Streptomyces sp.	

10

20

30

40

【表 1 1 - 4 6】

<400> 25																
Met	Ser	Gly	Thr	Ala	Asp	Ile	Glu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Val	Val	Glu	Glu	
1				5					10					15		
Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	Cys	Pro	Pro	Glu	Arg	Met	Arg	Pro	
			20					25					30			
Val	Leu	Thr	Ala	Phe	Arg	Asp	Ala	Leu	Ala	Asp	Pro	Val	Val	Phe	Asn	
		35					40					45				10
Ala	Val	Thr	Lys	Gly	Gly	Arg	Ile	Ala	Asp	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Thr	
	50					55				60						
Leu	Pro	Ala	Ser	Ala	Gly	Asp	Pro	Tyr	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	His	Gly	
65					70					75					80	
Leu	Ala	Glu	Glu	Thr	Asp	His	Pro	Ile	Arg	Thr	Leu	Phe	Ser	Asp	Leu	
				85					90					95		
Arg	Ala	Arg	Leu	Pro	Val	Gln	Gly	Tyr	Gly	Val	Asp	Tyr	Gly	Val	Asn	
			100						105				110			20
Gly	Gly	Phe	Asn	Lys	Thr	Tyr	Ala	Phe	Phe	Pro	Leu	Gly	Asp	Leu	Gln	
		115					120					125				
Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	Ser	Met	Pro	Pro	Ala	Leu	Ser	
							135				140					
Glu	His	Leu	Ala	Leu	Phe	Thr	Glu	His	Gly	Leu	Gly	His	Lys	Val	Ser	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Ala	Ile	Asp	Tyr	Ala	Arg	Arg	Thr	Trp	Asn	Val	Tyr	Phe	Asn	
				165					170					175		
Gly	Leu	Pro	Ala	Asp	Phe	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Val	Leu	Pro	Met	Leu	
			180						185				190			30
Arg	Ala	Phe	Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Ser	Glu	Gln	Leu	Leu	Asp	Phe	Ile	
		195						200					205			
Glu	Thr	Ser	Ser	Ala	Leu	Tyr	Pro	Thr	Phe	Gly	Trp	Asp	Ser	Ser	Lys	
		210					215				220					
Ile	Glu	Arg	Ile	Ser	Phe	Ser	Thr	Arg	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Leu	
225					230						235				240	
Pro	Ala	Arg	Ile	Glu	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Phe	Ala	Arg	Ser	Ala	Pro	
				245					250					255		40

【表 1 1 - 4 7】

Tyr Ala Tyr Glu Gly Glu Arg Val Leu Val Tyr Ala Gly Ala Leu Ser		
260	265	270
Pro Ser Glu Glu Tyr Tyr Lys Leu Ala Thr Tyr Tyr Arg Met Ser Ala		
275	280	285
Ala Ala His Asp Arg Val Arg Ala Ala Asn		
290	295	
<210> 26		10
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Streptomyces sp.		
<400> 26		
Met Ser Lys Ala Thr Glu Val Asp Arg Val Tyr Ala Ala Val Glu Lys		
1	5	10
Ala Ala Ala Leu Ala Gly Thr Thr Cys Ala Gly Asp Lys Val Arg Pro		
20	25	30
Val Leu Thr Gly His Gln Asp Leu Leu Asp Glu Ala Val Ile Val Phe		
35	40	45
Ser Met Thr Ala Ser Gly Ser His Ser Gly Gly Leu Asp Leu Ser Met		
50	55	60
Thr Val Pro Ala Glu His Val Asp Pro Tyr Ser Phe Ala Leu Ser Glu		
65	70	75
Gly Leu Ile Glu Pro Thr Asp His Pro Val Gly Ser Val Ile Ser Asp		
85	90	95
Phe Gln Glu Arg Phe Pro Ile Gly Met Tyr Gly Ile Asp Val Asp Val		
100	105	110
Ala Gly Gly Phe Lys Lys Ala Tyr Ala Ala Phe Pro Ser Asn Asp Leu		
115	120	125
Arg Glu Leu Lys Gln Leu Phe Asp Leu Pro Ser Met Pro Ser Ala Ala		
130	135	140
Ala Glu Asn Ala Glu Leu Phe Ala Arg Tyr Gly Leu Asp Arg Val Thr		
145	150	155
Gly Val Ser Val Asp Tyr Lys Arg His Glu Leu Asn Leu Tyr Cys Asp		
165	170	175
		40

【表 1 1 - 4 8】

Arg Ala Thr Thr Glu Pro Leu Asp Pro Asp Tyr Val Gln Ser Met Leu	
180	185
190	
Arg Asp Met Gly Leu Lys Glu Ala Ser Glu Gln Gly Leu Glu Phe Ala	
195	200
205	
Lys Lys Thr Phe Ala Ile Tyr Pro Thr Leu Asn Trp Asp Ser Ser Glu	
210	215
220	
Ile Val Arg Ile Cys Phe Ala Val Ile Thr Thr Asp Pro Ala Thr Thr	10
225	230
235	240
Pro Thr Arg Ser Glu Pro Glu Leu Gly Gln Met Trp Glu Tyr Ala Asn	
245	250
255	
Thr Ala Pro Tyr Ala Tyr Val Gly Glu Gln Arg Ala Leu Val Tyr Gly	
260	265
270	
Leu Ala Leu Ser Pro Glu Lys Glu Tyr Tyr Lys Leu Gly Ala Tyr Tyr	
275	280
285	
Gln Ile Ser Asp Tyr Gln Arg Lys Leu Val Lys Ala Phe Asp Ala Leu	20
290	295
300	
Pro Glu	
305	
<210> 27	
<211> 311	
<212> PRT	
<213> Streptomyces sp.	
<400> 27	
Met Tyr Gly Gly Thr Glu Val Glu Glu Val Tyr Ser Ala Leu Glu Lys	30
1	5
10	15
Ser Ala Gly Leu Val Gly Val Pro Cys Asn Arg Asp Lys Val Trp Pro	
20	25
30	
Ala Leu Ser Thr Tyr Gln Asp Ala Leu Gly Glu Ala Val Ile Val Phe	
35	40
45	
Ser Val Ala Thr Asp Glu Arg His Ala Gly Glu Leu Asp Tyr Thr Ile	
50	55
60	
Thr Val Pro Thr Gly Gly Ala Asp Pro Tyr Ala Leu Ala Leu Ala Lys	40
65	70
75	80

【表 1 1 - 5 0】

<400> 28																
Met	Pro	Glu	Ser	Lys	Asn	Ala	Glu	Ala	Val	Tyr	Ser	Ala	Ile	Glu	Glu	
1				5					10					15		
Ser	Ala	Gly	Leu	Leu	Asp	Ile	Pro	Cys	Ser	Arg	Gln	Lys	Val	Met	Ser	
			20					25					30			
Val	Leu	Ser	Ala	Phe	Gly	Asp	Gly	Val	Ser	Glu	Glu	Ser	Val	Ile	Val	
			35				40					45				10
Met	Ala	Met	Ala	Gly	Gly	Glu	Arg	His	Gly	Gly	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asn	
	50					55					60					
Phe	Thr	Val	Pro	Thr	Glu	Val	Gly	Asp	Pro	Tyr	Glu	Ile	Ala	Val	Ala	
65					70					75				80		
Asn	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Leu	Asp	His	Pro	Ile	Ala	Asn	Leu	Leu	Pro	
				85					90				95			
Glu	Ile	Val	Glu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Phe	Tyr	Gly	Val	Glu	Ala	Gly	
			100					105					110			20
Val	Val	Glu	Gly	Phe	Lys	Lys	Thr	Tyr	Ile	Phe	Phe	Pro	Leu	Asp	Asn	
			115				120					125				
Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Met	Pro	Arg	Ser	
			130			135					140					
Val	Ala	Glu	His	Ala	Arg	Thr	Phe	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	Met	Gly	Asp	
145					150					155				160		
Arg	Ile	Ser	Ile	Ile	Gly	Ile	Asp	Tyr	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Asn	Val	
				165					170					175		
Tyr	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Leu	Gly	Glu	Lys	Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	
			180					185					190			30
Glu	Asp	Thr	Asn	Leu	Pro	Ala	Pro	Thr	Pro	Asp	Phe	Leu	Glu	Phe	Val	
			195				200					205				
Gln	Asn	Ser	Phe	Ser	Ile	Tyr	Pro	Thr	Phe	Thr	Tyr	Glu	Ser	Ser	Asp	
			210				215					220				
Ile	His	Arg	Ile	Cys	Phe	Ser	Ser	Val	Ser	Pro	Asp	Asp	Thr	Ala	Tyr	
225					230						235			240		
Pro	Thr	Thr	Leu	His	Glu	Glu	Ile	Ala	Arg	Phe	Thr	Lys	Asn	Ala	Pro	
				245						250				255		40

【表 1 1 - 5 5】

Arg Tyr Tyr Lys Ile Gln Ala Glu Tyr Thr Ser Pro Arg His Ile Pro		
275	280	285
Phe Pro Gly Gly Thr Glu Pro Pro Val Asn		
290	295	
<210>	32	
<211>	293	
<212>	PRT	10
<213>	Myxococcus stipitatus	
<400>	32	
Met Pro Ala Leu Ser Leu Gly Leu Glu Arg Leu Cys Ala Asp Val Glu		
1	5	10
Ala Ala Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ser Phe Ser Arg Glu Val Thr Arg		
20	25	30
Asn Val Leu Lys Ser Tyr Pro Arg Phe Phe Thr Ser Ser Ala Val Ser		
35	40	45
Phe Arg Thr Ser Thr Arg Lys Pro Glu Lys Arg Glu Leu Asn Val Arg		
50	55	60
Phe Val Glu Leu Glu Thr Pro Glu Asp Pro His Ala Val Ala Leu Ala		
65	70	75
Glu Gly Leu Ile His Arg Ser Gly His Pro Ile Asp Asp Leu Phe Glu		
85	90	95
Gln Val Gln Arg Asn Val Pro Ile Leu Gly Tyr Gly Leu Asp Phe Gly		
100	105	110
Val Ala Tyr Gly Val Glu Lys Ile Trp Pro Phe Phe Pro His Arg Pro		
115	120	125
Gln Pro Leu Glu Val Leu Arg Thr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val		
130	135	140
Gln Ala His Ser Gly Phe Leu Val Glu His Asp Leu Thr Asp Leu Ser		
145	150	155
Leu Phe Ala Leu Asp Tyr Arg Ser Arg Ser Val Asn Leu Tyr Phe Met		
165	170	175
Cys Arg Pro Gly His Phe Ser Thr Ala Gln Leu Ala Asp Leu Leu Gly		
180	185	190
		40

【表 1 1 - 5 6】

Gly Leu Gly Phe Glu Ser Pro Gly Glu Glu Leu Leu Glu His Cys Thr		
195	200	205
Arg Ala Val Pro Ile Tyr Phe Thr Phe Arg Trp Asp Arg Pro Arg Ile		
210	215	220
Glu Arg Val Cys Phe Gly Val Ile Ala Pro Gly Pro Gly Leu Leu Pro		
225	230	235
Thr His Leu His Pro Ile Ile Gly Gln Phe Ala Ala Gly Val Pro Phe		
	245	250
		255
Ala Thr Glu Arg Arg Asn Phe Ile Tyr Ser Val Thr Val Ser Arg Glu		
	260	265
		270
Glu Thr Phe Ile Lys Ile Glu Asn Asp Tyr Ser Gly Thr Met Thr Ala		
	275	280
		285
Leu Met Gln Val Phe		
290		
<210>	33	
<211>	300	
<212>	PRT	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	Baceterial or Fungal Prenyltransferase	
<400>	33	
Met Met Ser Gly Thr Ala Asp Leu Ala Gly Val Tyr Ala Ala Val Glu		
1	5	10
		15
Glu Ser Ala Gly Leu Leu Asp Val Ser Cys Ala Arg Glu Lys Val Trp		
	20	25
		30
Pro Ile Leu Ala Ala Phe Glu Asp Val Leu Pro Thr Ala Val Ile Ala		
	35	40
		45
Phe Arg Val Ala Thr Asn Ala Arg His Glu Gly Glu Phe Asp Cys Arg		
	50	55
		60
Phe Thr Val Pro Gly Ser Ile Asp Pro Tyr Ala Val Ala Leu Asp Lys		
65	70	75
		80
Gly Leu Thr His Arg Ser Gly His Pro Ile Glu Thr Leu Val Ala Asp		
	85	90
		95

10

20

30

40

【表 1 1 - 5 9】

Trp	Ala	Pro	Glu	Gly	Pro	Tyr	Leu	Asn	Leu	Gly	Pro	Tyr	Tyr	Gln	Leu	
		275					280					285				
Ser	Pro	Leu	Met	Arg	Lys	Val	Ile	Ser	Ala	Val	His	Asn	Lys	Glu	Ile	
		290				295					300					
<210>		35														
<211>		307														
<212>		PRT														10
<213>		Unknown														
<220>																
<223>		Unknown														
<400>		35														
Met	Pro	Gly	Thr	Asp	Asp	Val	Ala	Val	Asp	Val	Ala	Ser	Val	Tyr	Ser	
1				5					10					15		
Ala	Ile	Glu	Lys	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu	Asp	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Glu	
			20					25					30			20
Val	Val	Trp	Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Phe	Glu	Asp	Val	Leu	Glu	Gln	Ala	
		35					40					45				
Val	Ile	Ala	Phe	Arg	Val	Ala	Thr	Asn	Ala	Arg	His	Glu	Gly	Asp	Phe	
		50				55				60						
Asp	Val	Arg	Phe	Thr	Val	Pro	Glu	Glu	Val	Asp	Pro	Tyr	Ala	Val	Ala	
65					70					75					80	
Leu	Ser	Arg	Ser	Leu	Ile	Ala	Lys	Thr	Asp	His	Pro	Val	Gly	Ser	Leu	
				85					90					95		
Leu	Ser	Asp	Ile	Gln	Gln	Leu	Cys	Ser	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly	Val	Asp	
			100					105					110			30
Leu	Gly	Val	Lys	Ser	Gly	Phe	Lys	Lys	Val	Trp	Val	Tyr	Phe	Pro	Ala	
		115					120					125				
Gly	Glu	His	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Leu	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Met	Pro	
		130				135					140					
Gly	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Val	Asp	Phe	Phe	Thr	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ala	
145					150					155					160	
Asp	Lys	Val	Asp	Val	Ile	Gly	Ile	Asp	Tyr	Arg	Ser	Arg	Thr	Met	Asn	
				165					170					175		40

【表 1 1 - 6 0】

Val Tyr Phe Ala Ala Pro Ser Glu Cys Phe Glu Arg Glu Thr Val Leu		
180	185	190
Ala Met His Arg Asp Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ser Glu Gln Met Phe		
195	200	205
Lys Phe Cys Glu Asn Ser Phe Gly Leu Tyr Thr Thr Leu Asn Trp Asp		
210	215	220
Thr Met Glu Ile Glu Arg Ile Ser Tyr Gly Val Lys Thr Glu Asn Pro		10
225	230	235
Met Thr Phe Phe Ala Arg Leu Gly Thr Lys Val Glu His Phe Val Lys		
245	250	255
Asn Val Pro Tyr Gly Val Asp Thr Gln Lys Met Val Tyr Ala Ala Val		
260	265	270
Thr Ser Ser Gly Glu Glu Tyr Tyr Lys Leu Gln Ser Tyr Tyr Arg Trp		
275	280	285
Arg Ser Val Ser Arg Leu Asn Ala Ala Tyr Ile Ala Ala Arg Asp Lys		20
290	295	300
Glu Ser Thr		
305		
<210> 36		
<211> 327		
<212> PRT		
<213> Unknown		
<220>		
<223> Unknown		30
<400> 36		
Met Val Gly Ser His Thr Arg Ile Ser Gln Asn Leu Ile Gly Ile Asp		
1	5	10
Cys Leu Glu Cys Leu Val Ser Gly Ala Thr Gly Ala Glu Lys Leu Tyr		
20	25	30
Ser Ala Ile Glu Glu Ser Ala Arg Met Val Asp Ala Pro Phe Ser Arg		
35	40	45
Asp Lys Val Trp Pro Thr Leu Ser Ala Phe Glu Gly Gly Phe Ser Asp		40
50	55	60

【表 1 1 - 6 2】

<210>	37	
<211>	10584	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cassette with Dictyostelium discoideum DiPKS (G1516D; G1518A) coding sequence,	10
	regulatory sequences and integration sequences	
<220>		
<221>	LV3	
<222>	(1)..(40)	
<220>		
<221>	<i>S. cerevisiae</i> GAL1 promoter	
<222>	(41)..(482)	20
<220>		
<221>	L1	
<222>	(483)..(522)	
<220>		
<221>	DiPKS	
<222>	(523)..(9966)	
<220>		
<221>	C-methyltransferase domain	
<222>	(5050)..(5412)	30
<220>		
<221>	Motif 1	
<222>	(5050)..(5076)	
<220>		
<221>	G1516D	
<222>	(5068)..(5070)	
<220>		
<221>	G1518A	40
<222>	(5074)..(5076)	
<220>		

【表 1 1 - 6 3】

<221>	Motif 2						
<222>	(5309)..(5331)						
<220>							
<221>	Motif 3						
<222>	(5389)..(5421)						
<220>							
<221>	L2		10				
<222>	(9967)..(10006)						
<220>							
<221>	PRM9t						
<222>	(10007)..(10544)						
<220>							
<221>	LV5						
<222>	(10545)..(10584)						
<400>	37						
aggaataactc	tgaataaaaac	aacttatata	ataaaaaatgc	cggattagaa	gccgccgagc	60	20
gggtgacagc	cctccgaagg	aagactctcc	tcogtgcgtc	ctcgtcttca	cgggtcoggt	120	
tcctgaaaag	cagatgtgcc	tcgogccgca	ctgotccgaa	caataaagat	tctacaatac	180	
tagcttttat	ggttatgaag	aggaaaaatt	ggcagtaacc	tggccccaca	aaccttcaaa	240	
tgaacgaatc	aaattaacaa	ccataggatg	ataatgcatg	tagtttttta	gcottatttc	300	
tggggtaatt	aatcagcgaa	gcgatgattt	ttgatctatt	aacagatata	taaagcaaaa	360	
aactgcataa	ccactttaac	taatactttc	aacatcttcg	gtttgtatta	cttcttattc	420	
aatgtaata	aaagtatcaa	caaaaaattg	ttaatatacc	tctatacttt	aagtcgaagg	480	
agctagaaaa	tttattataa	aaggaagaga	aataattaaa	caatgaacaa	gaactccaaa	540	
atccagtccc	caaactcttc	tgatgttgct	gttattgggtg	ttggttttag	attcccaggt	600	30
aactcfaatg	accagaatc	tttgtggaac	aacttggttg	atggtttcga	tgctattacc	660	
caagtcccaa	aagaaagatg	ggctacttct	tttagagaga	tgggtttgat	caagaacaag	720	
ttcgggtggt	tcttgaagga	ttctgaatgg	aagaatttcg	accctttggt	ctttgggtatc	780	
gggtccaaaag	aagctccatt	cattgatcca	caacaaaggt	tggtgtgtgc	catcgtttgg	840	
gaatctttgg	aagatgctta	catcagacca	gatgaattga	gaggttctaa	caactgggtgt	900	
ttcatoggtg	tttctaacaa	cgattacacc	aagttgggtt	tccaagacaa	ctactctatt	960	
tctccataca	ctatgaccgg	ctctaactct	tcattgaact	ccaacagaat	ttcctaactgc	1020	
ttcgatttta	gaggtccatc	cattactggt	gataccgctt	gttcttcttc	cttggtttct	1080	
gttaatttgg	gtgtccaatc	catccaaatg	ggtgaatgta	agattgctat	ttgcgggtggt	1140	40

【表 1 1 - 6 4】

gttaacgctt	tgtttgatcc	atctacatct	gttgcctttt	ccaagttggg	tgttttgtct	1200	
gaaaatggca	gatgcaactc	ttttagtgat	caagcctctg	gttacgttag	atctgaaggt	1260	
gctgggtgtg	ttgttttgaa	gtctttggaa	caagctaagt	tggatggtga	tagaatctac	1320	
gggtttatca	aggggtgttc	ctctaataa	gatgggtgctt	ctaaggtga	caagaactct	1380	
ttgactactc	catcttgtga	agcccaatcc	attaacattt	ctaaggctat	ggaaaaggcc	1440	
tccttgtctc	catctgatat	ctattacatt	gaagcccatg	gtactggtac	tccagttggt	1500	
gatccaattg	aagttaaggc	cttgtccaag	atcttctcca	actctaaca	caaccagttg	1560	10
aacaacttct	ctaccgatgg	taatgataac	gatgatgatg	atgacgataa	cacctctcca	1620	
gaaccattat	tgattggctc	attcaagtcc	aacatcggtc	atttggaaac	tgctgctggt	1680	
attgcttctt	tgattaagtg	ttgcttgatg	ttgaagaaca	ggatgttggt	tccatccatt	1740	
aactgctcta	atgtgaacct	atccattcca	ttcgatcagt	acaacatctc	cgttatcaga	1800	
gaaatcagac	aattcccaac	cgataagttg	gttaacatcg	gtatcaattc	tttcggtttc	1860	
gggtggttcta	actgccatct	gattattcaa	gagtacaaca	acaacttcaa	gaacaactct	1920	
accatctgca	ataacaaca	caacaacaat	aacaacatcg	actacttgat	cccaatctcc	1980	
tctaagacta	agaagtctct	ggataagtac	ttgatattga	tcaagaccaa	ctccaactac	2040	
cacaaggata	tttctttcga	tgacttcgtc	aagttccaaa	tcaagtctaa	gcagtacaac	2100	20
ttgtccaaca	gaatgactac	cattgctaac	gattggaact	ccttcattaa	gggttctaac	2160	
gaattccaca	acttgatcga	atctaaggat	ggatgaaggtg	gttcttcac	ttctaacaga	2220	
ggatttgatt	ccgccaatca	aatcaacact	actactacct	ctaccatcaa	cgatatcgaa	2280	
cctttgttgg	ttttcgtttt	ctgtggatca	ggatccacaat	ggaatggtat	gattaagacc	2340	
ttgtacaact	ccgagaacgt	tttcaagaac	accgttgatc	atgttgacag	catcttgtac	2400	
aagtacttcg	gttactccat	tttgaacgct	ttgtctaaga	tcgatgataa	cgacgattcc	2460	
atcaaccatc	caatagttgc	tcaaccatct	ttgttcttct	tgcaaattgg	tttggctcgag	2520	
ttgtttaagt	actgggggat	ctaccatct	atctctggtg	gtcattcttt	cggtgaagtc	2580	
tcttcttatt	acttgtccgg	tatcatctct	ttggaaaccg	cttgtaaaat	cgctctacgct	2640	30
agatcctcta	atcagaaca	aactatgggt	tccggtaaga	tgttggttgt	ttctatgggt	2700	
tttaagcaat	ggaacgatca	attctctgct	gaatgggtccg	atattgaaat	tgcttggttac	2760	
aacgctocag	attccatagt	tgttactggt	aacgaagaaa	gattgaaaga	attgtccatc	2820	
aagttgtccg	acgaatccaa	tcaaattttc	aacaccttct	tgaggtcccc	atgttctttt	2880	
cattcttccc	atcaagaagt	catcaagggt	tctatgttcg	aagagttgtc	taacttgcaa	2940	
tctactggtg	aaaccgaaat	ccctttgttc	tctactgtta	ctggtagaca	agttttgtct	3000	
ggatcatgta	ctgctcaaca	catctacgat	aatgttagag	aaccagtctt	gttccaaaag	3060	
acgattgaat	ccattacctc	ctacatcaag	tctcactacc	catccaatca	aaaggttatc	3120	
tacgttgaaa	ttgctccaca	cccaaccttg	ttttcattga	tcaaaaagtc	catcccatcc	3180	40

【表 1 1 - 6 5】

tccaacaaga	attcctcttc	tgttttgtgt	ccattgaaca	gaaaagaaaa	ctccaacaac	3240
tcctacaaga	agttcgtttc	tcagttgtac	ttcaacggtg	ttaacgttga	cttcaacttc	3300
cagttgaact	ccatthgcca	taacgntaac	aacgatcacc	atthgaacaa	cgtcaagcaa	3360
aactccttca	aagagactac	caatthcctg	ccaagatacc	aatgggaaca	agatgaatat	3420
tggccgaac	cattgatctc	cagaaagaat	agattggaag	gtccaactac	ttccttggtg	3480
ggcatagaa	ttatctacag	cttcccagtt	ttccaatccg	ttttggactt	gcaatctgac	3540
aactacaaat	acttggttga	ccacttggtt	aacggtaagc	cagtttttcc	aggtgctggt	3600
tatthggata	tcattcatcga	attcttcgac	taccaaagc	agcagttgaa	ttcctctgat	3660
tcctctaact	cctacatcat	caacgntgac	aagatccaat	tcttgaacc	aattcacttg	3720
accgaaaaa	agttgcaaac	cttgcaatct	tctttcgaac	ctatcgttac	taagaagtct	3780
gccttctctg	ttaacttctt	catcaaggat	accgtcagag	atcaatctaa	ggttaagtct	3840
atgtctgacg	aaacttgac	taacacttgt	aaggctacca	tttcttgga	acaacaacag	3900
ccatctccat	cttctacttt	gactttgtct	aagaagcaag	acttgagat	cttgagaaac	3960
agatgcgata	ttagcaagct	agacaagttt	gagttgtacg	acaagatctc	taagaatthg	4020
ggcttgacgt	acaactcctt	gthtcaagtt	gthgatacca	tcgaaactgg	taaggattgc	4080
tctthtgcta	ctthgtctth	gccagaagat	actthgttca	ccaccattht	gaacctatgc	4140
thgttgata	actgthtcca	tggthtthgt	actthgatca	acgaaaagg	ttctthcgtt	4200
gtcagatcca	thtctctctg	thctatctac	thggagaaca	tcgthtctt	caatcaaac	4260
tctgthgta	acgtccagtt	ctacttgta	accactatth	ctaaagccac	ctcctthtag	4320
tctgaaggta	cttgtaagtt	gthccaag	gatgthtct	tgaththgtc	tatcggtaag	4380
thcatcatca	agthccacca	thcaaagtct	actaagacca	acgaaactat	cgaatctcca	4440
thggacgaaa	cctthctctat	tgaatggcaa	tctaaggatt	ctccaattcc	aacctccaaa	4500
caaatccaac	aacaatctcc	atthgaactct	aacctatct	tcattagatc	tacctcttg	4560
aaggacatcc	agthcgaaca	atactgctcc	thcattatcc	acaagaatt	gatcaaccac	4620
gaaaagtaca	agaaccagca	atccttcgat	atcaactcct	tggaaaacca	cttgaaacgat	4680
gaccaattga	tggaaatcctt	gtccatctcc	aaagaatact	tgagattctt	caccaggatc	4740
atctccatca	ttaagcaata	cccaaagatc	thgaacgaaa	aagagctaaa	agaattgaaa	4800
gaaatcatcg	aattgaagta	cccatccgaa	gthcagthgt	tggaaatcga	agthtatcgag	4860
aaggthtcca	tgathatccc	aaagthgthg	thcgaaaacg	acaagcaatc	thccatgacc	4920
thgtthccaag	ataactthgtt	gaccagthtc	tactccaatt	ctaacctac	cagathctac	4980
thggaaagg	thtccgaaat	ggtcttgga	tctattagac	caatcgtcag	agaaaagagg	5040
gtgthcagaa	thtttgaaat	tggthctgat	acagcctctt	tgtctaatgt	tgtthtgact	5100
aagthgaaca	cctactthgtc	cacctthgat	tctaathgthg	gthctgthta	caacatcatc	5160
atthgagtaca	cctthcaccga	tatthcgcgc	aactthcatta	thgthgaaat	ccaagaaacc	5220

10

20

30

40

【表 1 1 - 6 6】

atgtgcaact	tgtaccctaaa	cgttactttc	aagttctccg	tcttggactt	ggagaaagag	5280
attattaact	cctccgattt	cttgatgggt	gattacgata	tagttttgat	ggcctacggt	5340
atccatgccg	tttctaacat	taagttctcc	atcgaacagt	tgtacaagtt	gttgtctcca	5400
agaggttggt	tgttgtgtat	tgaacctaag	tccaacgttg	tgttctccga	tttggttttc	5460
ggttgtttta	atcagtgggt	gaactactac	gatgatatta	gaactacca	ctgctccttg	5520
tctgaatctc	aatggaatca	gttgttggtg	aaccagtcct	tgaacaacga	atcctcttct	5580
tcttctaact	gttacgggtg	tttctccaac	gtttctttta	ttgggtgtga	aaaggatgtc	5640
gactccatt	ctttcatatt	gcactgcaa	aaagaatcca	tctcccaa	gaagttagcc	5700
accactatta	acaacggtt	gtcatctggt	tccatcgta	tcgttttgaa	ctctcaacaa	5760
ttgaccaaca	tgaagtccta	cccaaagggt	attgagtata	ttcaagaggc	tacctctttg	5820
tgcaagacca	ttgaaattat	cgattccaag	gacgtcttga	actctacca	ttcagttttg	5880
gaaaagatcc	aaaagtcctt	gttgggtggt	tgtttgttgg	gttatgactt	gttggagaac	5940
aactaccaag	aacagtcttt	cgaatacgtt	aagttgttga	acttgatctc	tactaccgcc	6000
tcttcateta	atgataagaa	accaccaaag	gtcttgttga	tcaccaagca	atctgaaaga	6060
atctccaggt	ctttctactc	cagatccttg	attgggtattt	ccagaacctc	tatgaaocgag	6120
tacccaaatt	tgtccattac	ctctatcgat	ttggatacca	acgactactc	attgcagtct	6180
ttgttgaagc	caatcttcag	caactctaag	ttttccgaca	acgagttcat	cttcaaaaag	6240
ggcttgatgt	tcgtgtccag	gatctttaag	aacaagcagt	tgctagaatc	ctccaacgct	6300
tttgaaactg	actcttctaa	cttgtactgt	aaggcctctt	ctgacttgtc	ttacaagtac	6360
gctattaagc	agtctatggt	gaccgaaaat	cagatcgaaa	tcaaggttga	atgcgtcgggt	6420
attaacttca	aggacaacct	attctacaag	ggcttgttgc	cacaagaaat	tttcagaatg	6480
ggtgacatct	acaatccacc	atatggtttg	gaatgctctg	gtgttattac	cagaattgggt	6540
tctaacgtca	ccgaatactc	agttgggtcaa	aatgtttttg	gtttcggcag	acattctttg	6600
ggttctcatg	ttgttaccaa	caaggatttg	gttatcttga	agccagatac	catctcattt	6660
tctgaagctg	cttctatccc	agttgtttac	tgtactgctt	ggtactcctt	gttcaacatt	6720
ggtcagttgt	ctaacgaaga	atccatccta	attcattctg	ctactggtgg	tgtaggtttg	6780
gcttctttga	atgtgttgaa	aatgaagaat	cagcaacagc	aaccattgac	caatgtttat	6840
gctactgttg	gctctaacga	gaagaagaag	ttcttgatcg	ataacttcaa	caacttgttc	6900
aaagaggacg	gcaaaaacat	tttctctacc	agagacaaag	aatactcaa	ccagttggaa	6960
tccaagatcg	atgttatttt	gaacaccttg	tccggtgaat	tcgtcgaatc	taatttcaag	7020
tccttgagat	ccttcggtag	attgattgat	ttgtctgcta	ctcacgttta	cgccaatcaa	7080
caaattggtc	taggtaactt	caagttcgac	cacttgtatt	ctgctgttga	cttggaaaga	7140
ttgatcgacg	aaaaacctaa	gttgttgacg	tccatcttgc	aaagaattac	caactctatc	7200
gtcaacgggt	ccttgaaaa	aattccaatt	accatcttcc	catccaccga	aactaaggat	7260

10

20

30

40

【表 1 1 - 6 7】

gctatcgaat	tattgtccaa	gagatcccat	atcggtaaag	ttgtttaga	ttgcaccgat	7320	
atctctaagt	gtaatcctgt	tggtgatgtg	atcaccaact	tctctatgag	attgccaaag	7380	
ccaaactacc	agttgaattt	gaactccacc	ttgttgatta	ctggtcagtc	tggtttgtot	7440	
atccctttgt	tgaattgggt	gttgtctaag	tctgggtgga	acgttaagaa	cgttgtcatc	7500	
atctctaagt	ccaccatgaa	gtggaagttg	cagactatga	ttcccatatt	cgtttccggt	7560	
ttcggtatcc	atthtaacta	cgttcaagtc	gacatctcca	actacgatgc	tttgtctgaa	7620	
gctattaagc	aattgccatc	tgatttgcca	ccaatcacct	ctgtttttca	tttggctgot	7680	10
atctacaacg	atgttccaat	ggatcaagtt	accatgtcta	ccgttgaatc	tgttcataac	7740	
cctaaagttt	tggtgcccgt	taacttgcac	agaatctctg	ttctttttgg	ttggaagttg	7800	
aaccaacttg	tcttgttctc	ttctattact	gotattaccg	gttaccocaga	ccaatctatc	7860	
tacaattctg	ccaactctat	tttggacgct	ttgtccaact	ttagaaggtt	tatggggttg	7920	
ccatccttct	ccattaactt	gggtccaatg	aaggatgaag	gtaaggtttc	taccaacaag	7980	
agcatcaaga	agctattcaa	gtctagaggt	ttgccaaagcc	tatccttgaa	caagttatatt	8040	
ggtttggttg	aggtcgtcat	caacaaccca	tctaatcatg	ttatcccatc	ccaattgatt	8100	
tgctccocaa	tcgatttcaa	gacctacatc	gaatctttct	caactatgag	gccaaagttg	8160	
ttacacttgc	aacctaccat	ttccaagcag	caatcttcta	tcattaacga	ttctaccaag	8220	20
gcttcctcca	acatttcatt	gcaagataag	atcacctcca	aggtgtctga	tttgttgtcc	8280	
attccaatct	ccaagatcaa	cttcgatcat	ccattgaaac	actacggctt	ggattctttg	8340	
ttgaccgttc	aattcaaatc	ctggatcgac	aaagaattcg	aaaagaactt	gttcacccat	8400	
atccaattgg	ccaccatctc	tattaactca	ttcttgaaa	aggtgaacgg	cttgtctaca	8460	
aacaataaca	acaacaacaa	ttccaacgtc	aagtcctctc	catccattgt	caaagaagaa	8520	
atcgttacct	tggaacaagga	tcaacaacca	ttgctattga	aagaacacca	gcacattatc	8580	
atctcccag	atattagaat	caacaagcca	aagagggaat	ccttgattag	aaccccaatc	8640	
ttgaacaaat	tcaaccagat	caccgaatcc	attatcactc	catctacacc	atctttgtcc	8700	
caatccgatg	ttttgaaaac	tccaccaatc	aagtctttga	acaacactaa	gaactccagc	8760	30
ttgattaaca	ccccaccaat	tcaatctgtc	caacaacatc	aaaagcaaca	acaaaaggtc	8820	
caagtcatcc	aacaacagca	acaaccatta	tccagattgt	cctacaagag	caacaacaac	8880	
tctttogttt	tggttatcgg	tatttctggt	ccaggtgaac	ctatttccca	acaatccttg	8940	
aaagactcca	tctccaatga	cttttctgat	aaggctgaaa	ctaacgagaa	gggtcaagaga	9000	
atctttgagc	aatctcaaat	caagaccaga	cacttggtta	gagattacac	taagccagag	9060	
aactccatca	agttcagaca	tttggaaacc	attaccgatg	tgaacaacca	gttcaagaaa	9120	
gttgttccag	atthggctca	acaagcctgt	ttgagagctt	tgaaagattg	gggtggtgat	9180	
aagggtgata	ttaccatata	agtttctggt	acctccaccg	gtattatcat	cccagatggt	9240	
aatttcaagt	tgatcgactt	gttgggcttg	aacaaggatg	ttgaaagagt	gtctttgaaac	9300	40

【表 1 1 - 6 8】

ctaaggggtt gtttggctgg tttgagttct ttgagaactg ctgcttcttt ggctaaggct	9360	
tctccaagaa atagaatfff gggtgtctgt accgaagtct gctccttgca tttttcta	9420	
actgatggtg gtgatcaaat ggtcgctctt tctatfffft ctgatggttc tgcctgttac	9480	
attattgggtt gtaacccaag aattgaagaa accccattat acgaagtcac gtgctccatt	9540	
aacagatctt tcccaaatac cgaaaacgcc atggtttggg atttggaaaa agaaggttgg	9600	
aacttgggtt tggatgcttc tattccaatt gtcattgggt ctggtattga agccttcggt	9660	
gatactttgt tggataaggc taagttgcaa acttccactg ctatctctgc taaggattgc	9720	10
gaattcttga ttcatactgg tggcaagtcc atcttgatga acatcgaaaa ttccttgggt	9780	
atcgacccaa agcaactaa gaatacttg gatgtttacc atgcctacgg caatatgtca	9840	
tctgcctctg ttatcttctg tatggatcat gccagaaagt ccaagtcttt gccaaactac	9900	
tcaatctctt tggcttttgg tccaggtttg gcttttgaag gttgtttctt gaagaacgtc	9960	
gtctaaagac ataaaactga aacaacacca attaataata gactttacag aagacgggag	10020	
acactagcac acaactttac caggcaaggt atttgacgct agcatgtgtc caattcagtg	10080	
tcatttatga tttttttag taggatataa atatatacag cgctccaaat agtgcggttg	10140	
ccccaaaaac accacggaac ctcatctggt ctogtacttt gttgtgacaa agtagctcac	10200	
tgccttatta tcacattttc attatgcaac gcttcggaaa atacgatgtt gaaaatgcct	10260	20
ctagagatga aaaacaatcg taaaagggtc ctgcgtaatt gaaacatttg atcagtatgc	10320	
agtggcacag aaacaaccag gaatactata gtcataggca atacaaggta tatattggot	10380	
atgcagaccc ctccagaaag taccgacgtc aagttagata cacttaacga acctagtga	10440	
catttaattg agaaaaatgt ggctcttctt aaggacatat tccgttcgta cttgagttat	10500	
tggatctatg aaatcgctcg ctatacacca gtcatgattt tgctcctctt tatattacat	10560	
caaaataaga aaataattat aaca	10584	
<210>	38	
<211>	10584	
<212>	DNA	30
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cassette with Dictyostelium discoideum DiPKS (G1516R) coding sequence,	
	regulatory sequences and integration sequences	
<220>		
<221>	LV3	
<222>	(1)..(40)	40

【表 1 1 - 6 9】

<220>		
<221>	S. cerevisiae GAL1 promoter	
<222>	(41)..(482)	
<220>		
<221>	L1	
<222>	(483)..(522)	
<220>		10
<221>	DiPKS	
<222>	(523)..(9966)	
<220>		
<221>	C-methyltransferase domain	
<222>	(5050)..(5412)	
<220>		
<221>	G1516R	
<222>	(5069)..(5070)	
<220>		20
<221>	Motif 2	
<222>	(5309)..(5331)	
<220>		
<221>	Motif 3	
<222>	(5389)..(5421)	
<220>		
<221>	Type III PKS domain	
<222>	(8881)..(9966)	
<220>		30
<221>	L2	
<222>	(9967)..(10006)	
<220>		
<221>	PRM9t	
<222>	(10007)..(10544)	
<220>		
<221>	LV5	
<222>	(10545)..(10584)	
<400>	38	40

【表 1 1 - 7 0】

aggaatactc tgaataaaac aacttatata ataaaaatgc cggattagaa gccgccgagc	60	
gggtgacagc cctccgaagg aagactctcc tccgtgcgtc ctcgcttca ccggtcgcgt	120	
tcctgaaaag cagatgtgcc tcgcgccgca ctgctccgaa caataaagat tctacaatac	180	
tagcttttat ggttatgaag aggaaaaatt ggcagtaacc tggccccaca aaccttcaaa	240	
tgaacgaatc aaattaacaa ccataggatg ataatgcatg tagtttttta gccttatttc	300	
tggggtaatt aatcagcga gcgatgattt ttgatctatt aacagatata taaatgcaaa	360	
aactgcataa ccactttaac taatactttc aacattttcg gtttgtatta ottcttattc	420	10
aatgtaata aaagtatcaa caaaaaattg ttaatatacc tctatacttt aacgtcaagg	480	
agctagaaaa tttattataa aaggaagaga aataattaaa caatgaacaa gaactccaaa	540	
atccagtooc caaactcttc tgatgttgct gttattgggtg ttggttttag attcccagggt	600	
aactcfaatg acccagaatc tttgtggaac aacttggttg atggtttcga tgctattacc	660	
caagtcccaa aagaaagatg ggctacttct tttagagaga tgggtttgat caagaacaag	720	
ttcgggtggtt tcttgaagga ttctgaatgg aagaatttcg accctttggt otttgggtatc	780	
ggtccaaaag aagctccatt cattgatcca caacaaagggt tgttgttgc catcgtttggt	840	
gaatctttgg aagatgctta catcagacca gatgaattga gaggttctaa cactgggtgtt	900	
ttcatcgggtg tttctaacaa cgattacacc aagttgggtt tccaagacaa ctactctatt	960	20
tctccataca ctatgaccgg ctctaactct tcattgaact ccaacagaat ttcctactgc	1020	
ttcgatttta gaggtccatc cattaactgtt gataccgctt gttctcttc ottggtttct	1080	
gttaatttggt gtgtccaatc catccaaatg ggtgaatgta agattgctat ttgcgggtggt	1140	
gttaacgctt tgtttgatcc atctacatct gttgcctttt ccaagttggg tgttttgtct	1200	
gaaaatggca gatgcaactc ttttagtgat caagcctctg gttacgtag atctgaagggt	1260	
gctgggtgtt ttgttttgaa gtctttggaa caagctaagt tggatggtga tagaatctac	1320	
ggtgttatca aggggtgttc ctctaataa gatggtgctt ctaatggtga caagaactct	1380	
ttgactactc catcttgta agcccaatcc attaacattt ctaaggctat ggaaaaggcc	1440	
tccttgtctc catctgatat ctattacatt gaagcccatg gtactggtac tccagttggt	1500	30
gatccaattg aagttaaggc cttgtccaag atcttctcca actctaacaa caaccagttg	1560	
aacaacttct ctaccgatgg taatgataac gatgatgatg atgacgataa cacctctcca	1620	
gaaccattat tgattggctc attcaagtc aacatcggtc atttggatc tgctgctggt	1680	
attgcttctt tgattaagtg ttgcttgatg ttgaagaaca ggatgttgggt tccatccatt	1740	
aactgctcta atttgaacc atccattcca ttcgatcagt acaacatctc cgttatcaga	1800	
gaaatcagac aattcccaac cgataagttg gttaacatcg gtatcaattc tttoggtttc	1860	
ggtggttcta actgccattt gattattcaa gactacaaca acaacttcaa gaacaactct	1920	
accatctgca ataacaacaa caacaacaat aacaacatcg actacttgat cccaatctcc	1980	
tctaagacta agaagtcctt ggataagtac ttgattttga tcaagaccaa ctccaactac	2040	40

【表 1 1 - 7 1】

cacaaggata	tttctttcga	tgacttcgtc	aagttccaaa	tcaagtctaa	gcagtacaac	2100	
ttgtccaaca	gaatgactac	cattgctaac	gattggaact	ccttcattaa	gggttctaac	2160	
gaattccaca	acttgatcga	atctaaggat	ggatgaaggat	gttcttcac	ttctaacaga	2220	
ggatttgatt	ccgccaatca	aatcaacact	actactacct	ctaccatcaa	cgatatcgaa	2280	
cctttgttgg	ttttcgtttt	ctgtgggtcaa	ggccacaat	ggaatggat	gattaagacc	2340	
ttgtacaact	ccgagaacgt	ttcaagaac	accgttgatc	atgttgacag	catcttgtac	2400	
aagtacttcg	gttactccat	ttgaacgtc	ttgtctaaga	tcgatgataa	cgacgattcc	2460	10
atcaaccatc	caatagttgc	tcaaccatct	ttgttcttgt	tgcaaattgg	tttggctogag	2520	
ttgtttaagt	actgggggat	ctaccatct	atctctgttg	gtcattcttt	cggtgaagtc	2580	
tcttcttatt	acttgccgg	tatcatctct	ttggaaaccg	cttgtaaaat	cgctctacgtc	2640	
agatcctcta	atcagaacaa	aactatgggt	tccggtaaga	tggtgggtgt	ttctatgggt	2700	
tttaagcaat	ggaacgatca	attctctgct	gaatgggtccg	atattgaaat	tgcttgttac	2760	
aacgctccag	attccatagt	tggtactggg	aacgaagaaa	gattgaaaga	attgtccatc	2820	
aagttgtccg	acgaatccaa	tcaaattttc	aacaccttct	tgaggtcccc	atgttctttt	2880	
cattcttccc	atcaagaagt	catcaagggt	tctatgttcg	aagagttgtc	taacttgcaa	2940	
tctactggtg	aaaccgaaat	ccctttgttc	tctactgtta	ctggtagaca	agttttgtct	3000	20
ggcatgttta	ctgctcaaca	catctacgat	aatgttagag	aaccagtctt	gttccaaaag	3060	
acgattgaat	ccattacctc	ctacatcaag	totcactacc	catccaatca	aaagggttate	3120	
taagttgaaa	ttgctccaca	cccaaccttg	ttttcattga	tcaaaaagtc	catcccatcc	3180	
tccaacaaga	attcctcttc	tgttttgtgt	ccattgaaca	gaaaagaaaa	ctccaacaac	3240	
tcctacaaga	agttcgtttc	tcagttgtac	ttcaacgggtg	ttaacgttga	cttcaacttc	3300	
cagttgaact	ccatttgcca	taacgttaac	aacgatcacc	atttgaacaa	cgcaagcaa	3360	
aactccttca	aagagactac	caattccttg	ccaagatacc	aatgggaaca	agatgaatat	3420	
tggtccgaac	cattgatctc	cagaaagaat	agattggaag	gtccaactac	ttccttggtg	3480	
ggcatagaa	ttatctacag	cttcccagtt	ttccaatccg	tttggactt	gcaatctgac	3540	30
aactacaaat	acttgttgga	ccacttggtt	aacggtaagc	cagtttttcc	agggtgctggt	3600	
tatttgata	tcacatcga	attcttcgac	taccaaagc	agcagttgaa	ttcctctgat	3660	
tcctctaact	cctacatcat	caacgttgac	aagatccaat	tcttgaacc	aattcacttg	3720	
accgaaaaca	agttgcaaac	cttgcaatct	tctttcgaac	ctatcgttac	taagaagtct	3780	
gccttctctg	ttaacttctt	catcaaggat	accgtcgagg	atcaatctaa	ggttaagtct	3840	
atgtctgacg	aaacttgac	taacacttgt	aaggctacca	ttccttgga	acaacaacag	3900	
ccatctocat	cttctacttt	gactttgtct	aagaagcaag	acttgacgat	cttgagaaac	3960	
agatgcgata	ttagcaagct	agacaagttt	gagttgtacg	acaagatctc	taagaatttg	4020	40
ggcttgcagt	acaactcctt	gtttcaagtt	ggtgatacca	tcgaaactgg	taaggattgc	4080	

【表 1 1 - 7 2】

tcttttgcta	ctttgtcttt	gccagaagat	actttgttca	ccaccatttt	gaacccatgc	4140	
ttgttgata	actgtttcca	tggtttggtg	accttgatca	acgaaaaggg	ttctttcgtt	4200	
gtcgagtcca	tttcttctgt	ttctatctac	ttggagaaca	tcggttcctt	caatcaaaact	4260	
tctgttggtg	acgtccagtt	ctacttgtag	accactatft	ctaaagccac	ctccttttagt	4320	
tctgaaggta	cttgtaagtt	gttcaccaag	gatggttcct	tgattttgtc	tatcggtaag	4380	
ttcatcatca	agtccaacca	tccaaagtct	actaagacca	acgaaactat	cgaatctcca	4440	
ttggacgaaa	ccttctctat	tgaatggcaa	tctaaggatt	ctccaattcc	aaccccacaa	4500	10
caaatccaac	aacaatctcc	attgaaactct	aacccatcct	tcattagatc	taccatcttg	4560	
aaggacatcc	agttogaaca	atactgctcc	tccattatcc	acaagaatt	gatcaaccac	4620	
gaaaagtaca	agaaccagca	atccttcgat	atcaactcct	tggaaaacca	cttgaacgat	4680	
gaccaattga	tggaaatcctt	gtccatctcc	aaagaatact	tgagattcctt	caccaggatc	4740	
atctccatca	ttaagcaata	cccaaagatc	ttgaacgaaa	aagagctaaa	agaattgaaa	4800	
gaaatcatcg	aattgaagta	cccatccgaa	gttcagttgt	tggaaatcga	agttatcgag	4860	
aaggtgtcca	tgattatccc	aaagttggtg	ttcgaaaacg	acaagcaatc	ttccatgacc	4920	
ttgttccaag	ataacttggt	gaccaggttc	tactccaatt	ctaactctac	cagattctac	4980	
ttggaaaggg	tttccgaaat	ggtcttgtaa	tctattagac	caatcgtcag	agaaaagagg	5040	20
gtgttcagaa	ttttagagat	cgggtctcgt	acaggtcctt	tgtctaattgt	tgttttgact	5100	
aagttgaaca	cctacttgtc	caccttgaat	tctaattggtg	gttctgggta	caacatcatc	5160	
atgagtaca	ccttcaccga	tatttccgcc	aacttcatta	ttggtgaaat	ccaagaacc	5220	
atgtgcaact	tgtaccctaaa	cgttactttc	aagttctccg	tcttggaact	ggagaaagag	5280	
attattaact	cctccgattt	cttgatgggt	gattacgata	tagttttgat	ggcctacggt	5340	
atccatgccg	tttctaacat	taagttctcc	atcgaacagt	tgtacaagtt	gttgtctcca	5400	
agaggttggt	tgttgtgtat	tgaacctaa	tccaacggtg	tgttctccga	tttggttttc	5460	
ggttgtttta	atcagtggtg	gaactactac	gatgatatta	gaactacca	ctgctccttg	5520	
tctgaatctc	aatggaatca	gttggtggtg	aaccagtcct	tgaacaacga	atcctcttct	5580	30
tcttctaact	gttacggtgg	tttctccaac	gtttctttta	ttggtggtga	aaaggatgtc	5640	
gactcccatt	ctttcatatt	gcactgcaa	aaagaatcca	tctcccaat	gaagttagcc	5700	
accactatta	acaacggttt	gtcatctggt	tccatcggtta	tcgttttgaa	ctctcaacaa	5760	
ttgaccaaca	tgaagtctca	cccaaaggtt	attgagtata	ttcaagaggc	tacctctttg	5820	
tgcaagaoca	ttgaaattat	cgattccaag	gacgtcttga	actctacca	ttcagttttg	5880	
gaaaagatcc	aaaagtcctt	gttggtggtc	tgtttggttg	ggtatgactt	gttggagaac	5940	
aactaccaag	aacagtcctt	cgaatacgtt	aagttggtga	acttgatctc	tactaccgcc	6000	
tcttcatcta	atgataagaa	accaccaaag	gtcttggtga	tcaccaagca	atctgaaaga	6060	
atctccaggt	ctttctactc	cagatccttg	attggtatft	ccagaacctc	tatgaacgag	6120	40

【表 1 1 - 7 3】

tacccaaatt	tgtccattac	ctctatcgat	ttggatacca	acgactactc	attgcagtct	6180
ttgttgaagc	caatcttcag	caactctaag	ttttccgaca	acgagttcat	cttcaaaaag	6240
ggcttgatgt	tcgtgtccag	gatctttaag	aacaagcagt	tgctagaatc	ctccaacgct	6300
tttgaaactg	actcttctaa	cttgactgt	aaggcctctt	ctgacttgtc	ttacaagtac	6360
gctattaagc	agtctatggt	gaccgaaaat	cagatcgaaa	tcaaggttga	atgcgtcggc	6420
attaacttca	aggacaacct	attctacaag	ggcttggtgc	cacaagaaat	tttcagaatg	6480
ggtgacatct	acaatccacc	atatggtttg	gaatgctctg	gtgttattac	cagaattggt	6540
tctaacgtca	ccgaatactc	agttgggtcaa	aatgtttttg	gtttcgccag	acattctttg	6600
ggttctcatg	ttgttaccaa	caaggatttg	gttatcttga	agccagatac	catctcattt	6660
tctgaagctg	cttctatccc	agttgtttac	tgtactgctt	ggtactcctt	gttcaacatt	6720
ggtcagttgt	ctaacgaaga	atccatccta	attcattctg	ctactgggtg	tgtaggtttg	6780
gcttctttga	atgtgttgaa	aatgaagaat	cagcaacagc	aaccattgac	caatgtttat	6840
gctactgttg	gctctaacga	gaagaagaag	ttcttgatcg	ataacttcaa	caacttgttc	6900
aaagaggacg	gcgaaaacat	tttctctacc	agagacaaag	aatactcaa	ccagttggaa	6960
tccaagatcg	atgttatttt	gaacaccttg	tccggtgaat	tcgtcgaatc	taatttcaag	7020
tccttgagat	ccttcggtag	attgattgat	ttgtctgcta	ctcacgttta	cgccaatcaa	7080
caaattggtc	taggtaactt	caagttcgac	cacttgatt	ctgctgttga	cttggaaga	7140
ttgatcgacg	aaaaacctaa	gttgttgacg	tccatcttgc	aaagaattac	caactctatc	7200
gtcaacggtt	ccttggaaaa	aattccaatt	accatcttcc	catccaccga	aactaaggat	7260
gctatcgaat	tattgtccaa	gagatcccat	atcggtaaag	ttgttgtaga	ttgcaaccgat	7320
atctctaagt	gtaatcctgt	tggatgctg	atcaccaact	tctctatgag	attgccaaaag	7380
ccaaactacc	agttgaattt	gaactccacc	ttgttgatta	ctggtcagtc	tggtttgtct	7440
atccctttgt	tgaattgggt	gttgtctaag	tctgggtgta	acgttaagaa	cgttgtcatc	7500
atctctaagt	ccaccatgaa	gtggaagttg	cagactatga	tttccattt	cgtttccggc	7560
ttcggtatcc	atlttaacta	cgttcaagtc	gacatotcca	actacgatgc	tttgtctgaa	7620
gctattaagc	aattgccatc	tgatttgcca	ccaatcacct	ctgtttttca	tttggctgct	7680
atctacaacg	atgttccaat	ggatcaagtt	accatgtcta	ccggtgaatc	tgttcataac	7740
cctaaagttt	tgggtgccgt	taacttgcat	agaatctctg	tttcttttg	ttggaagttg	7800
aaccacttog	tcttgttctc	ttctattact	gctattaccg	gttaccaga	ccaatctatc	7860
tacaattctg	ccaactctat	tttgacgct	ttgtccaact	ttagaaggtt	tatgggtttg	7920
ccatctttct	ccattaactt	gggtccaatg	aaggatgaag	gtaaggtttc	taccaacaag	7980
agcatcaaga	agctattcaa	gtctagaggt	ttgccaagcc	tatccttgaa	caagttattt	8040
ggtttggttg	aggtcgtcat	caacaacca	totaatcatg	ttatcccatc	ccaattgatt	8100
tgctccocaa	tcgatttcaa	gacctacatc	gaatctttct	caactatgag	gccaaagttg	8160

10

20

30

40

【表 1 1 - 7 4】

ttacacttgc	aacctacat	ttccaagcag	caatcttcta	tcattaacga	ttctaccaag	8220
gcttcctcca	acatttcatt	gcaagataag	atcacctcca	aggtgtctga	ttgtttgtcc	8280
attccaatct	ccaagatcaa	cttcgatcat	ccattgaaac	actacggctt	ggattctttg	8340
ttgaccgttc	aattcaaate	ctggatcgac	aaagaattcg	aaaagaactt	gttcacccat	8400
atccaattgg	ccaccatctc	tattaactca	ttcttgghaa	aggtgaacgg	cttgtctaca	8460
aacaataaca	acaacaacaa	ttccaacgic	aagtctctct	catccattgt	caaagaagaa	8520
atcgttacct	tggaacaagga	tcaacaacca	ttgctattga	aagaacacca	gcacattatc	8580
atctcccag	atattagaat	caacaagcca	aagaggggat	ccttgattag	aacccaatc	8640
ttgaacaaat	tcaaccagat	caccgaatcc	attatcactc	catctacacc	atctttgtcc	8700
caatccgatg	ttttgaaaac	tccaccaatc	aagtctttga	acaacactaa	gaactccagc	8760
ttgattaaca	cccaccaat	tcaatctgtc	caacaacatc	aaaagcaaca	acaaaaggtc	8820
caagtcatcc	aacaacagca	acaaccatta	tccagattgt	cctacaagag	caacaacaac	8880
tctttcgttt	tggttatcgg	tatttctgtt	ccaggtgaac	ctatttccca	acaatccttg	8940
aaagactcca	totccaatga	cttttctgat	aaggctghaa	ctaacgagaa	ggtcaagaga	9000
atctttgagc	aatctcaaat	caagaccaga	caottgggta	gagattacac	taagccagag	9060
aactccatca	agttcagaca	tttgaaacc	attaccgatg	tgaacaacca	gttcaagaaa	9120
gttgttccag	atgttgctca	acaagcctgt	ttgagagctt	tgaagattg	gggtggtgat	9180
aagggtgata	ttaccatata	agtttctgtt	acctccaccg	gtattatcat	cccagatggt	9240
aatttcaagt	tgatcgactt	gttggtcttg	aacaaggatg	ttgaaagagt	gtctttgaac	9300
ctaattgggt	gtttggctgg	tttgagttct	ttgagaactg	ctgcttcttt	ggctaaggct	9360
tctccaagaa	atagaatctt	ggttgtctgt	accgaagtct	gctccttgca	tttttctaata	9420
actgatggtg	gtgatcaaat	ggtcgctctc	tctatctttg	ctgatgggtc	tgtctcttac	9480
attattgggt	gtaaccacag	aattgaagaa	acccattat	acgaagtcat	gtgctccatt	9540
aacagatctt	tcccaatac	cgaaaacgcc	atggtttggg	atgtgaaaa	agaagggttg	9600
aacttgggtt	tgatgcttc	tattccaatt	gtcattgggt	ctggtattga	agccttctgt	9660
gatactttgt	tggaataaggc	taagttgcaa	acttccactg	ctatttctgc	taaggattgc	9720
gaattcttga	ttcatactgg	tggaagctcc	atcttgatga	acatcgaaaa	ttccttgggt	9780
atcgacccaa	agcaaaactaa	gaatacttgg	gatgtttacc	atgcctacgg	caatatgtca	9840
tctgcctctg	ttattttctg	tatggatcat	gccagaaagt	ccaagtcttt	gccaacttac	9900
tcaatttctt	tggtcttttg	tccaggtttg	gcttttgaag	gttgtttctt	gaagaacgic	9960
gtctaaagac	ataaaaactga	aacaacacca	attaataata	gactttacag	aagacgggag	10020
acactagcac	acaactttac	caggcaaggt	atgtgacgct	agcatgtgtc	caattcagtg	10080
tcatttatga	ttttttgtag	taggatataa	atatatacag	cgctccaaat	agtgcgggtg	10140
ccccaaaaac	accacggaac	ctcatctggt	ctcgtacttt	gttgtgacaa	agtagctcac	10200

10

20

30

40

【表 1 1 - 7 5】

tgcttatta tcacattttc attatgcaac gcttcggaaa atacgatggt gaaaatgcct	10260	
ctagagatga aaaacaatcg taaaagggtc ctgcgtaatt gaaacatttg atcagtatgc	10320	
agtggcacag aaacaaccag gaatactata gtcataggca atacaaggta tatattggct	10380	
atgcagacct ctccagaaag taccgacgtc aagttagata cacttaacga acctagtgca	10440	
catttaattg agaaaaatgt ggctcttct aaggacatat tccgttcgta cttgagttat	10500	
tggatctatg aaatcgctcg ctatacacca gtcatgattt tgtccctctt tatattacat	10560	
caaaataaga aaataattat aaca	10584	10
<210> 39		
<211> 6034		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Plasmid		
<220>		
<221> LV5		
<222> (1)..(40)		20
<220>		
<221> pYES2-LEU2		
<222> (1915)..(4123)		
<220>		
<221> LEU2 ORF		
<222> (1996)..(3090)		
<220>		
<221> LEU2 promoter		
<222> (3091)..(3999)		30
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (3759)..(3760)		
<223> n i s a , c , g , o r t		
<220>		
<221> LV3		
<222> (5995)..(6034)		
<400> 39		
cctctttata ttacatcaaa ataagaaaat aattataaca cctgcattaa tgaatoggcc	60	40

【表 1 1 - 7 6】

aacgcgcggg	gagaggcggg	ttgcgtattg	ggcgctcttc	cgcttcctcg	ctcaactgact	120
cgctgcgctc	ggtcggttcgg	ctgcggcgag	cggtatcagc	tcaactcaaag	gcggtaatac	180
ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	240
agcccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcggtgc	tggcggttttt	ccataggctc	cgccccctg	300
acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agagggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	360
gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgctc	tcctgttcog	accctgccgc	420
ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccott	cggaagcgt	ggcgctttct	catagctcac	480
gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggctg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	540
cccccgttca	gcccgaccgc	tgcgccttat	ccggtaacta	tcgtcttgag	tccaacccgg	600
taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgagggt	660
atgtagggcg	tgctacagag	ttcttgaagt	ggtaggcctaa	ctacggctac	actagaagga	720
cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	cgaaaaaga	gttggtagct	780
cttgatccgg	caaaaaacc	accgctggta	gcggtggttt	ttttgttgc	aagcagcaga	840
ttaccgagcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	900
ctcagtgga	cgaaaaactca	cgttaaggga	ttttggatcat	gagattatca	aaaaggatct	960
tcacctagat	cctttttaat	taaaaatgaa	gtttttaatc	aatctaaagt	atatatgagt	1020
aaacttggtc	tgacagttac	caatgcttaa	tcagtgaggc	acctatctca	gcgatctgtc	1080
tatttoggto	atccatagtt	gcctgactcc	cogtcgtgta	gataactacg	atacgggagc	1140
gottaaccatc	tggccccagt	gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	1200
atztatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	gggcccagcg	cagaagtggg	cctgcaactt	1260
tatccgcctc	cattcagctc	attaattggt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	1320
ttaatagttt	gcgcaacggt	gttggcattg	ctacaggcat	cgtgggtgca	ctctcgtcgt	1380
ttggatggc	ttcattcagc	tcgggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccca	1440
tgttgtgcaa	aaaagcgggt	agctccttcg	gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagttgg	1500
ccgcagtggt	atcactcatg	gttatggcag	cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccc	1560
ccgtaagatg	cttttctgtg	actgggtgag	actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgt	1620
tgcggcgacc	gagttgctct	tgcccggcgt	caatacggga	taatagtgt	tcacatagca	1680
gaactttaaa	agtgctcatc	attggaaaac	gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	1740
taccgctggt	gagatccagt	tcgatgtaac	ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	1800
cttttacttt	caccagcgtt	tctgggtgag	caaaaacagg	aaggcaaaat	gccgcaaaaa	1860
agggataaag	ggcgacacgg	aaatggtgaa	tactcatact	cttccttttt	caatgggtaa	1920
taactgatat	aattaaattg	aagctcfaat	ttgtgagttt	agtatacatg	catttaotta	1980
taatacagtt	ttttattaag	caaggatttt	cttaacttct	tcggcgacag	catcaocgac	2040
ttcgggtgga	ctggttgaac	cacctaaatc	accagttctg	atacctgcat	ccaaaacctt	2100

10

20

30

40

【表 1 1 - 7 7】

tttaactgca	tcttcaatgg	ccttaccttc	ttcaggcaag	ttcaatgaca	atctcaacat	2160
cattgcagca	gacaagatag	tggcgatagg	gttgacctta	ttctttggca	aatctggage	2220
agaaccgtgg	catggttcgt	acaaacaaa	tgcgggtgttc	ttgtctggca	aagaggccaa	2280
ggacgcagat	ggcaacaaac	ccaaggaacc	tgggataacg	gaggcttcat	cggagatgat	2340
atcaccaaaac	atggttgctgg	tgattataat	accatcttagg	tgggttggtt	tcttaactag	2400
gatcatggcg	gcagaatcaa	tcaattgatg	ttgaaccttc	aatgtaggga	attcgttctt	2460
gatggttttc	tccacagttt	ttctccataa	tcttgaagag	gccaaaacat	tagctttatc	2520
caaggaccaa	ataggcaatg	gtggctcatg	ttgtagggcc	atgaaagcgg	ccattcttgt	2580
gattctttgc	acttctggaa	cgggtgattg	ttcactatcc	caagcgacac	catcaccatc	2640
gtcttccttt	ctcttaccaa	agtaaatacc	tcccactaat	tctctgacaa	caacgaagtc	2700
agtaccttta	gcaaattgtg	gcttgattgg	agataagtct	aaaagagagt	cggatgcaaa	2760
gttacatggt	cttaagttgg	cgtacaattg	aagttcttta	cggattttta	gtaaaccttg	2820
ttcaggctca	acactaccgg	taccccattt	aggaccaccc	acagcaccta	acaaaaocggc	2880
atcagccttc	ttggaggcct	ccagcgcctc	atctggaagt	ggaacacctg	tagcatcgat	2940
agcagcacca	ccaattaaat	gattttogaa	atcgaacttg	acattggaac	gaacatcaga	3000
aatagcttta	agaaccttaa	tggcttcggc	tgtgatttct	tgaccaacgt	ggtcacctgg	3060
caaaacgacg	atcttcttag	gggcagacat	tagaatggta	tatccttgaa	atatatatat	3120
atattgctga	aatgtaaaag	gtaagaaaag	ttagaaagta	agacgattgc	taaccaccta	3180
ttggaaaaaa	caataggtcc	ttaaataata	ttgtcaactt	caagtattgt	gatgcaagca	3240
tttagtcatg	aacgcttctc	tattctatat	gaaaagccgg	ttccggcgct	ctcacctttc	3300
ctttttctcc	caatttttca	gttgaaaaag	gtatatgctg	caggcgacct	ctgaaattaa	3360
caaaaaatth	ccagtcacgc	aatttgattc	tgtgctgatg	cgccccgtg	tgttctogtt	3420
atggtgagga	aaaaaataat	ggttgctaag	agattcgaac	tcttgcatct	tacgatacct	3480
gagtattccc	acagtttaact	gcggtcaaga	tatttcttga	atcaggcgcc	ttagaccgct	3540
cggccaaaca	accaattact	tgttgagaaa	tagagtataa	ttatcctata	aatataacgt	3600
ttttgaacac	acatgaacaa	ggaagtacag	gacaattgat	tttgaagaga	atgtggatth	3660
tgatgtaatt	gttgggattc	catttttaat	aaggcaataa	tattaggtat	gtagatatac	3720
tagaagttct	cctcgaggat	ttaggaatcc	ataaaaggnn	atctgcaatt	ctacacaatt	3780
ctagaaatat	tattatcatc	atthtatatg	ttaatatthca	ttgatcctat	tacattatca	3840
atccttgctg	ttcagcttcc	actaatthtag	atgactatth	ctcatcatth	gcgtcatctt	3900
ctaacaccgt	atatgataat	atactagtaa	cgtaaaact	agttagtaga	tgatagttga	3960
tttttattcc	aacataccac	ccataatgta	atagatctag	cttatcgatg	ataagctgtc	4020
aaagatgaga	attaattcca	cggactatag	actataccta	gtatactccg	tctactgtac	4080
gatacacttc	cgctcaggtc	cttgtcctth	aacgaggcct	taccactctt	ttgttactct	4140

10

20

30

40

【表 1 1 - 7 8】

attgatccag ctacagcaaag gcagtgatgat ctaagattct atcttcgcga tgtagtaaaa 4200
ctagctagac cgagaaagag actagaaatg caaaaggcac ttctacaatg gctgccatca 4260
ttattatccg atgtgacgct gcagcttctc aatgatattc gaatacgctt tgaggagata 4320
cagcctaata tccgacaaac tgttttacag atttacgata gtacttgta cccatcattg 4380
aattttgaac atccgaacct gggagttttc cctgaaacag atagtatatt tgaacctgta 4440
taataatata tagtctagcg ctttacggaa gacaatgtat gtatttcggt tcctggagaa 4500
actattgcat ctattgcata ggtaatcttg cacgtcgcat ccccggttca ttttctgogt 4560
ttccatcttg cacttcaata gcatatcttt gttaacgaag catctgtgct tcattttgta 4620
gaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt tttcaaacia agaactgag ctgcattttt 4680
acagaacaga aatgcaacgc gaaagcgcta ttttaccac gaagaactg tgcttcattt 4740
ttgtaaaaca aaaatgcaac gcgacgagag cgctaatttt tcaaaciaag aatctgagct 4800
gcattttttac agaacagaaa tgcaacgcga gagcgctatt ttaccaacia agaacttata 4860
cttctttttt gttctacaaa aatgcatccc gagagcgcta tttttctaac aaagcatctt 4920
agattaactt ttttctcctt tgtgcgctct ataatgcagt ctcttgataa ctttttgca 4980
tgtaggtccg ttaaggttag aagaaggcta ctttggtgct tattttctct tccataaaaa 5040
aagcctgact ccacttcccg cgtttactga ttactagcga agctgcgggt gcattttttc 5100
aagataaagg catccccgat tatattctat accgatgtgg attgcgcata ctttgatgac 5160
agaaagtgat agcgttgatg attcttcatt ggtcagaaaa ttatgaacgg tttctctat 5220
tttgtctcta tatactacgt ataggaaatg tttacatttt cgtattgttt togattcact 5280
ctatgaatag ttcttactac aatttttttg tctaaagagt aatactagag ataaacataa 5340
aaaatgtaga ggtcgagttt agatgcaagt tcaaggagcg aaagggtgat gggtaggtta 5400
tatagggata tagcacagag atatatagca aagagatact tttgagcaat gtttgatgaa 5460
goggtattcg caatgggaag ctccaccccg gttgataatc agaaaagccc caaaaacagg 5520
aagattgtat aagcaaatat ttaaattgta aacgttaata ttttgtaaa attcgcgtta 5580
aatttttggt aatcagctc attttttaac gaatagcccg aatcggcaa aatcccttat 5640
aatcaaaaag aatagaccga gataggggtg agtggtgctc cagtttcaa caagagtcca 5700
ctattaaaga acgtggactc caacgtcaa gggcgaaaaa gggctatca gggcgatggc 5760
ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcagta 5820
aatcggaagg gtaaacggat gccccattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg 5880
gcgagaaagg aaggaagaa agcgaaagga gcgggggcta gggcggtgg aagtgtaggg 5940
gtcacgctgg gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg gggcgctaca gggcaggaat 6000
actctgaata aaacaactta tataataaaa atgc 6034

10

20

30

<210> 40

<211> 5056

40

【表 1 1 - 7 9】

<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	Plasmid					
<220>						
<221>	LV5					
<222>	(1)..(40)		10			
<220>						
<221>	pYES backbone					
<222>	(41)..(5016)					
<220>						
<221>	AmpR					
<222>	(1040)..(1699)					
<220>						
<221>	URA3					
<222>	(1915)..(3022)		20			
<220>						
<221>	LV3					
<222>	(5017)..(5056)					
<400>	40					
cctctttata	ttacatcaaa	ataagaaaat	aattataaca	cctgcattaa	tgaatcggcc	60
aacgcgcggg	gagaggcgg	ttgcgtattg	ggcgcctctc	cgcttcctcg	ctcactgact	120
cgctgcgctc	ggtcgttcgg	ctgcggcgag	cggtatcagc	tactcaaaag	gcggaataac	180
ggttatccac	agaatcagg	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	240
agcccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcggtgc	tggcgTTTTT	ccataggctc	cgccccctg	300
acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agaggtggcg	aaaccgaca	ggactataaa	360
gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgctc	tcctgttccg	accctgccgc	420
ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	cggaagcgt	ggcgcTTTct	catagctcac	480
gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	540
cccccgttca	gcccgaccgc	tgcgccttat	ccggtaacta	tcgtcttgag	tccaaccgg	600
taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgaggt	660
atgtagggcg	tgctacagag	ttcttgaagt	ggcggcctaa	ctacggctac	actagaagga	720
cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	cgaaaaaga	gttggtagct	780
cttgatccgg	caaacaacc	accgctggta	gcggtggttt	TTTTgtttgc	aagcagcaga	840

30

40

【表 1 1 - 8 0】

ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	900	
ctcagtggaa	cgaaaactca	cgtaagggga	ttttggtcac	gagattatca	aaaaggatct	960	
tcacctagat	cctttttaat	taaaaatgaa	gtttttaaate	aatctaaagt	atatatgagt	1020	
aaacttggtc	tgacagttac	caatgcttaa	tcagtgaggc	acctatctca	gcgatctgtc	1080	
tatttcgttc	atccatagtt	gcctgactcc	ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagc	1140	
gcttaccatc	tggccccagt	gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	1200	
atztatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	gggccgagcg	cagaagtggg	cctgcaactt	1260	10
tatccgcctc	cattcagtct	attaattggt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	1320	
ttaatagttt	gcgcaacggt	gttggcattg	ctacaggcat	cgtgggtgca	ctctcgtcgt	1380	
ttggtatggc	ttcattcagc	tccggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccc	1440	
tgttgtgcaa	aaaagcgggt	agtccttcg	gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagttgg	1500	
ccgcagtgtt	atcactcatg	gttatggcag	cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccat	1560	
ccgtaagatg	cttttctgtg	actggtgagt	actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgta	1620	
tgccggcgacc	gagttgctct	tgcccggcgt	caatacggga	taatagtgta	tcacatagca	1680	
gaactttaaa	agtgctcatc	attggaaaac	gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	1740	
taccgctggt	gagatccagt	tcgatgtaac	ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	1800	20
cttttacttt	caccagcgtt	tctgggtgag	caaaaacagg	aaggcaaaat	gccgcaaaaa	1860	
agggataaag	ggcgacacgg	aatggtgaa	tactcatact	cttccttttt	caatgggtaa	1920	
taactgatat	aattaaattg	aagctcta	ttgtgagttt	agtatacatg	catttactta	1980	
taatacagtt	ttttagtttt	gctggccgca	tcttctcaaa	tatgcttccc	agcctgcttt	2040	
tctgtaacgt	tcaccctcta	ccttagcatc	ccttcccttt	gcaaatagtc	ctcttccaac	2100	
aataataatg	tcagatcctg	tagagaccac	atcatccacg	gttctatact	gttgacccaa	2160	
tgctctccc	ttgtcatcta	aaccacacc	gggtgtcata	atcaaccaat	cgtaaccttc	2220	
atctcttcca	cccatgtctc	tttgagcaat	aaagccgata	acaaaatctt	tgctcgtctt	2280	
cgcaatgtoa	acagtaccct	tagtatatc	tccagtagat	agggagccct	tgcatgacaa	2340	30
ttctgctaac	atcaaaaggc	ctctaggttc	ctttgttact	tcttctgccg	cctgcttcaa	2400	
accgctaaca	atacctgggc	ccaccacacc	gtgtgcattc	gtaatgtctg	cccattctgc	2460	
tattctgtat	acaccgcgag	agtactgcaa	tttgactgta	ttaccaatgt	cagcaaat	2520	
tctgtcttcg	aagagtaaaa	aattgtactt	ggcggataat	gccttttagcg	gcttaactgt	2580	
gccctccatg	gaaaaatcag	tcaagatata	cacatgtggt	tttagtaaac	aaat	2640	
acctaagct	tcaactaact	ccagtaattc	cttggtggta	cgaacatcca	atgaagcaca	2700	
caagtttggt	tgcttttcgt	gcatgatatt	aaatagcttg	gcagcaacag	gactaggatg	2760	
agtagcagca	cgttccttat	atgtagcttt	cgacatgatt	tatcttcgtt	tcctgcaggt	2820	
ttttgttctg	tgcaagttgg	ttaagaatac	tgggcaat	catgtttctt	caacactaca	2880	40

【表 1 1 - 8 1】

tatgcgtata	tataccaatc	taagtctgtg	ctccttcctt	cgttcttcct	tctgttcgga	2940	
gattaccgaa	tcaaaaaaat	ttcaaagaaa	ccgaaatcaa	aaaaaagaat	aaaaaaaaaa	3000	
tgatgaattg	aattgaaaag	ctagcttata	gatgataagc	tgtcaaagat	gagaattaat	3060	
tccacggact	atagactata	ctagatactc	cgtctactgt	acgatacact	tccgctcagg	3120	
tccttgtcct	ttaacgaggc	cttaccactc	ttttgttact	ctattgatcc	agctcagcaa	3180	
aggcagtgtg	atctaagatt	ctatcttcgc	gatgtagtaa	aactagctag	accgagaaaag	3240	
agactagaaa	tgcaaaaggc	actctacaaa	tggtgccat	cattattatc	cgatgtgacg	3300	10
ctgcagcttc	tcaatgatat	tcgaatacgc	tttgaggaga	tacagcctaa	tatccgacaa	3360	
actgttttac	agattttacg	tcgtacttgt	taccatcat	tgaattttga	acatccgaac	3420	
ctgggagttt	tcctgaaac	agatagtata	tttgaacctg	tataataata	tatagtctag	3480	
cgctttacgg	aagacaatgt	atgtatttgc	gttctggag	aaactattgc	atctattgca	3540	
taggtaatct	tgcacgtcgc	atccccggtt	cattttctgc	gtttccatct	tgcacttcaa	3600	
tagcatatct	ttgttaacga	agcatctgtg	cttcattttg	tagaacaaaa	atgcaacgcg	3660	
agagcgctaa	tttttcaaac	aaagaatctg	agctgcattt	ttacagaaca	gaaatgcaac	3720	
gcaaaagcgc	tattttacca	acgaagaatc	tgtgcttcat	ttttgtaaaa	caaaaatgca	3780	
acgcgacgag	agcgctaatt	tttcaaacaa	agaatctgag	ctgcattttt	acagaacaga	3840	20
aatgcaacgc	gagagcgcta	ttttaccaac	aaagaatcta	tacttctttt	ttgttctaca	3900	
aaaatgcata	ccgagagcgc	tatttttcta	acaaagcata	ttagattact	ttttttctoc	3960	
tttgtgcgct	ctataatgca	gtctcttgat	aactttttgc	actgtaggtc	cgttaaggtt	4020	
agaagaaggc	tactttggtg	tctattttct	cttcataaaa	aaaagcctga	ctccacttcc	4080	
cgcttttact	gattactagc	gaagctgcgg	gtgcattttt	tcaagataaa	ggcatccccg	4140	
attatattct	ataccgatgt	ggattgcgca	tactttgtga	acagaaagtg	atagcgttga	4200	
tgattcttca	ttggtcagaa	aattatgaac	ggtttcttct	atthttgtctc	tatatactac	4260	
gtataggaaa	tgtttacatt	ttcgtattgt	tttcgattca	ctctatgaat	agttcttact	4320	
acaatttttt	tgtctaaaga	gtaatactag	agataaacat	aaaaaatgta	gaggctcaggt	4380	30
ttagatgcaa	gttcaaggag	cgaaagggtg	atgggtaggt	tatataggga	tatagcacag	4440	
agatatatag	caaagagata	cttttgagca	atgtttgtgg	aagcgtatt	cgcaatggga	4500	
agctccaccc	cggttgataa	tcagaaaagc	cccaaaaaca	ggaagattgt	ataagcaaat	4560	
atthaaattg	taaacgttaa	tattttgtta	aaattcgcgt	taaatttttg	ttaaatcagc	4620	
tcatttttta	acgaatagcc	cgaaatcggc	aaaatccctt	ataaatcaaa	agaatagacc	4680	
gagatagggt	tgagtgttgt	tccagtttcc	aacaagagtc	cactattaaa	gaacgtggac	4740	
tccaacgtca	aagggcgaaa	aaggtctat	cagggcgatg	gccactacg	tgaaccatca	4800	
ccctaataca	gttttttggg	gtcgaggtgc	cgtaaagcag	taaatcggaa	gggtaaacgg	4860	
atgcccccat	ttagagcttg	acggggaaaag	ccggcgaaacg	tggcgagaaa	ggaagggaag	4920	40

【表 1 1 - 8 2】

aaagcgaaag gagcgggggc tagggcgggtg ggaagtgtag gggtcacgct gggcgtaacc	4980	
accacaccog ccgcgcttaa tggggcgcta cagggcagga atactctgaa taaaacaact	5040	
tatataataa aaatgc	5056	
<210> 41		
<211> 1703		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Cassette with green fluorescent protein coding sequence, regulatory sequences and integration sequences		
<220>		
<221> LV3		
<222> (1)..(40)		
<220>		
<221> Tdh3p		
<222> (41)..(693)		20
<220>		
<221> S65T-GFP		
<222> (700)..(1413)		
<220>		
<221> CYC1 Terminator		
<222> (1414)..(1663)		
<220>		
<221> LV5		
<222> (1664)..(1703)		30
<400> 41		
aggaataactc tgaataaaac aacttatata ataaaaatgc tcgagtttat cattatcaat	60	
actgccatit caaagaatac gtaaataatt aatagtagtg attttcctaa ctttatttag	120	
tcaaaaaatt agccttttaa ttctgctgta acccgtacat gcccaaaata gggggcgggt	180	
tacacagaat atataacatc gtaggtgtct gggatgaacag tttattcctg gcatccacta	240	
aatataatgg agcccgttt ttaagctggc atccagaaaa aaaaagaatc ccagcaccaa	300	
aatattgttt tottcaccaa ccatcagttc ataggtccat tctcttagcg caactacaga	360	
gaacaggggc acaaacaggc aaaaaacggg cacaacctca atggagtgat gcaacctgcc	420	
tggagtaaat gatgacacaa ggcaattgac ccacgcatgt atctatctca ttttcttaca	480	40

【表 1 1 - 8 3】

ccttctatta ccttctgctc tctctgattt ggaaaaagct gaaaaaaaaag gttgaaacca 540
 gttccctgaa attattcccc tacttgacta ataagtatat aaagacggta ggtattgatt 600
 gtaattctgt aaatctatctt cttaaacttc ttaaattcta cttttatagt tagtcttttt 660
 tttagtttta aaacaccaag aacttagttt cgaaaaaca tgagtaaagg agaagaactt 720
 ttcactggag ttgtcccaat tcttgttgaa ttagatgggtg atgttaatgg gcacaaattt 780
 tctgtcagtg gagaggggtga aggtgatgca acatacggaa aacttaccct taaatttatt 840
 tgcactactg gaaaactacc tgttccatgg ccaacacttg tccactactt cacttatggt 900
 gttcaatgca tttcaagata cccagatcat atgaaagagc atgacttttt caagagtgcc 960
 atgcccgaag gttatgtaca ggaaagaact atatttttca aagatgacgg gaactacaag 1020
 acacgtgctg aagtcaagtt tgaaggtgat acccttggtta atagaatcga gttaaaagg 1080
 attgatttta aagaagatgg aacattctt ggacacaaat tggaaataca ctataactca 1140
 cacaatgtat acatcatggc agacaaaca aagaatggaa tcaaagttaa cttcaaaatt 1200
 agacacaaca ttgaagatgg aagcgttcaa ctagcagacc attatcaaca aaatactcca 1260
 attggcgatg gocctgtcct tttaccagac aaccattacc tgtccacaca atctgccctt 1320
 tcgaaagatc ccaacgaaaa gagagaccac atggctcttc ttgagtttgt aacagctgct 1380
 gggattacac atggcatgga tgaactatac aaatcatgta attagttatg tcacgcttac 1440
 attcacgccc tctcccaca tccgctctaa ccgaaaagga aggagttaga caacctgaag 1500
 tctaggtccc tatttatttt ttttaatagt tatgttagta ttaagaacgt tatttatatt 1560
 tcaaattttt cttttttttc tgtacaaacg cgtgtacgca tgtaacatta tactgaaac 1620
 cttgcttgag aaggttttgg gacgctcgaa ggctttaatt tgccctcttt atattacatc 1680
 aaaataagaa aataattata aca 1703

<210> 42

<211> 2942

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cassette with Cannabis sativa prenyltransferase-green fluorescent protein fusion protein coding sequence, regulatory sequences and integration sequences

<220>

<221> LV3

<222> (1)..(40)

<220>

<221> TDH3

10

20

30

40

【表 1 1 - 8 4】

<222>	(41)..(692)						
<220>							
<221>	CBGA Synthase						
<222>	(702)..(1892)						
<220>							
<221>	GFP_linker						
<222>	(1893)..(1928)		10				
<220>							
<221>	GFP						
<222>	(1929)..(2645)						
<220>							
<221>	LV5						
<222>	(2903)..(2942)						
<400>	42						
aggaatactc	tgaataaaac	aacttatata	ataaaaatgc	tcgagtttat	cattatcaat	60	
actgccat	caaagaatac	gtaaataatt	aatagtagtg	attttcctaa	ctttat	120	20
tcaaaaaatt	agccttttaa	ttctgctgta	accogtacat	gcccaaaata	ggggcggggt	180	
tacacagaat	atataacatc	gtaggtgtct	gggtgaacag	tttattcctg	gcatccacta	240	
aatataatgg	agcccgcctt	ttaagctggc	atccagaaaa	aaaaagaatc	ccagcaccaa	300	
aatattg	tcttcaccaa	ccatcagttc	ataggtccat	tctcttagcg	caactacaga	360	
gaacaggggc	acaacaggc	aaaaaacggg	cacaacctca	atggagtgat	gcaacctgcc	420	
tggagtaa	gatgacacaa	ggcaattgac	ccacgcatgt	atctatctca	ttttcttaca	480	
ccttctatta	ccttctgctc	tctctgattt	ggaaaaagct	gaaaaaaaag	gttgaaacca	540	
gttccctgaa	attattcccc	tacttgacta	ataagtatat	aaagacggta	ggtattgatt	600	
gtaattctgt	aatctat	cttaaacttc	ttaaattcta	cttttatagt	tagtctttt	660	30
tttagt	tttaaaccaag	aacttagttt	cgaaaacaat	gatgggtt	tcttctgttt	720	
gtactttctc	tttccaaacc	aactatcaca	ctttggtgaa	tccacataac	aacaacccaa	780	
agaacttctt	ggtatgttac	agacatccaa	agaccccaat	caagtactct	tacaacaact	840	
tcccatctaa	gcaactgtct	accaagtctt	tccacttgca	aaataagtgt	tctgaatctt	900	
tgtctattgc	taagaattcc	attagagctg	ctaccactaa	ccaaccgaa	ccaccagaat	960	
ctgacaaoca	ctccgtcgcc	accaagatct	tgaacttcgg	taaggcttgt	tggaagttgc	1020	
aaagaccata	caccatcatt	gccttcacct	cctgtgctcg	tggtttgttt	ggtaaggaat	1080	
tgttgacataa	caccaacttg	atctottgg	ctttaatg	caaggctttt	ttttcttgg	1140	
tcgcca	tctgtattg	ccctttacca	ctactattaa	tcaaatctac	gacttacata	1200	40

【表 1 1 - 8 5】

ttgaccgatat	caataagcca	gatttgccat	tggcctctgg	tgaaatttcc	gtcaacaccg	1260
cctggattat	gtctattatc	gttgccctgt	toggtttaat	tattactatt	aagatgaagg	1320
gtgggccatt	atacatcttc	ggttactggt	toggatctt	cggtggtatc	gtctactcgg	1380
ttccaccttt	cagatggaag	caaaaaccat	ccaccgcttt	cttggtgaac	ttottagccc	1440
acatcattac	taactttacc	ttctactatg	cctctagagc	cgctttaggt	ttaccatttg	1500
aattgcgctc	atctttcact	ttcttggtgg	ctttcatgaa	gtctatgggt	tccgccttgg	1560
ctttaattaa	ggatgcctct	gatgttgagg	gtgatactaa	gttcgggtatt	tctaccttag	1620
cttccaaata	cggttccaga	aacttgactt	tgttctgttc	cggatttggt	ttattgtctt	1680
acgtcgctgc	tatcttggtc	ggtatcattt	ggcctcaagc	ttcaactct	aacgttatgt	1740
tgttatocca	tgctatcttg	gctttctggg	tgatcttgca	aaccagagac	ttcgctttga	1800
ctaactacga	tccagaagct	ggtagaagat	tctacgaatt	tatgtggaaa	ttatattacg	1860
ccgaatactt	ggtttacggt	ttcatcggct	gagggcgcgc	tggctccgct	gctggttctg	1920
gogaattcat	gagtaaagga	gaagaacttt	tcactggagt	tgtcccaatt	cttggtgaat	1980
tagatggtga	tgtaaatggg	cacaaaat	ctgtcagtg	agagggtgaa	ggtgatgcaa	2040
catacgaaa	acttaccctt	aaatttattt	gcactactgg	aaaactacct	gttccatggc	2100
caacacttgt	cactactttc	acttatggtg	ttcaatgcat	ttcaagatac	ccagatcata	2160
tgaaacggca	tgactttttc	aagagtgcc	tgcccgaagg	ttatgtacag	gaaagaacta	2220
tatttttcaa	agatgacggg	aactacaaga	cacgtgctga	agtcaagttt	gaaggtgata	2280
cccttgttaa	tagaatcgag	ttaaaaggta	ttgattttaa	agaagatgga	aacattcttg	2340
gacacaaatt	ggaatacaac	tataactcac	acaatgtata	catcatggca	gacaaacaaa	2400
agaatggaat	caaagttaac	ttcaaaaatta	gacacaacat	tgaagatgga	agcgttcaac	2460
tagcagacca	ttatcaacaa	aatactcaa	ttggcgatgg	ccctgtcctt	ttaccagaca	2520
accattacct	gtccacacaa	tctgcccttt	cgaaagatcc	caacgaaaag	agagaccaca	2580
tggctccttct	tgagtttgta	acagctgctg	ggattacaca	tggcatggat	gaactataca	2640
aataaggcgc	ctaatcatgt	aattagttat	gtcacgctta	cattcacgcc	ctccccccac	2700
atccgctcta	accgaaaagg	aaggagttag	acaacctgaa	gtctaggtcc	ctatattattt	2760
ttttatagtt	atgtagtat	taagaacggt	atztatattt	caaatttttc	tttttttctt	2820
gtacaaaogc	gtgtacgcat	gtaacattat	actgaaaacc	ttgcttgaga	aggttttggg	2880
acgctogaag	gctttaattt	gccctcttta	tattacatca	aaataagaaa	ataattataa	2940
ca						2942

<210> 43

<211> 2678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

【表 1 1 - 8 6】

<220>			
<223>	Cassette with AltPT-green fluorescent protein fusion protein coding sequence, regulatory sequences and integration sequences		
<220>			
<221>	LV3		
<222>	(1)..(40)		
<220>			10
<221>	TDH3		
<222>	(41)..(692)		
<220>			
<221>	Alt PT		
<222>	(702)..(1628)		
<220>			
<221>	GFP_linker		
<222>	(1629)..(1664)		
<220>			20
<221>	GFP		
<222>	(1665)..(2381)		
<220>			
<221>	LV5		
<222>	(2639)..(2678)		
<400>	43		
aggaatactc tgaataaaac aacttatata ataaaaatgc tcgagtttat cattatcaat		60	
actgccattht caaagaatac gtaaataatt aatagtagtg attttcctaa ctttatttag		120	
tcaaaaaatt agccttttaa ttctgctgta acccgtacat gcccaaaata gggggcgggt		180	30
tacacagaat atataacatc gtaggtgtct gggatgaacag tttattcctg gcatccaacta		240	
aatataatgg agcccgcttt ttaagctggc atccagaaaa aaaagaatc ccagcaccaa		300	
aatattgtht tcttcaccaa ccatcagttc ataggtccat tctcttagcg caactacaga		360	
gaacaggggc acaaacaggc aaaaaacggg cacaacctca atggagtgat gcaacctgcc		420	
tggagtaaht gatgacacaa ggcaattgac ccacgcatgt atctatctca ttttcttaca		480	
ccttctatta ccttctgctc tctctgattt ggaaaaagct gaaaaaaaag gttgaaacca		540	
gttccctgaa attattcccc tacttgacta ataagtatat aaagacggta ggtattgatt		600	
gtaattctgt aatctattht cttaaacttc ttaaattcta cttttatagt tagtcttht		660	
tttagthttha aaacaccaag aacttagtht cgaaaacaat gatgtctgaa gccgctgatg		720	40

【表 1 1 - 8 7】

tcgaaagagt	ttacgccgct	atggaagagg	ccgctggttt	gttgggtggt	gcctgtgcta	780
gagacaagat	ttaccocattg	ttatccacct	tccaagatac	tttggttgaa	ggtggttctg	840
ttgtcgtttt	ctctatggcc	tccggtagac	actccaccga	attggacttc	tctattttctg	900
ttccaacttc	tcatgggtgat	ccatacgcca	ctgtcgttga	aaagggttta	tttctgcta	960
ctggtcaccc	agttgacgat	ttgttagctg	acactcaaaa	gcacttacct	gtttctatgt	1020
tcgctattga	cggtgaagtt	accggtgggt	tcaaaaagac	ttacgccttc	ttccaactg	1080
acaatatgcc	agggtgttgc	gaattgtctg	ctatcccatc	catgccacca	gccgttgccg	1140
agaatgctga	attgttcgct	cgttatgggt	tggacaaggt	ccaaatgacc	tccatggact	1200
acaagaaaag	acaagtcaac	ttgtatttct	ccgaattgtc	tgctcaaact	ttagaagccg	1260
aatctgtttt	ggctttgggt	agagaattag	gtttgcacgt	tccaaacgaa	ttgggtttga	1320
agttttgtaa	acgttctttc	tctgtttatc	caactttgaa	ctgggaaacc	ggtaaaaatcg	1380
acagattgtg	cttcgctgtc	atctctaacg	acccaacctt	ggtcccatcc	tccgatgaag	1440
gtgatatcga	aaagttccac	aactacgcca	ctaaggctcc	ttacgcctac	gtcggtgaga	1500
aacgtacott	ggtctatggt	ttgactttat	ccccaaagga	ggaatactac	aagttgggtg	1560
cttactacca	cattaccgac	gtccaaagag	gtttgttaaa	ggccttcgac	tctttagaag	1620
acggctgagg	cgccgctggc	tccgctgctg	gttctggcga	attcatgagt	aaaggagaag	1680
aacttttcac	tggagttgtc	ccaattcttg	ttgaattaga	tgggtgatgtt	aatgggcaca	1740
aattttctgt	cagtggagag	ggtgaaggtg	atgcaacata	cggaaaactt	acccttaaat	1800
ttattttgcac	tactggaaaa	ctacctgttc	catggccaac	acttgtcact	actttcactt	1860
atggtgttca	atgcatttca	agatacccag	atcatatgaa	acggcatgac	tttttcaaga	1920
gtgccatgcc	cgaaggttat	gtacaggaaa	gaactatatt	tttcaaagat	gacgggaact	1980
acaagacacg	tgctgaagtc	aagtttgaag	gtgataccct	tgттаataga	atcgagttaa	2040
aaggatttga	ttttaaagaa	gatggaaca	ttcttggaca	caaattgaa	tacaactata	2100
actcacacaa	tgtatacatc	atggcagaca	aacaaaagaa	tggaatcaaa	gttaacttca	2160
aaattagaca	caacattgaa	gatggaagcg	ttcaactagc	agaccattat	caacaaaata	2220
ctccaattgg	cgatggccct	gtccttttac	cagacaacca	ttacctgtcc	acacaatctg	2280
ccctttcgaa	agatcccaac	gaaaagagag	accacatggt	ccttcttgag	tttghtaacag	2340
ctgctgggat	tacacatggc	atggatgaac	tatacaata	aggcgcctaa	tcatgtaatt	2400
agttatgtoa	cgcttacatt	cacgccctcc	ccccacatcc	gctctaaccg	aaaaggaagg	2460
agttagacaa	cctgaagtct	aggtccctat	ttattttttt	atagttatgt	tagtattaag	2520
aacgttatth	atattttcaa	tttttctttt	ttttctgtac	aaacgcgtgt	acgcatgtaa	2580
cattatactg	aaaaccttgc	ttgagaaggt	tttgggacgc	tcgaaggctt	taatttgccc	2640
tctttatatt	acatcaaaat	aagaaaataa	ttataaca			2678

10

20

30

40

【表 1 1 - 8 8】

<211>	2399		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Cassette with AltPT from Streptomyces sp CL190 with coding sequence, regulatory sequences and integration sequences		
<220>			10
<221>	LV3		
<222>	(1)..(40)		
<220>			
<221>	PMA1p		
<222>	(47)..(946)		
<220>			
<221>	L1		
<222>	(947)..(986)		
<220>			20
<221>	AltPT		
<222>	(987)..(1913)		
<220>			
<221>	Eno2t		
<222>	(1954)..(2353)		
<220>			
<221>	LV5		
<222>	(2360)..(2399)		
<400>	44		30
	aggaataactc tgaataaaac aacttatata ataaaaatgc gtatccacag gcattgctgg	60	
	gatcaccocat acatcactct gttttgcctg accttttccg gtaatttgaa aacaaaccog	120	
	gtctcgaagc ggagatccgg cgataattac cgcagaaata aaccataca cgagacgtag	180	
	aaccagcogc acatggccgg agaaactcct gogagaatth cgtaaactcg cgcgcattgc	240	
	atctgtatth cctaattgagg cacttccagg cctcgagacc tetgacatgc ttttgacagg	300	
	aatagacatt ttcagaatgt tatccatatg cctttcgggt ttttttcctt ccttttccat	360	
	catgaaaaat ctctcgagac cgtttatoca ttgctttttt gttgtctttt tccctcgttc	420	
	acagaaagtc tgaagaagct atagtagaac tatgagctth ttttgthctt gttttcctth	480	
	tttttttttt tacctctgtg gaaattgtha ctctcacact ctttagttcg tttgthttht	540	40

【表 1 1 - 8 9】

ttgtttattc caattatgac cggtgacgaa acgtggtoga tgggtgggtac cgcttatgct	600
cccctccatt agtttcgatt atataaaaag gccaaatatt gtattatfff caaatgtcct	660
atcattatcg tctaacatct aatttctctt aaatfffftc tctttctttc ctataacacc	720
aatagtghaa atctfffftt cttctatata tacaaaaact ttttttttct atcaacctcg	780
ttgataaatt ttttctttaa caatcgttaa taattaatta attggaaaat aaccatffff	840
tctctctfff atacacacat tcaaaagaaa gaaaaaaaat ataccccagc tagttaaaga	900
aatcattga aaagaataag aagataagaa agatttaatt atcaaactag aaaatftatt	960
ataaaaggaa gagaaataat taaacaatgt ctgaagccgc tgatgtcgaa agagtttacg	1020
ccgctatgga agaggccgct ggtttgttgg gtgttgccctg tgctagagac aagatftacc	1080
cattgttatc caccttccaa gatactttgg ttgaagggtg ttctgttgtc gtttctcta	1140
tggcctccgg tagacactcc accgaattgg acttctctat ttctgttcca acttctcatg	1200
gtgatccata cgccactgtc gttgaaaagg gtttatfttc tgctactggt caccagttg	1260
acgatttggt agctgacact caaaagcact tacctgtttc tatgttcgct attgacggtg	1320
aagttaccgg tggtttcaaa aagacttacg cttcttccc aactgacaat atgccagggtg	1380
ttgtggaatt gtctgctatc ccatccatgc caccagccgt tgccgagaat gctgaattgt	1440
tcgctcgtha tggtttgac aaggttcaaa tgacctocat ggactacaag aaaagacaag	1500
tcaacttgta tttctccgaa ttgtctgctc aaactttaga agccgaatct gttttggctt	1560
tggttagaga attaggtttg cacgttccaa acgaattggg tttgaagttt tgtaaactgt	1620
ctttctctgt ttatccaact ttgaactggg aaaccggtaa aatcgacaga ttgtgcttgc	1680
ctgtcatctc taacgaccca accttggtcc catcctccga tgaaggatgat atcgaaaagt	1740
tccacaacta cgccactaag gctccttacg cttacgtcgg tgagaaactg accttggtct	1800
atggtttgac tttatcccca aaggaggaat actacaagtt ggggtgcttac taccacatta	1860
ccgactcca aagaggtttg ttaaaggcct tcgactcttt agaagacggc tgaagacata	1920
aaactgaaac aacaccaatt aataatagac tttagtgtt ttaactaaga attattagtc	1980
ttttctgctt atfttttcat catagttag aacactftat attaacgaat agtttatgaa	2040
tctatfttagg tttaaaaatt gatacagttt tataagttac tttttcaaag actcgtgctg	2100
tctattgcat aatgcactgg aaggggaaaa aaaaggtgca cacgctggc ttttcttga	2160
atftgcagtt tgaaaaataa ctacatggat gataagaaaa catggagtac agtcaactftg	2220
agaaccttca atcagctggt aacgtcttgc ttaattggat actcaaaaa gatggatagc	2280
atgaatcaca agatggaagg aaatgcgggc caccaccaca gtgatatgca tatgggat	2340
ggagatgata cctggatacc ctctttatat tacatcaaaa taagaaaata attataaca	2399
<210> 45	
<211> 5616	
<212> DNA	

10

20

30

40

【表 1 1 - 9 0】

<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cassette with Cannabis sativa OAS coding sequence, regulatory sequences and integration sequences	
<220>		
<221>	LV3	
<222>	(1)..(40)	10
<220>		
<221>	THD3p	
<222>	(41)..(693)	
<220>		
<221>	L1	
<222>	(694)..(733)	
<220>		
<221>	Hex1	
<222>	(734)..(2899)	20
<220>		
<221>	T3	
<222>	(2900)..(3303)	
<220>		
<221>	ADH1 terminator	
<222>	(3071)..(3263)	
<220>		
<221>	P5	
<222>	(3264)..(3837)	30
<220>		
<221>	LTP2	
<222>	(3264)..(3303)	
<220>		
<221>	Tef1p	
<222>	(3304)..(3797)	
<220>		
<221>	L3	
<222>	(3798)..(3837)	40

【表 1 1 - 9 1】

<220>							
<221>	OAS						
<222>	(3841)..(4995)						
<220>							
<221>	PRM9t						
<222>	(5039)..(5576)						
<220>							10
<221>	LV5						
<222>	(5577)..(5616)						
<400>	45						
aggaatactc	tgaataaaac	aacttatata	ataaaaatgc	tcgagtttat	cattatcaat	60	
actgccatth	caaagaatac	gtaaataaatt	aatagtagtg	atthtcctaa	ctthtatttag	120	
tcaaaaaaatt	agcctthtaa	ttctgctgta	accggtacat	gccccaaaata	gggggcgggt	180	
tacacagaat	atataacatc	gtaggtgtct	gggtgaacag	ttatttcctg	gcataccta	240	
aatataatgg	agcccgttht	ttaagctggc	atccagaaaa	aaaaagaatc	ccagcaccaa	300	
aatattgtht	tcttcaccaa	ccatcagttc	ataggtccat	tctcttagcg	caactacaga	360	20
gaacaggggc	acaacaggc	aaaaaacggg	cacaacctca	atggagtgat	gcaacctgcc	420	
tggagtaaat	gatgacacaa	ggcaattgac	ccacgcatgt	atctatctca	thttcttaca	480	
ccttctatta	ccttctgctc	tctctgattt	ggaaaaagct	gaaaaaaaaag	gttgaaacca	540	
gttccctgaa	attattcccc	tacttgacta	ataagtatat	aaagacggta	ggtattgatt	600	
gtaattctgt	aaatctatth	cttaaaacttc	ttaaattcta	ctthtatagt	tagtctthtt	660	
thtagththt	aaacaccaag	aacttagtht	cgactagaaa	atthattata	aaaggaagag	720	
aaataattaa	acaatgggta	aaaactataa	gtctthtagac	tccgttgctg	cctccgactt	780	
tattgctthg	ggtatcacct	ccgaagttgc	tgaacttht	cacggtagat	tagctgagat	840	
tgtthgtaac	tacggtgccg	ccactccaca	aacttgatt	aatatcgcta	accatathth	900	30
gtctccagac	ttaccattct	ccttgcatca	aatgtththt	tacggttgth	ataaagattt	960	
tgggtccagct	cctccagctt	ggatcccaga	tcctgaaaaa	gttaagtcta	ctaacttagg	1020	
tgctthgtta	gaaaaaagag	gtaaagaatt	cttggtgtth	aagtataaag	atccaatctc	1080	
ttccttctct	caththtcaag	aattctccgt	tagaaacca	gaagthtatt	ggagaaccgt	1140	
thtgatggac	gaaatgaaga	tctccttctc	taaggatcct	gaatgtatth	tgagacgtga	1200	
cgatatcaac	aatccaggtg	gttctgaaatg	gttaccaggt	ggttattthga	actctgctaa	1260	
aaattgthth	aacgtcaatt	ccaacaaaaa	attgaacgac	accatgattg	ththggagaga	1320	
cgaaggtaac	gatgacttac	cattaaacia	gttgaccttg	gaccaattga	gaaagcgtgt	1380	
ctggttggtc	ggttacgcct	tggaggaaat	gggtthggaa	aaaggttgth	ccatcgctat	1440	40

【表 1 1 - 9 2】

cgatatgcca	atgcacgtcg	acgccgtcgt	tatctatctg	gccatcgttt	tagctggtta	1500
cgctcgtcgc	tccatcgctg	actctttctc	cgctccagaa	atctccacta	gattgagatt	1560
atccaaggcc	aaggctatct	tcactcaaga	tcacattatt	agaggtaaga	agcgtattcc	1620
attgtactcc	agagtcgtcg	aagccaagtc	tcctatggcc	attgttatcc	catgttctgg	1680
ttctaacatt	ggtgctgaat	tgagagatgg	tgacatttcc	tgggactatt	tcttgaaag	1740
agctaaggaa	tttaagaact	gcgaatttac	cgccagagaa	caacctgttg	atgcctacac	1800
taacatcttg	ttctcttctg	gtacaactgg	tgagccaaag	gctatccctt	ggactcaagc	1860
taccccatta	aaggccgccg	ctgatggttg	gtcccacttg	gacattcgta	agggtgacgt	1920
catcgtctgg	ccaactaact	tgggttggat	gatgggtcca	tggttagttt	acgcctcttt	1980
gttaaaccgg	gcttccattg	ccttgtacaa	cggttctcca	ttggtttctg	gtttcgctaa	2040
gtttgtccaa	gacgccaagg	ttaccatggt	aggtgttgtt	ccatctatcg	tcagatcttg	2100
gaagtctact	aactgtgtct	ctggttaoga	ttggtctact	atcagatgct	tctcttcctc	2160
tggtgaagcc	tctaacgttg	atgaatattt	gtggttgatg	ggtcgtgcca	actacaagcc	2220
agttatcgaa	atgtgtgggt	gtacagagat	cggtgtgtgt	ttttccgctg	gttccttttt	2280
gcaagctcaa	tctttgtctt	ctttctcttc	tcaatgtatg	ggttgtactt	tgtatatttt	2340
ggataagaac	ggttacccaa	tgccaaagaa	caaaccaggt	atcgggtgaat	tagctttggg	2400
tccagttatg	ttcgggtgctt	ccaagacctt	gttgaaccgg	aatcaccatg	atgtctatct	2460
caaaggatg	ccaactttaa	acggtgaagt	cttgagacgt	cacggtgaca	tctttgaatt	2520
gacttctaac	ggttactacc	atgctcacgg	tagagctgat	gatactatga	acattggtgg	2580
tattaagatt	tcttctatcg	aatcgaaaag	agtttghtaat	gaagttgacg	acagagtctt	2640
tgaaaccact	gctattgggt	tcccaccatt	gggtgggtgg	ccagaacaat	tagtcatttt	2700
cttctgtttg	aaggattcta	acgacactac	catogactta	aaccaattga	gattgtcttt	2760
caacttgggt	ttgcaaaaaga	agttgaacc	attattttaaa	gtcactagag	ttgttccatt	2820
gtcttctttg	ccaagaaccg	ccaccaacaa	gattatgaga	agagttttga	gacaacaatt	2880
ttctcatttc	gaaggctgaa	gacataaaaac	tgaaacaaca	ccaattaata	atagactttt	2940
ggacttcttc	gccagagggt	tggtcaagtc	tccaatcaag	gttgtcggct	tgtctacctt	3000
gccagaaatt	tacgaaaaga	tggaagagg	tcaaatcgtt	ggtagatacg	ttgttgacac	3060
ttctaaataa	gcgaatttct	tatgatttat	gatttttatt	attaaataag	ttataaaaaa	3120
aataagtgta	tacaaatttt	aaagtgactc	ttaggtttta	aaacgaaaat	tcttattctt	3180
gagtaactct	ttcctgtagg	tcaggttgct	ttctcaggta	tagcatgagg	tcgctcttat	3240
tgaccacacc	tctaccggca	tgccttaaat	aacatactca	tcactaaaca	ttcttaacaa	3300
tcaaagcaac	aggcgcgttg	gacttttaat	ttttagggac	cgcgatcctt	tacatcacac	3360
ccaatcccc	acaagtgatc	ccccacacac	catagcttca	aaatgtttct	actccttttt	3420
tactcttcca	gattttctcg	gactccgcgc	atcgccgtac	cacttcaaaa	cacccaagca	3480

10

20

30

40

【表 1 1 - 9 3】

cagcatacta	aatttcccct	ctttcttct	ctaggggtgc	gttaattacc	cgtactaaag	3540
gtttggaaaa	gaaaaaagag	accgcctcgt	ttctttttct	tcgtcgaaaa	aggcaataaa	3600
aatttttatc	acgtttcttt	ttcttgaaaa	tttttttttt	tgattttttt	ctctttcgat	3660
gacctcccat	tgatatttaa	gttaataaac	ggctttcaat	ttctcaagtt	tcagtttcat	3720
ttttcttggt	ctattacaac	tttttttact	tcttgctcat	tagaaagaaa	gcatagcaat	3780
ctaactaag	ttttaataca	tctaccagtc	aacagccaac	aattaactaa	ttaaacaatg	3840
aaccttga	gagctgaag	tccagcttcc	gttttgcta	tcggtacagc	taaccctgaa	3900
aacatcttgt	tgcaagatga	attcccagac	tattacttca	gagttacca	gtctgaacat	3960
atgactcaat	tgaaggaaaa	gtttagaaag	atgtgtgata	agtctatgat	cagaaagcgt	4020
aattgttttt	tgaacgaaga	acatttaaaa	caaaatccaa	gattggttga	gcacgaaatg	4080
caaactttgg	atgctagaca	agatatgtta	gtcgtcgaag	tcccaaagtt	gggtaaggat	4140
gcttggtgta	aggctattaa	ggagtgggt	caaccaaagt	ccaaaatcac	ccacttgatt	4200
ttcacttccg	cttctactac	cgacatgcca	ggtgctgatt	accactgtgc	taagttggtg	4260
ggtttatccc	cttctgttaa	aagagttatg	atgtaccaat	tgggttgcta	cggtgggtgt	4320
actgttttga	gaattgcaa	ggacatcgt	gagaataaca	agggtgctag	agttttggcc	4380
gtctgttgtg	acatcatggc	ttgtttatc	agaggtccat	ctgaatccga	cttggaaattg	4440
ttagtcggtc	aagccatctt	tggtgatgg	gctgccgcg	ttattgttgg	tgctgaacca	4500
gatgaatccg	tcggtgaaag	accaatcttt	gagttggtct	ctactggtca	aaccattttg	4560
ccaaactccg	aaggtactat	tggtggtcac	atccgtgaag	ctggtttgat	ttttgattta	4620
cacaaggatg	tccaatggt	gatctctaac	aacatcgaga	agtgtttaat	tgaagccttc	4680
acccaattg	gtatttccga	ctggaactct	atcttctgga	ttactcatcc	agggtgtaag	4740
gctattttag	ataaggttga	agaaaagttg	cacttgaagt	ctgataaatt	cgttgactct	4800
agacacgttt	tgtctgaaca	tgtaaatatg	tcttcttcca	ctgttttgtt	cgttatggat	4860
gaattgagaa	agagatcttt	ggaagaaggt	aagtccacta	ctggtgacgg	tttcgaaatgg	4920
ggtgttttgt	tcggtttcgg	tccaggtttg	actgttgaaa	gagtcgttgt	ccgttctggt	4980
ccaatcaagt	acggctaata	ataattaaat	actatcttca	aaattctact	taaaaataac	5040
agaagacggg	agacactagc	acacaacttt	accaggcaag	gtatttgacg	ctagcatgtg	5100
tccaattcag	tgatctttat	gattttttgt	agtaggat	aatatatac	agcgtccaa	5160
atagtgcgg	tgccccaaaa	acaccacgga	acctcatctg	ttctcgtact	ttgttggtgac	5220
aaagtagctc	actgccttat	tatcacattt	tcattatgca	acgcttcgga	aaatacgatg	5280
ttgaaaatgc	ctctagagat	gaaaaacaat	cgtaaaaggg	tctgctgtaa	ttgaaacatt	5340
tgatcagtat	gcagtggcac	agaaacaacc	aggaatacta	tagtcatagg	caatacaagg	5400
tatatattgg	ctatgcagac	ccctccagaa	agtaccgacg	tcaagttaga	tacacttaac	5460
gaacctagtg	cacatttaat	tgagaaaaat	gtggctcttc	ctaaggacat	attccgttcg	5520

10

20

30

40

【表 1 1 - 9 4】

tacttgagtt attggatcta tgaaatcgct cgctatacac cagtcatgat tttgtccctc	5580
tttatattac atcaaaataa gaaaataatt ataaca	5616
<210> 46	
<211> 10584	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	10
<223> Cassette with Dictyostelium discoideum DiPKS coding sequence, regulatory sequences and integration sequences	
<220>	
<221> LV3	
<222> (1)..(40)	
<220>	
<221> S. cerevisiae GAL1 promoter	
<222> (41)..(482)	
<220>	20
<221> L1	
<222> (483)..(522)	
<220>	
<221> DiPKS	
<222> (523)..(9966)	
<220>	
<221> Motif 1	
<222> (5050)..(5076)	
<220>	30
<221> C-methyltransferase domain	
<222> (5050)..(5412)	
<220>	
<221> Motif 2	
<222> (5309)..(5331)	
<220>	
<221> Motif 3	
<222> (5389)..(5421)	
<220>	40

【表 1 1 - 9 5】

<221>	L2		
<222>	(9967)..(10006)		
<220>			
<221>	PRM9t		
<222>	(10007)..(10544)		
<220>			
<221>	LV5		10
<222>	(10545)..(10584)		
<400>	46		
agg	aataactc tgaataaaac aacttatata ataaaaatgc cggattagaa gccgccgagc	60	
ggg	tgacagc cctccgaagg aagactctcc tccgtgcgtc ctcgtcttca ccggtcgcgt	120	
tcct	gaaacg cagatgtgcc tcgcgccgca ctgctccgaa caataaagat tctacaatac	180	
tagc	ttttat ggttatgaag aggaaaaatt ggcagtaacc tggccccaca aaccttcaaa	240	
tga	acgaatc aaattaacaa ccataggatg ataatgcat tagtttttta gccttatttc	300	
tgg	ggttaatt aatcagcgaa gcgatgattt ttgatctatt aacagatata taaatgcaaa	360	
aact	gcataa ccactttaac taatactttc aacattttcg gtttgattta cttcttattc	420	20
aat	gtaata aaagtatcaa caaaaaattg ttaatatacc tctatacttt aacgtcaagg	480	
agc	tagaaaaa tttattataa aaggaagaga aataattaa caatgaacaa gaactccaaa	540	
atcc	agtcctc caaactcttc tgatgttgct gttattggtg ttggttttag attcccaggt	600	
aact	cctaag acccagaatc tttgtggaac aacttggttg atggtttcga tgctattacc	660	
caag	tcccaa aagaaagatg ggctacttct tttagagaga tgggtttgat caagaacaag	720	
ttcg	gtggtt tcttgaagga ttctgaatgg aagaatttcg accctttggt ctttggtatc	780	
ggt	ccaaaag aagctccatt cattgatcca caacaaaggt tgttgttgtc catcgtttg	840	
gaat	cttttg aagatgctta catcagacca gatgaattga gaggttctaa cactgggtgtt	900	
ttca	tcggtg tttctaacia cgattacacc aagttgggtt tccaagacia ctactctatt	960	30
tctc	caataca ctatgaccgg ctctaactct tcattgaact ccaacagaat ttctactgc	1020	
ttcg	attttta gaggtccatc cactactggt gataccgctt gttcttcttc cttggtttct	1080	
gta	atttttg gtgtccaatc catccaaatg ggtgaatgta agattgctat ttgcgggtggt	1140	
gta	acgctt tgtttgatcc atctacatct gttgcctttt ccaagttggg tgttttgtct	1200	
gaaa	atggca gatgcaactc ttttagtgat caagcctctg gttacgttag atctgaaggt	1260	
gct	ggtggt ttgtttgaa gtctttggaa caagctaagt tggatggtga tagaatctac	1320	
gg	gtttatca aggggtgttc ctctaataa gatgggtgctt ctaatggtga caagaactct	1380	
tt	gactactc catcttgta agcccaatcc attaacattt ctaaggctat ggaaaaggcc	1440	
tc	cttgctc catctgatat ctattacatt gaagcccatg gtactggtac tccagttggt	1500	40

【表 1 1 - 9 6】

gatccaattg aagttaaggc cttgtccaag atcttctcca actctaaca caaccagttg	1560
aacaacttct ctaccgatgg taatgataac gatgatgatg atgacgataa cacctctcca	1620
gaaccattat tgattggctc attcaagtcc aacatcggtc atttggaatc tgctgctggg	1680
attgcttctt tgattaagtg ttgcttgatg ttgaagaaca ggatgttggg tccatccatt	1740
aactgctcta atttgaaccc atccattcca ttogatcagt acaacatctc cgttatcaga	1800
gaaatcagac aattcccaac cgataagttg gttaacatcg gtatcaattc tttcggtttc	1860
ggtggttota actgccattt gattattcaa gagtacaaca acaacttcaa gaacaactct	1920
accatctgca ataacaaca caacaacaat aacaacatcg actacttgat cccaatctcc	1980
tctaagacta agaagtcctt ggataagtac ttgattttga tcaagaccaa ctccaactac	2040
cacaaggata tttcttttoga tgacttcgtc aagttccaaa tcaagtctaa gcagtacaac	2100
ttgtccaaca gaatgactac cattgctaac gattggaact cttcattaa gggttctaac	2160
gaattccaca acttgatcga atctaaggat ggtgaagggtg gttcttcac tctaacaga	2220
ggatttgatt ccgccaatca aatcaacact actactacct ctaccatcaa cgatatogaa	2280
cctttggttg ttttcgtttt ctgtgggcaa ggtccacaat ggaatgggat gattaagacc	2340
ttgtacaact ccgagaacgt tttcaagaac accggtgatc atggtgacag catcttgtag	2400
aagtacttcg gttactccat tttgaacgtc ttgtctaaga tcgatgataa cgacgattcc	2460
atcaaccatc caatagttgc tcaaccatct ttgttcttgt tgcaaattgg tttgggtcgag	2520
ttgtttaagt actgggggat ctaccatct atctctgttg gtcattcttt cggtgaagtc	2580
tcttcttatt acttgtcggg tatcatctct ttggaaaccg cttgtaaaat cgtctacgtc	2640
agatcctcta atcagaacaa aactatgggt tccggtaaga tggtggttgt ttctatgggt	2700
tttaagcaat ggaacgatca attctctgct gaatgggtccg atattgaaat tgcttggttac	2760
aacgctccag attccatagt tgttactggg aacgaagaaa gattgaaaga attgtccatc	2820
aagttgtccg acgaatcaa tcaaattttc aacaccttct tgaggtcccc atgttctttt	2880
cattcttccc atcaagaagt catcaagggt tctatgttcg aagagttgtc taacttgcaa	2940
tctactgggt aaaccgaaat ccctttgttc tctactgtta ctggtagaca agttttgtct	3000
ggcatgttta ctgctcaaca catctacgat aatggttagag aaccagtctt gttccaaaag	3060
acgattgaat ccattacctc ctacatcaag tctcactacc catccaatca aaaggttatc	3120
tacgttgaaa ttgctccaca cccaaccttg ttttcattga tcaaaaagtc catcccatcc	3180
tccaacaaga attcctcttc tgttttgtgt ccattgaaca gaaaagaaaa ctccaacaac	3240
toctacaaga agttcgtttc tcagttgtac ttcaacgggtg ttaacggtga cttcaacttc	3300
cagttgaaact ccatttgoga taacgttaac aacgatcacc atttgaacaa cgtcaagcaa	3360
aactccttca aagagactac caattccttg ccaagatacc aatgggaaca agatgaatat	3420
tgggtccgaac cattgatctc cagaaagaat agattggaag gtccaactac ttcttgttg	3480
ggcatagaaa ttatctacag cttcccagtt ttccaatccg ttttgactt gcaatctgac	3540

10

20

30

40

【表 1 1 - 9 7】

aactacaaat	acttggtgga	ccacttggtt	aacggtaagc	cagtttttcc	aggtgctggt	3600	
tatttgata	tcatcatcga	attcttcgac	taccaaagc	agcagttgaa	ttcctctgat	3660	
tcctctaact	cctacatcat	caacgttgac	aagatccaat	tcttgaacct	aattcacttg	3720	
accgaaaaca	agttgcaaac	cttgcaatct	tctttcgaac	ctatcgttac	taagaagtct	3780	
gccttctctg	ttaacttctt	catcaaggat	accgtcgagg	atcaatctaa	ggttaagtct	3840	
atgtctgacg	aaacttgac	taacacttgt	aaggctacca	tttccttggg	acaacaacag	3900	
ccatctccat	cttctacttt	gactttgtct	aagaagcaag	acttgcagat	cttgagaaac	3960	10
agatgcgata	ttagcaagct	agacaagttt	gagttgtacg	acaagatctc	taagaatttg	4020	
ggcttgacgt	acaactcctt	gtttcaagtt	gttgatacca	tcgaaactgg	taaggattgc	4080	
tcttttgota	ctttgtcttt	gccagaagat	aotttgttca	ccaccatttt	gaacccatgc	4140	
ttgttggata	actgtttcca	tggtttggtg	acottgatca	acgaaaaggg	ttctttcggt	4200	
gtogagtcca	tttcttctgt	ttctatctac	ttggagaaca	tcggttcctt	caatcaaact	4260	
tctgttggta	acgtccagtt	ctacttgtac	accactattt	ctaaagccac	ctcctttagt	4320	
tctgaaggta	cttgtaagtt	gttcaccaag	gatggttctt	tgattttgtc	tatcggttaag	4380	
ttcatcatca	agtcaccaa	tccaaagtct	actaagacca	acgaaactat	cgaatctcca	4440	
ttggacgaaa	ccttctctat	tgaatggcaa	tctaaggatt	ctccaattcc	aacccccaaa	4500	20
caaatccaac	aacaatctcc	attgaaactct	aaccctcctt	tcattagatc	taccatcttg	4560	
aaggacatcc	agttcgaaca	atactgctcc	tccattatcc	acaagaatt	gatcaaccac	4620	
gaaaagtaca	agaaccagca	atccttcgat	atcaactcct	tggaaaacca	cttgaacgat	4680	
gaccaattga	tggaatcctt	gtccatctcc	aaagaatact	tgagattctt	caccaggatc	4740	
atctccatca	ttaagcaata	cccaaagatc	ttgaacgaaa	aagagctaaa	agaattgaaa	4800	
gaaatcatcg	aattgaagta	cccatccgaa	gttcagttgt	tggaattcga	agttatcgag	4860	
aagggtgtcca	tgattatccc	aaagttggtg	ttcgaaaacg	acaagcaatc	ttccatgacc	4920	
ttgttccaag	ataacttggt	gaccaggttc	tactccaatt	ctaactctac	cagattctac	4980	
ttggaaaggg	tttccgaaat	ggtcttgga	tctattagac	caatcgtcag	agaaaagagg	5040	30
gtgttcagaa	ttttggaat	tgggtgctgg	acaggctctt	tgtctaatgt	tgttttgact	5100	
aagttgaaca	cctacttgtc	caccttgaat	tctaattggtg	gttctggtta	caacatcatc	5160	
attgagtaca	ccttcaccga	tatttccgcc	aacttcatta	ttggtgaaat	ccaagaaacc	5220	
atgtgcaact	tgtacccaaa	cgttactttc	aagttctccg	tcttggactt	ggagaaagag	5280	
attattaact	cctccgattt	cttgatgggt	gattacgata	tagttttgat	ggcctacggt	5340	
atccatgccg	tttctaacat	taagttctcc	atcgaacagt	tgtacaagtt	gttgtctcca	5400	
agaggttggg	tgttggtgat	tgaacctaag	tccaacgttg	tgttctccga	tttggttttc	5460	
ggttgtttta	atcagtggtg	gaactactac	gatgatatta	gaactacca	ctgctocttg	5520	40
tctgaatctc	aatggaatca	gttggtggtg	aaccagtcct	tgaacaacga	atcctcttct	5580	

【表 1 1 - 9 8】

tottctaact	gttacggtgg	tttctccaac	gtttctttta	ttggtggtga	aaaggatgtc	5640
gactcccatt	ctttcatatt	gcactgccaa	aaagaatcca	tctcccaaat	gaagttagcc	5700
accactatta	acaacggttt	gtcatctggt	tccatcggtta	tcgttttgaa	ctctcaacaa	5760
ttgaccaaca	tgaagtccca	cccaaagggt	attgagtata	ttcaagaggc	tacctctttg	5820
tgcaagacca	ttgaaattat	cgattccaag	gacgtcttga	actctacca	ttcagttttg	5880
gaaaagatcc	aaaagtcctt	gttgggtgtc	tgtttgttgg	gttatgactt	gttgagagaac	5940
aactaccaag	aacagtcttt	cgaatacgtt	aagttgttga	acttgatctc	tactaccgcc	6000
tottcatcta	atgataagaa	accaccaaag	gtcttgttga	tcaccaagca	atctgaaaga	6060
atctocaggt	ctttctactc	cagatccttg	attggtatth	ccagaacctc	tatgaacgag	6120
tacccaaatt	tgtccattac	ctctatcgat	ttggatacca	acgactactc	attgcagttc	6180
ttgttgaagc	caatcttcag	caactcctaag	ttttccgaca	acgagttcat	cttcaaaaag	6240
ggcttgatgt	tcgtgtccag	gatctttaag	aacaagcagt	tgctagaatc	ctccaacgct	6300
tttgaaactg	actcttctaa	cttgtactgt	aaggcctctt	ctgacttgtc	ttacaagtac	6360
gctattaagc	agtctatggt	gaccgaaaat	cagatcgaaa	tcaaggttga	atgcgtcggg	6420
attaacttca	aggacaacct	attctacaag	ggcttgttgc	cacaagaaat	tttcagaatg	6480
ggtgacatct	acaatccacc	atatggtttg	gaatgctctg	gtgttattac	cagaattggt	6540
tctaacgtca	ccgaatactc	agttggtcaa	aatgtttttg	gtttcgccag	acattctttg	6600
ggttctcatg	ttgttaccac	caaggatttg	gttatcttga	agccagatac	catctcattt	6660
tctgaagctg	cttctatccc	agttgtttac	tgtactgctt	ggtactcctt	gttcaacatt	6720
ggtcagttgt	ctaacgaaga	atccatccta	attcattctg	ctactggtgg	tgtaggtttg	6780
gcttctttga	atthgttga	aatgaagaat	cagcaacagc	aaccattgac	caatgtttat	6840
gctactgttg	gctctaacga	gaagaagaag	ttcttgatcg	ataacttcaa	caacttgttc	6900
aaagaggacg	gcaaaaacat	tttctctacc	agagacaaag	aatactcaa	ccagttggaa	6960
tccaagatcg	atgttattht	gaacaccttg	tccggtgaat	tcgtcgaatc	taatttcaag	7020
tccttgagat	ccttcggtag	attgattgat	ttgtctgcta	ctcacgttta	cgccaatcaa	7080
caaattggtc	taggtaactt	caagttcgac	cacttgtatt	ctgctgttga	cttggaaga	7140
ttgatcgacg	aaaaaccta	gttgttgcag	tccatcttgc	aaagaattac	caactctatc	7200
gtcaacggtt	ccttggaaaa	aattccaatt	accatcttcc	catccaccga	aactaaggat	7260
gctatogaat	tattgtccaa	gagatcccat	atcggtaaag	ttgtttaga	ttgcaocgat	7320
atctctaagt	gtaatcctgt	tggtgatgtg	atcaccaact	tctctatgag	attgccaaag	7380
ccaaactacc	agttgaattt	gaactccaac	ttgttgatta	ctggtcagtc	tggtttgtct	7440
atccctttgt	tgaattggtt	gttgtctaag	tctgggtgta	acgttaagaa	cgttgtcatc	7500
atthctaagt	ccaccatgaa	gtggaagttg	cagactatga	tttcccattt	cgtttccggt	7560
ttcggtatcc	atthtaacta	cgttcaagtc	gacatctcca	actacgatgc	tttgtctgaa	7620

10

20

30

40

【表 1 1 - 9 9】

gctattaagc aattgccatc tgatttgcca ccaatcacct ctgtttttca tttggctgct	7680
atctacaacg atgttccaat ggatcaagtt accatgtcta ccgttgaatc tgttcataac	7740
cctaaagttt tgggtgccgt taacttgcac agaatotctg tttcttttgg ttggaagttg	7800
aaccacttgc tcttgttctc ttctattact gctattaccg gttaccaga ccaatctatc	7860
tacaattctg ccaactctat tttggacgct ttgtccaact ttagaagggt tatggggttg	7920
ccatccttct ccattaactt gggccaatg aaggatgaag gtaaggtttc taccaacaag	7980
agcatcaaga agctattcaa gtctagagggt ttgccaagcc tatccttgaa caagttatct	8040
ggtttggttg aggtcgtcat caacaacca tctaactcatg ttatccatc ccaattgatt	8100
tgctcccaa tcgatttcaa gacctacatc gaatctttct caactatgag gccaaagttg	8160
ttacaactgc aacctaccat ttccaagcag caatcttcta tcattaacga ttctaccaag	8220
gcttctcca acatttcatt gcaagataag atcacctcca aggtgtctga tttgttgtcc	8280
attccaatct ccaagatcaa cttcgatcat ccattgaaac actacggctt ggattctttg	8340
ttgaccgttc aattcaaate ctggatcgac aaagaattcg aaaagaactt gttcaccat	8400
atccaattgg ccaccatctc tattaactca ttcttgaaa aggtgaacgg cttgtctaca	8460
aacaataaca acaacaaca ttccaacgct aagtcctctc catccattgt caaagaagaa	8520
atogttacct tggacaagga tcaacaacca ttgctattga aagaacacca gcacattatc	8580
atctcccag atattagaat caacaagcca aagaggggat ccttgattag aaccccaatc	8640
ttgaacaaat tcaaccagat caccgaatcc attatcactc catctacacc atctttgtcc	8700
caatccgatg ttttgaaaac tccaaccaatc aagtctttga acaacactaa gaactccagc	8760
ttgattaaca cccaccaat tcaatctgtc caacaacatc aaaagcaaca acaaaaggctc	8820
caagtcatcc aacaacagca acaaccatta tccagattgt cctacaagag caacaacaac	8880
tctttcgttt tgggtatcgg tatttctggt ccaggtgaac ctatttcca acaatccttg	8940
aaagactcca tctccaatga cttttctgat aaggctgaaa ctaacgagaa ggtcaagaga	9000
atctttgagc aatctcaaat caagaccaga cacttgggta gagattacac taagccagag	9060
aactccatca agttcagaca tttggaaacc attaccgatg tgaacaacca gttcaagaaa	9120
gttgttccag atttggctca acaagcctgt ttgagagctt tgaagattg ggggtggtgat	9180
aagggtgata ttaccatat agtttctggt acctccaccg gtattatcat ccagatggt	9240
aatttcaagt tgatcgactt gttgggcttg aacaaggatg ttgaaagagt gtctttgaa	9300
ctaattgggtt gtttggctgg tttgagttct ttgagaactg ctgcttcttt ggctaaggct	9360
tctccaagaa atagaatttt ggttgtctgt accgaagtct gctccttgca tttttctaat	9420
actgatggtg gtgatcaaat ggtcgcctct tctatttttg ctgatgggtc tgctgcttac	9480
attattgggtt gtaacccaag aattgaagaa acccattat acgaagtcac gtgctccatt	9540
aacagatctt tcccaaatac cgaaaacgcc atggtttggg atttggaaaa agaaggttg	9600
aacttgggtt tggatgcttc tattocaatt gtcattgggt ctggtattga agccttcggt	9660

10

20

30

40

【表 1 1 - 1 0 0】

gatactttgt tggataaggc taagttgcaa acttccactg ctatttctgc taaggattgc	9720	
gaattcttga ttcatactgg tggcaagtcc atcttgatga acatcgaaaa ttccttgggt	9780	
atcgacccaa agcaaactaa gaatacttgg gatgtttacc atgcctacgg caatatgtca	9840	
tctgcctctg ttattttctg tatggatcat gccagaaagt ccaagtcttt gccaaactac	9900	
tcaatttctt tggcttttgg tccaggtttg gcttttgaag gttgtttctt gaagaacgtc	9960	
gtctaaagac ataaaactga aacaacacca attaataata gactttacag aagacgggag	10020	
acactagcac acaactttac caggcaaggt atttgacgct agcatgtgtc caattcagtg	10080	10
tcatttatga tttttttag taggatataa atatatacag cgctccaaat agtgccggtg	10140	
ccccaaaaac accacggaac ctcatctggt ctcgtacttt gttgtgacaa agtagctcac	10200	
tgcttatta tcacattttc attatgcaac gottcggaaa atacgatgtt gaaaatgcct	10260	
ctagagatga aaaacaatcg taaaagggtc ctgcgtaatt gaaacatttg atcagtatgc	10320	
agtggcacag aaacaaccag gaatactata gtcataggca atacaaggta tatattggct	10380	
atgcagacc ctccagaaag taccgacgtc aagttagata cacttaacga acctagtgca	10440	
catttaattg agaaaaatgt ggctcttct aaggacatat tccgttcgta cttgagttat	10500	
tggatctatg aaatcgctcg ctatacacca gtcatgattt tgcctctctt tatattacat	10560	
caaaataaga aaataattat aaca	10584	20
<210> 47		
<211> 4909		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Cassette with Cas9 coding sequence, regulatory sequences and integration sequences		
<220>		
<221> LV3		30
<222> (1)..(40)		
<220>		
<221> TEF1p		
<222> (41)..(446)		
<220>		
<221> Cas9		
<222> (470)..(4609)		
<220>		
<221> LV5		40

【表 1 1 - 1 0 1】

<222> (4870)..(4909)

<400> 47

```

aggaatactc tgaataaaac aacttatata ataaaaatgc atagcttcaa aatgtttcta      60
ctcctttttt actcttccag atttttctgg actccgcgca tcgccgtacc acttcaaaac      120
acccaagcac agcatactaa atttcccctc tttcttctct taggggtgctg ttaattacc      180
gtactaaagg tttggaaaag aaaaaagaga cgcctcggtt tctttttctt cgtcgaaaaa      240
ggcaataaaa atttttatca cgtttctttt tottgaaaat ttttttttg atttttttct      300
ctttcgatga cctcccattg atatttaagt taataaacgg tcttcaattt ctcaagtttc      360
agtttcattt ttcttgttct attacaactt tttttacttc ttgctcatta gaaagaaagc      420
atagcaatct aatctaagtt ttctagaact agtggatccc ccgggaaaaa tggacaagaa      480
gtactccatt gggctcgata tcggcacaaa cagcgtcggc tgggccgtca ttacggacga      540
gtacaaggtg ccgagcaaaa aattcaaagt tctgggcaat accgatcgcc acagcataaa      600
gaagaacctc attggcgccc tctgttoga ctccggggag acggccgaag ccacgoggct      660
caaaagaaca gcacggcgca gatataccog cagaaagaat cggatctgct acctgcagga      720
gatctttagt aatgagatgg ctaaggtgga tgactctttc ttccatagge tggaggagtc      780
ctttttggtg gaggaggata aaaagcacga gcgccacca atctttggca atatcgtgga      840
cgaggtggcg taccatgaaa agtaccacaac catatatcat ctgaggaaga agctttaga      900
cagtactgat aaggctgact tgcggttgat ctatctcgcg ctggcgcata tgatcaaatt      960
tcggggacac ttctcatcg agggggacct gaaccagac aacagcgatg tcgacaaact     1020
ctttatccaa ctggttcaga cttacaatca gcttttcgaa gagaaccoga tcaacgcctc     1080
cggagttgac gccaaagcaa tctgagcgc taggctgtcc aaatccggc ggctcgaaaa     1140
cctcatcgca cagctccctg gggagaagaa gaacggcctg tttgtaatc ttatcgccct     1200
gtcactcggg ctgacccca actttaaatc taacttcgac ctggccgaag atgccaaact     1260
tcaactgagc aaagacacct acgatgatga tctcgacaat ctgctggccc agatcggcga     1320
ccagtacgca gacctttttt tggcggcaaa gaacctgtca gacgccattc tgctgagtga     1380
tattctgca gtgaacacgg agatcaccaa agctccgctg agcgtagta tgatcaagcg     1440
ctatgatgag caccaccaag acttgacttt gctgaaggcc cttgtcagac agcaactgcc     1500
tgagaagtac aaggaaattt tcttogatca gtctaaaaat ggctacgccg gatacattga     1560
cggcgggagca agccaggagg aattttacia atttattaag cccatcttgg aaaaaatgga     1620
cggcaccgag gagctgctgg taaagcttaa cagagaagat ctggtgcgca aacagcgcac     1680
tttcgacaat ggaagcatcc cccaccagat tcacctgggc gaactgcacg ctatcctcag     1740
goggcaagag gatttctacc cttttttgaa agataacagg gaaaagattg agaaaatcct     1800
cacatttcgg ataccctact atgtaggccc cctcgcccgg ggaaattcca gattcgcgtg     1860
gatgactcgc aatcagaag agaccatcac tccctggaac ttcgaggaag tcgtggataa     1920

```

10

20

30

40

【表 1 1 - 1 0 2】

gggggcctct	gcccagtcct	tcatcgaaag	gatgactaac	tttgataaaa	atctgcctaa	1980
cgaaaagggtg	cttctctaac	actctctgct	gtacgagtac	ttcacagttt	ataacgagct	2040
caccaagggtc	aaatacgtca	cagaagggat	gagaaagcca	gcattcctgt	ctggagagca	2100
gaagaaagct	atcgtggacc	tcctcttcaa	gacgaaccgg	aaagttaccg	tgaaacagct	2160
caaagaagac	tatttcaaaa	agattgaatg	tttcgactct	gttgaaatca	gcgagagtga	2220
ggatcgcttc	aacgcatccc	tgggaacgta	tcacgatctc	ctgaaaatca	ttaaagacaa	2280
ggacttctctg	gacaatgagg	agaacgagga	cattcttgag	gacattgtcc	tcacccttac	2340
gttgtttgaa	gatagggaga	tgattgaaga	acgcttgaaa	acttacgctc	atctcttcga	2400
cgacaaaagtc	atgaaacagc	tcaagaggcg	ccgatataca	ggatgggggc	ggctgtcaag	2460
aaaactgatac	aatgggatcc	gagacaagca	gagtggaag	acaatcctgg	atcttcttaa	2520
gtccgatgga	tttgccaacc	ggaacttcat	gcagttgatc	catgatgact	ctctcacctt	2580
taaggaggac	atccagaaag	cacaagtttc	tggccagggg	gacagtcttc	acgagcacat	2640
cgctaactctt	gcaggtagcc	cagctatcaa	aaaggaata	ctgcagaccg	ttaaggctgt	2700
ggatgaactc	gtcaaagtaa	tgggaaggca	taagcccag	aatatcgta	tcgagatggc	2760
ccgagagAAC	caaactacc	agaagggaca	gaagaacagt	agggaaagga	tgaagaggat	2820
tgaagagggt	ataaaagaac	tggggtccca	aatccttaag	gaacaccag	ttgaaaacac	2880
ccagcttcag	aatgagaagc	tctacctgta	ctacctgcag	aacggcaggg	acatgtacgt	2940
ggatcaggaa	ctggacatca	atcggtctc	cgactacgac	gtggatcata	tcgtgcccc	3000
gtcttttctc	aaagatgatt	ctattgataa	taaagtgttg	acaagatccg	ataaaaatag	3060
agggaagagt	gataacgtcc	cctcagaaga	agttgtcaag	aaaatgaaa	attattggcg	3120
gcagctgctg	aacgccaac	tgatcacaca	acggaagttc	gataatctga	ctaaggctga	3180
acgaggtggc	ctgtctgagt	tggataaagc	cggcttcatc	aaaaggcagc	ttgttgagac	3240
acgccagatc	accaagcacg	tggcccaaat	tctcgattca	cgcatgaaca	ccaagtacga	3300
tgaaaatgac	aaactgattc	gagaggtgaa	agttattact	ctgaagtcta	agctggctctc	3360
agatttcaga	aaggactttc	agttttataa	ggtgagagag	atcaacaatt	accaocatgc	3420
gcatgatgcc	tacctgaatg	cagtggtagg	cactgcactt	atcaaaaaat	atcccaagct	3480
tgaatctgaa	tttgtttacg	gagactataa	agtgtacgat	gttaggaaa	tgatcgcaaa	3540
gtctgagcag	gaaataggca	aggccaaccg	taagtacttc	ttttacagca	atattatgaa	3600
ttttttcaag	accgagatta	cactggccaa	tggagagatt	cggaagcgac	cacttatcga	3660
aacaaacgga	gaaacaggag	aaatcgtgtg	ggacaagggt	agggatttcg	cgacagtccg	3720
gaaggctctg	tccatgccgc	aggtgaacat	cgttaaaaag	accgaagtac	agaccggagg	3780
cttctccaag	gaaagtatcc	tcccgaaaag	gaacagcgac	aagctgatcg	cacgcaaaaa	3840
agattgggac	ccaagaaat	acggcggatt	cgattctcct	acagtcgctt	acagtgtact	3900
ggttgtggcc	aaagtggaga	aaggaagtc	taaaaaactc	aaaagcgtca	aggaactgct	3960

10

20

30

40

【表 1 1 - 1 0 3】

gggcatcaca atcatggagc gatcaagctt cgaaaaaac cccatcgact ttctcgaggc	4020	
gaaaggatat aaagaggcca aaaaagacct catcattaag cttcccaagt actctctctt	4080	
tgagcttgaa aacggccgga aacgaatgct cgctagtgcg ggcgagctgc agaaaggtaa	4140	
cgagctggca ctgccctcta aatacgttaa tttcttgtat ctggccagcc actatgaaaa	4200	
gctcaaaggg tctcccgaag ataatgagca gaagcagctg ttcgtggaac aacacaaaca	4260	
ctaccttgat gagatcatcg agcaaataag cgaattctcc aaaagagtga tcctcgccga	4320	
cgtaaacctc gataagggtgc tttctgctta caataagcac agggataagc ccatcaggga	4380	10
gcaggcagaa aacattatcc acttgtttac tctgaccaac ttgggcgcgc ctgcagcctt	4440	
caagtacttc gacaccacca tagacagaaa gcggtacacc tctacaaagg aggtcctgga	4500	
cgccacactg attcatcagt caattacggg gctctatgaa acaagaatcg acctctctca	4560	
gctcggtgga gacagcaggg ctgaccccaa gaagaagagg aagggtgat ctcttctoga	4620	
gtcatgtaat tagttatgtc acgcttacat tcacgcocctc cccccacatc cgctctaacc	4680	
gaaaaggaag gagttagaca acctgaagtc taggtcccta tttatTTTTT tatagttatg	4740	
ttagtattaa gaacgttatt tatattcaa atttttcttt tttttctgta cagacgcgtg	4800	
tacgcatgta acattatact gaaaaccttg cttgagaagg ttttgggacg ctogaaggct	4860	
ttaatttgcc ctctttatat tacatcaaaa taagaaaata attataaca	4909	20

【 0 1 7 0】

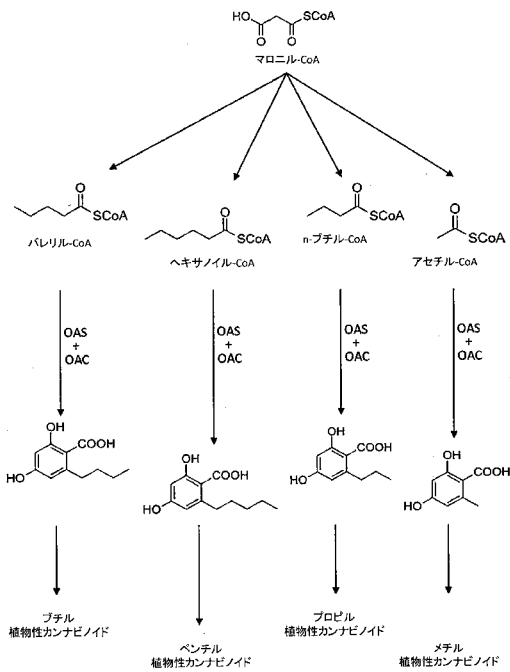
単なる例

先行する記載において、説明を目的として、実施形態の全体的理解をもたらすために多数の詳細が示されている。しかし、これらの具体的詳細が必要とされないことは当業者にとって明らかであろう。

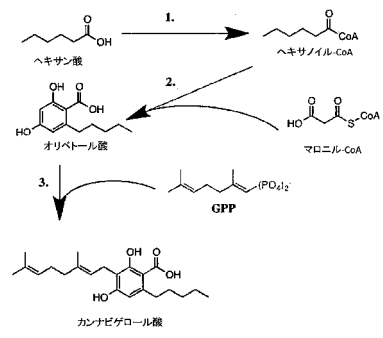
【 0 1 7 1】

上述の実施形態は、単なる例であることを意図する。本明細書に添付された特許請求の範囲によってのみ定義される範囲を逸脱することなく、当業者によって、特定の実施形態に対する変更、修正及びバリエーションが実行され得る。

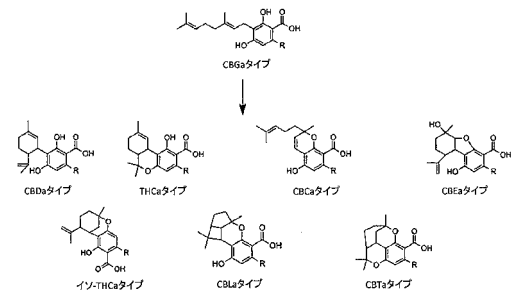
【 図 1 】



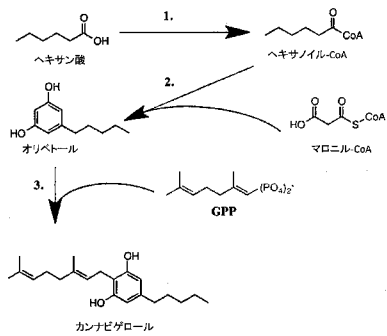
【 図 2 】



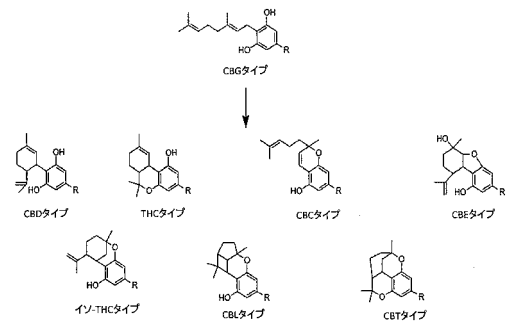
【 図 3 】



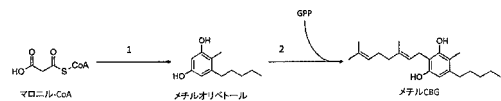
【 図 4 】



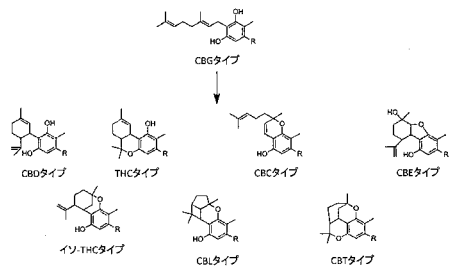
【 図 5 】



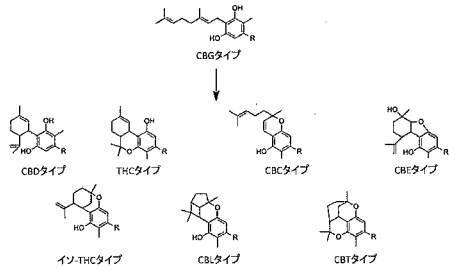
【 図 6 】



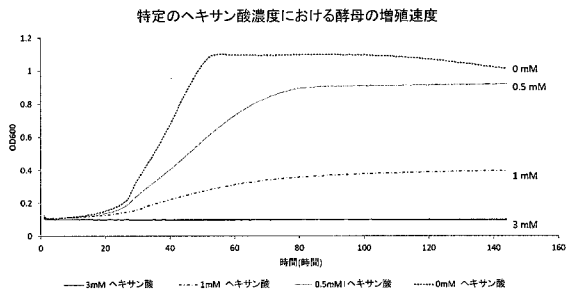
【 図 7 】



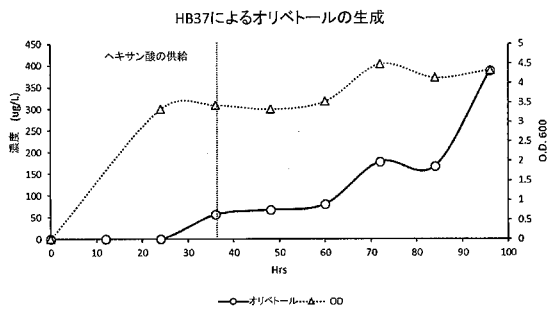
【 図 8 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

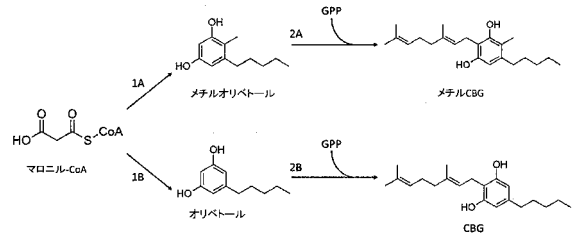


【 図 9 】

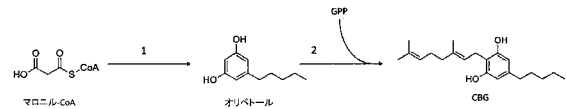


Fig. 9

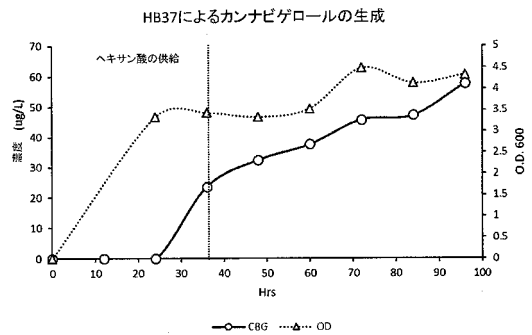
【 図 1 0 】



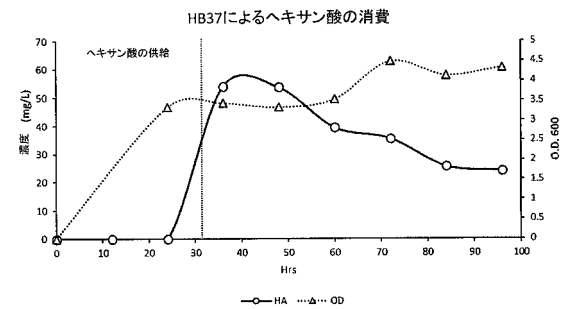
【 図 1 1 】



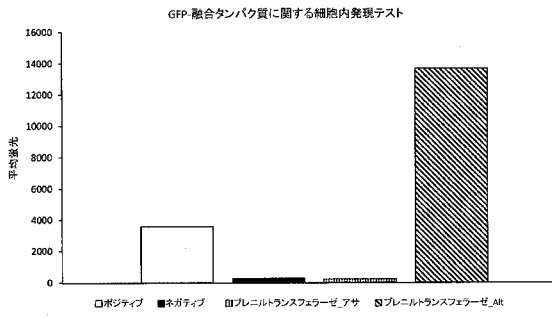
【 図 1 4 】



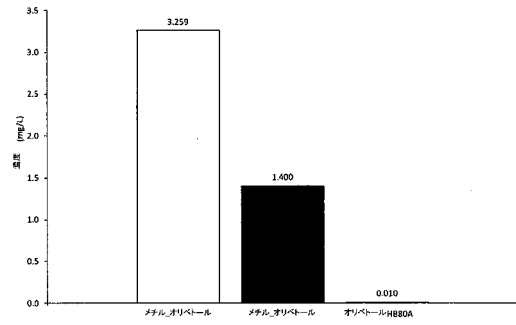
【 図 1 5 】



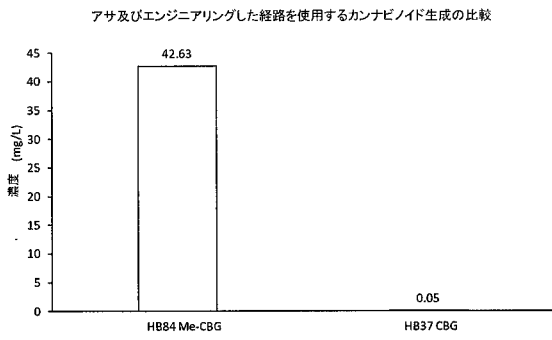
【 図 1 6 】



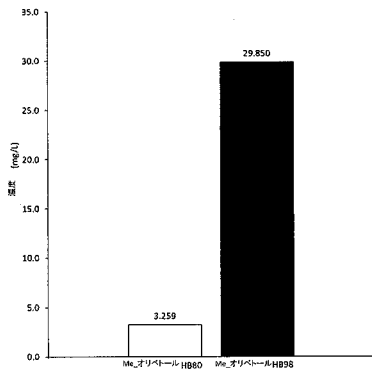
【 図 1 8 】



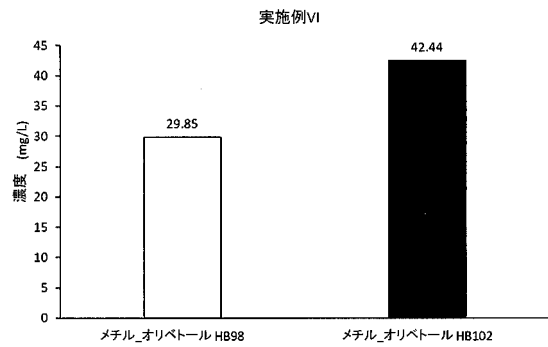
【 図 1 7 】



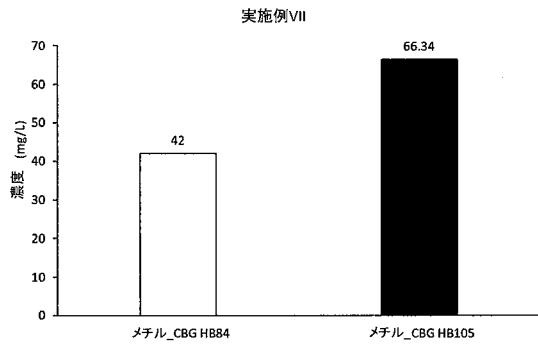
【 図 1 9 】



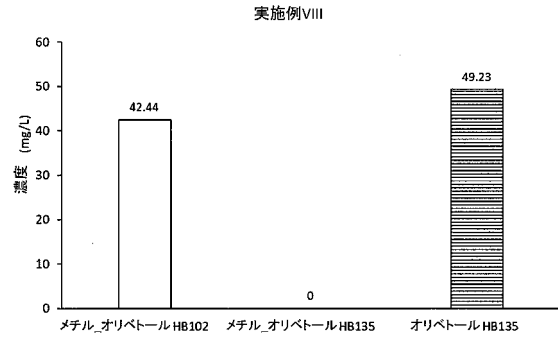
【 図 2 0 】



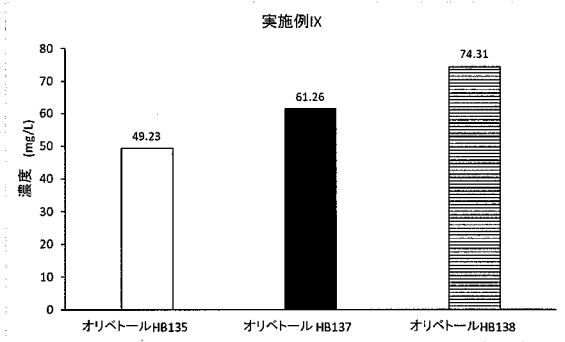
【 図 2 1 】



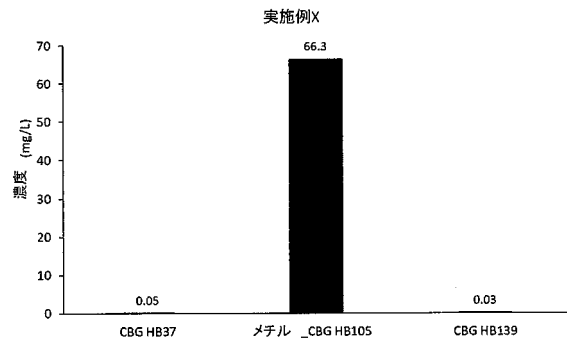
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【配列表】

2020507351000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年10月17日(2019.10.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

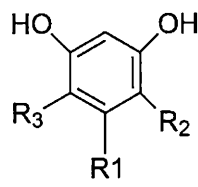
【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを生成する方法であって、ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチド及び細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチドを含む酵母細胞を提供する工程であって、

ポリケチドシンターゼ酵素が、マロニル-CoAから少なくとも1つの前駆化学物質を生成するためのものであり、前駆化学物質が、構造I:

【化1】



を有し、構造Iにおいて、R1が、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、H、カルボキシル、又はメチルであり、R3が、H、カルボキシル、又はメチルであり、

ポリケチドシンターゼ酵素が、アサに対してネイティブではなく、

細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素が、少なくとも1つの前駆化学物質をプレニル化するためのものであり、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種を提供する、工程と、

酵母細胞培養物をもたらすために前記酵母細胞を増殖させる工程とを含む、方法。

【請求項2】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1が、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、Hであり、R3が、Hである前駆化学物質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1が、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、カルボキシルであり、R3が、Hである前駆化学物質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1が、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、メチルであり、R3が、Hである前駆化学物質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1が、炭素数3の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、カルボキシルであり、R3が、メチルである前駆化学物質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

ポリケチドシンターゼ酵素が、キイロタマホコリカビ由来のDiPKSポリケチドシンターゼ酵素を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号46の塩基535から9978によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKSポリケチドシンターゼ酵素のコード配列を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号46の塩基535から9978と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R2が、メチル基である前駆化学物質を含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうち少なくとも1つの種が、メチル化植物性カンナビノイドアナログを含む、請求項6から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

DiPKSポリケチドシンターゼ酵素が、少なくとも1つの前駆化学物質のメチル化を軽減するためにC-Metドメインの活性部位に影響を及ぼす変異を含み、その結果、R2がメチルであり、R3がHである第1の前駆化学物質、及びR2がHであり、R3がHである第2の前駆化学物質を含む少なくとも1つの前駆化学物質を生じ、

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうち少なくとも1つの種が、メチル化植物性カンナビノイドアナログ及び非メチル化植物性カンナビノイドを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項11】

DiPKSポリケチドシンターゼ酵素が、DiPKS^{G1516D;G1518A}ポリケチドシンターゼ酵素を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号37の塩基523から9966によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKS^{G1516D;G1518A}ポリケチドシンターゼ酵素のコード配列を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号37の塩基523から9966と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

DiPKSポリケチドシンターゼ酵素が、少なくとも1つの前駆化学物質のメチル化を防止するために、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素のC-Metドメインの活性部位における活性を低減する変異を含み、その結果、水素R2基及び水素R3基を有する少なくとも1つの前駆化学物質を生じ、

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうち少なくとも1つの種が、脱炭酸植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項15】

DiPKSポリケチドシンターゼ酵素が、DiPKS^{G1516R}ポリケチドシンターゼ酵素を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号38の塩基523から9966によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKS^{G1516R}ポリケチドシンターゼ酵素のコード配列を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

第1のポリヌクレオチドが、配列番号38の塩基523から996と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

酵母細胞が、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素の活性を増加させるために、ホスホパンテテイルトランスフェラーゼ酵素をコードするホスホパンテテイルトランスフェラーゼポリヌクレオチドを含む、請求項6から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

ホスホパンテテイルトランスフェラーゼが、A.ニデュランス由来のNpgAホスホパンテテイルトランスフェラーゼ酵素を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

ホスホパンテテイルトランスフェラーゼポリヌクレオチドが、配列番号10の塩基1170から2201によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するA.ニデュランス由来のNpgAホスホパンテテイルトランスフェラーゼ酵素のコード配列を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

ホスホパンテテイルトランスフェラーゼポリヌクレオチドが、配列番号10の塩基1170から2201と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

ポリケチドシンターゼ酵素が、より長鎖のケチル-CoAを用いずにマロニル-CoAから少なくとも1つの前駆化学物質を合成するための活性部位を含む、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1においてペンチル基を含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種が、ペンチル-植物性カンナビノイド又はメチル化ペンチル-植物性カンナビノイドアナログを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

少なくとも1つの前駆化学物質が、オリベトール、オリベトール酸、メチル-オリベトール、又はメチル-オリベトール酸のうちの少なくとも1つを含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種が、CBG、CBGa、meCBG、又はmeCBGaのうちの少なくとも1つを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素が、ストレプトマイセス種CL190由来のNphBプレニルトランスフェラーゼ酵素を含む、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

第2のポリヌクレオチドが、配列番号44の塩基987から1913によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するストレプトマイセス種CL190由来のNphBプレニルトランスフェラーゼ酵素のコード配列を含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

第2のポリヌクレオチドが、配列番号44の塩基987から1913と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1が、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、Hであり、R3が、Hである前駆化学物質を含む、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1が、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、カルボキシルであり、R3が、Hである前駆化学物質を含む、請求項1から27のいずれか

一項に記載の方法。

【請求項30】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1が、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、メチルであり、R3が、Hである前駆化学物質を含む、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

少なくとも1つの前駆化学物質が、R1が、炭素数5の鎖長を有するアルキル基であり、R2が、カルボキシルであり、R3が、メチルである前駆化学物質を含む、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

酵母細胞が、利用可能なゲラニルピロリン酸を増加させる遺伝子改変を含む、請求項1から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

遺伝子改変が、Erg20酵素の不活性化を含む、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

酵母細胞が、配列番号3によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するErg20^{K197E}のコード配列を含むErg20ポリヌクレオチドを含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

Erg20ポリヌクレオチドが、配列番号3と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

酵母細胞が、利用可能なマロニル-CoAを増加させる遺伝子改変を含む、請求項1から35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

遺伝子改変が、Maf1の発現の増加を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

酵母細胞が、配列番号8の塩基936から2123によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するMaf1のコード配列を含むMaf1ポリヌクレオチドを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

Maf1ポリヌクレオチドが、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号8と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

遺伝子改変が、アルデヒドデヒドロゲナーゼ及びアセチル-CoAシンターゼの細胞質発現を増加させるための改変を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項41】

酵母細胞が、配列番号4の塩基3938から5893によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS. エンテリカ由来のAcs^{L641P}のコード配列、及び配列番号4の塩基1494から2999によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS. セレピシエ由来のAld6のコード配列を含むAcsポリヌクレオチドを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

Acsポリヌクレオチドが、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号4の塩基51から7114と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

遺伝子改変が、マロニル-CoAシターゼの活性を増加させるための改変を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項44】

酵母細胞が、S.セレピシエ由来のAcc1^{S659A;S1157A}のコード配列を含むAcc1ポリヌクレオチドを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

Acc1ポリヌクレオチドが、Acc1^{S659A;S1157A}酵素のコード配列を含み、該酵素の一部が、配列番号7の塩基9から1716によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質部分Acc1^{S659A;S1157A}と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

Acc1ポリヌクレオチドが、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号7と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

酵母細胞が、構成的プロモーターの調節下にあるS.セレピシエ由来のAcc1のコード配列を含むAcc1ポリヌクレオチドを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項48】

構成的プロモーターが、S.セレピシエ由来のPGK1プロモーターを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

PGK1プロモーターが、配列番号6の塩基7から750と80%から100%の間のヌクレオチド相同性を有する、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

遺伝子改変が、ステロール生合成の活性化因子の発現の増加を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項51】

酵母細胞が、配列番号9の塩基975から3701によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS.セレピシエ由来のUpc2^{E888D}のコード配列を含むUpc2ポリヌクレオチドを含む、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

Upc2ポリヌクレオチドが、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号9と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

第2のポリヌクレオチドが、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35又は配列番号36のいずれか1つと80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素のコード配列を含む、請求項1から24又は請求項28から52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

酵母細胞培養物から植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうち少なくとも1つの種を抽出する工程を更に含む、請求項1から53のいずれか一項に記載の方法。

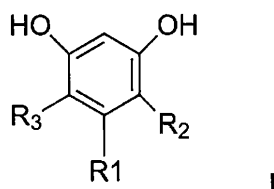
【請求項55】

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを生成するための酵母細胞であって、

ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチド、及び
細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチド
を含み、

ポリケチドシンターゼ酵素が、マロニル-CoAから少なくとも1つの前駆化学物質を生
成するためのものであり、前駆化学物質が、構造I:

【化2】



を有し、構造Iにおいて、R1が、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基であ
り、R2が、H、カルボキシル、又はメチルであり、R3が、H、カルボキシル、又はメチルで
あり、

ポリケチドシンターゼ酵素が、アサに対してネイティブではなく、

細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素が、少なくとも1つの前駆化学物質をプレ
ニル化するためのものであり、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログ
のうちの少なくとも1つの種を提供する、酵母細胞。

【請求項56】

方法の請求項1から53のいずれか一項において提供される酵母細胞に関連して規定され
る酵母細胞、第1のポリヌクレオチド、又は第2のポリヌクレオチドのうちの1つ以上につ
いての特徴を更に含む、請求項55に記載の酵母細胞。

【請求項57】

植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログの生成のために酵母細胞を形
質転換する方法であって、

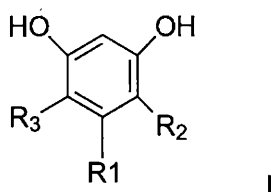
ポリケチドシンターゼ酵素をコードする第1のポリヌクレオチドを酵母細胞株へと導入
する工程、及び

細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素をコードする第2のポリヌクレオチドを前記
酵母へと導入する工程

を含み、

ポリケチドシンターゼ酵素が、マロニル-CoAから少なくとも1つの前駆化学物質を生
成するためのものであり、前駆化学物質が、構造I:

【化3】



を有し、構造Iにおいて、R1が、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基であ
り、R2が、H、カルボキシル、又はメチルであり、R3が、H、カルボキシル、又はメチルで
あり、

ポリケチドシンターゼ酵素が、アサに対してネイティブではなく、

細胞質性プレニルトランスフェラーゼ酵素が、少なくとも1つの前駆化学物質をプレニル化するためのものであり、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種を提供する、方法。

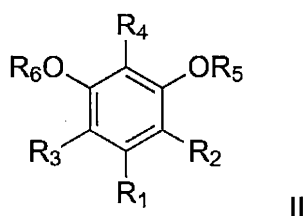
【請求項58】

ポリヌクレオチドを、第1のポリヌクレオチド若しくは第2のポリヌクレオチドの特徴を共有するか、又は方法の請求項1から53のいずれか一項において提供される酵母細胞の特徴のうちの1つ以上を共有する酵母細胞を生じる酵母細胞へと導入する工程を更に含む、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

以下の構造II:

【化4】



を有する植物性カンナビノイドアナログであって、

構造IIにおいて、R1が、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基であり、

R2が、メチル基であり、

R3が、H、カルボキシル基、又はメチル基であり、

R4が、ゲラニル基であり、

R5が、H又はR4のゲラニル基であり、

R6が、H又はR4のゲラニル基である、植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項60】

R1が、炭素数5の鎖長を有し、R3が、Hである、請求項59に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項61】

ゲラニル基が、環化ゲラニル基を含む、請求項59又は60に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項62】

R5が、環化ゲラニル基である、請求項61に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項63】

R6が、環化ゲラニル基である、請求項62に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項64】

R6が、環化ゲラニル基である、請求項61に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

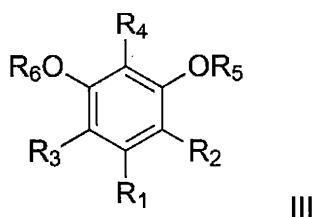
【請求項65】

酵母における生合成によって生成される、請求項59から64のいずれか一項に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項66】

以下の構造III:

【化5】



を有する植物性カンナビノイドアナログであって、

構造IIIにおいて、R1が、ペンチル基であり、

R2が、メチル基であり、

R3が、Hであり、

R4が、ゲラニル基であり、

R5が、H又はR4のゲラニル基であり、

R6が、H又はR4のゲラニル基である、植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項67】

ゲラニル基が、環化ゲラニル基を含む、請求項66に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項68】

R5が、環化ゲラニル基である、請求項67に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項69】

R6が、環化ゲラニル基である、請求項68に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【請求項70】

R6が、環化ゲラニル基である、請求項67に記載の植物性カンナビノイドアナログ。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

一部の実施形態では、酵母細胞は、ヘキサノイルシンターゼ酵素をコードするヘキサノイルシンターゼヌクレオチドを含み；ポリケチドシンターゼ酵素は、アサ由来のOAS酵素を含み；酵母細胞を増殖させる工程は、ヘキサノ酸を含む栄養調製物中で酵母細胞を増殖させる工程を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、アサのポリケチドシクラーゼ酵素を含まず、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうち少なくとも1つの種は、脱炭酸植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号45の塩基3841から4995によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列同一性を有する一次構造を有するアサ由来のOAS酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号45の塩基3841から4995と80%から100%の間の塩基配列同一性を有する。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号45の塩基3841から4995と80%から100%の間の塩基配列同一性を有する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

一部の実施形態では、ポリケチドシンターゼ酵素は、キイロタマホコリカビ由来のDiPKSポリケチドシンターゼ酵素を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号46の塩基535から9978によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKSポリケチドシンターゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号46の塩基535から9978と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、少なくとも1つの前駆化学物質は、R2においてメチル基を含み、植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、メチル化植物性カンナビノイドアナログを含む。一部の実施形態では、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素は、少なくとも1つの前駆化学物質のメチル化を軽減するためにC-Metドメインの活性部位に影響を及ぼす変異を含み、その結果、R2がメチルであり、R3がHである第1の前駆化学物質、及びR2がHであり、R3がHである第2の前駆化学物質を含む少なくとも1つの前駆化学物質を生じ；植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、メチル化植物性カンナビノイドアナログ及び非メチル化植物性カンナビノイドを含む。一部の実施形態では、DiPKSポリケチドシンターゼは、DiPKSG1516D；G1518Aポリケチドシンターゼ酵素を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号37の塩基523から9966によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するG1518Aポリケチドシンターゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号37の塩基523から9966と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、DiPKSポリケチドシンターゼは、DiPKSG1516Rポリケチドシンターゼ酵素を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号38の塩基523から9966によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するDiPKSG1516Rポリケチドシンターゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号38の塩基523から9966と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素は、少なくとも1つの前駆化学物質のメチル化を防止するために、DiPKSポリケチドシンターゼ酵素のC-Metドメインの活性部位における活性を低減する変異を含み、その結果、水素R2基及び水素R3基を有する少なくとも1つの前駆化学物質を生じ；植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログのうちの少なくとも1つの種は、脱炭酸植物性カンナビノイド又は植物性カンナビノイドアナログを含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、DiPKSの活性を増加させるために、ホスホパンテテイルトランスフェラーゼ酵素をコードするホスホパンテテイルトランスフェラーゼポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ホスホパンテテイルトランスフェラーゼは、A.ニデュランス(A. nidulans)由来のNpgAホスホパンテテイルトランスフェラーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、ホスホパンテテイルトランスフェラーゼポリヌクレオチドは、配列番号10の塩基1170から2201によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するA.ニデュランス由来のNpgAホスホパンテテイルトランスフェラーゼ酵素に関するコード配列を含む。一部の実施形態では、ホスホパンテテイルトランスフェラーゼポリヌクレオチドは、配列番号10の塩基1170から2201と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

一部の実施形態では、酵母細胞は、利用可能なゲラニルピロリン酸を増加させる遺伝子改変を含む。一部の実施形態では、遺伝子改変は、Erg20酵素の不活性化を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、配列番号3によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するErg20K197Eに関するコード配列を含むErg20ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、Erg20ポリヌクレオチドは、配列番号3と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

一部の実施形態では、酵母細胞は、利用可能なマロニル-CoAを増加させる遺伝子改変を含む。一部の実施形態では、遺伝子改変は、Maf1の発現の増加を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、配列番号8の塩基936から2123によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するMaf1に関するコード配列を含むMaf1ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、Maf1ポリヌクレオチドは、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号8と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、遺伝子改変は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ及びアセチル-CoAシンターゼの細胞質発現を増加させるための改変を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、配列番号4の塩基3938から5893によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS.エンテリカ(S. enterica)由来のAcsL641Pに関するコード配列、及び配列番号4の塩基1494から2999によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS.セレピシエ由来のAld6に関するコード配列を含むAcsポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、Acsポリヌクレオチドは、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号4の塩基51から7114と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、遺伝子改変は、マロニル-CoAシンターゼの活性を増加させるための改変を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、S.セレピシエ由来のAcc1S659A; S1157Aに関するコード配列を含むAcc1ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、Acc1ポリヌクレオチドは、Acc1S659A; S1157A酵素に関するコード配列を含み、該酵素の一部が、配列番号7の塩基9から1716によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質部分Acc1S659A; S1157Aと80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有する。一部の実施形態では、Acc1ポリヌクレオチドは、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を更に含み、配列番号7と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。一部の実施形態では、酵母細胞は、構成的プロモーターの調節下にあるS.セレピシエ由来のAcc1に関するコード配列を含むAcc1ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、構成的プロモーターは、S.セレピシエ由来のPGK1プロモーターを含む。一部の実施形態では、PGK1プロモーターは、配列番号6の塩基7から750と80%から100%の間のヌクレオチド相同性を有する。一部の実施形態では、遺伝子改変は、ステロール生合成の活性化因子の発現の増加を含む。一部の実施形態では、酵母細胞は、配列番号9の塩基975から3701によって定義されるリーディングフレームによってコードされるタンパク質と80%から100%の間のアミノ酸残基配列相同性を有する一次構造を有するS.セレピシエ由来のUpc2E888Dに関するコード配列を含むUpc2ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、Upc2ポリヌクレオチドは、プロモーター配列、ターミネーター配列及び組み込み配列を含み、配列番号9と80%から100%の間の塩基配列相同性を有する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

を有する植物性カンナビノイドアナログが提供される。構造IIにおいて、R1は、炭素数1、2、3、4、又は5の鎖長を有するアルキル基であり；R2は、メチル基であり；R3は、H、カルボキシル基、又はメチル基であり；R4は、ゲラニル基であり；R5は、H、又はR4におけるゲラニル基であり；R6は、H、又はR4におけるゲラニル基である。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

一部の実施形態では、ゲラニル基は、環化ゲラニル基を含む。一部の実施形態では、R5は、環化ゲラニル基である。一部の実施形態では、R5及びR6は、各々環化ゲラニル基である。一部の実施形態では、R6は、環化ゲラニル基である。一部の実施形態では、植物性カンナビノイドアナログは、酵母における生合成によって生成される。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

を有する植物性カンナビノイドアナログが提供される。構造IIIにおいて、R1は、ペンチル基であり；R2は、メチル基であり；R3は、Hであり；R4は、ゲラニル基であり；R5は、H、又はR4におけるゲラニル基であり；R6は、H、又はR4におけるゲラニル基である。

一部の実施形態では、ゲラニル基は、環化ゲラニル基を含む。一部の実施形態では、R5は、環化ゲラニル基である。一部の実施形態では、R5及びR6は、各々環化ゲラニル基である。一部の実施形態では、R6は、環化ゲラニル基である。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

Acc1の発現を上方調節することに加えて、S.セレピシエは、Acc1活性及び細胞質性アセチル-CoA濃度を増加させるために、1つ又は複数のAcc1の改変を含んでもよい。Acc1の抑制を取り除き、より高いAcc1発現及びより多いマロニル-CoA生成をもたらす調節配列における2つの変異は、文献において特定された。配列番号7は、S.セレピシエゲノムを相同組換えによってネイティブAcc1遺伝子において改変するために使用され得るポリヌクレオチドである。配列番号7は、Ser659Ala及びSer1157Ala改変を有するAcc1遺伝子に関するコード配列の一部を含む。結果として、この配列により形質転換されたS.セレピシエは、Acc1^{S659A; S1157A}を発現することになる。同様の結果は、例えば、任意の適切な部位に、Tef1プロモーター、Ser659Ala及びSer1157Ala改変を有するAcc1、及びPrm9ターミネーターを有する配列を組み込むことによって達成されてもよい。最終結果は、Tef1、Acc1^{S659A; S1157A}、及びPrm9が、S.セレピシエゲノムへの組み込みを促進するためのゲノムDNA配列に隣接することであろう。これは、Flagfeldtの部位18で試みられたが、構築物のサイズによって、代わりに、上述の配列番号7を用いるアプローチが続いて行われた。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

上記遺伝子、Erg20^{K197E}、Acs^{L641P}、Ald6、Maf1、Acc1^{S659A; S1157A}又はUpc2^{E888D}は、プラスミドから発現されるか又はS.セレビシエのゲノムへと組み込まれてもよい。ゲノムへの組み込みは、CRISPR組換えを含む相同組換え、又は任意の適切なアプローチによるものであってもよい。Acc1のプロモーターは、組換えによって同様に改変されてもよい。配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7、配列番号8、又は配列番号9のそれぞれにおけるコード配列及び調節配列は、発現のためのプラスミド(例えば、pYES等)又はS.セレビシエゲノムへの組み込みのための直鎖状ポリヌクレオチドに含まれてもよい。基本株HB42、HB82、HB100、HB106、又はHB110のそれぞれは、1つ又は複数の組み込まれた配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号8、又は配列番号10を含む(以下を参照のこと)。配列番号7、又は配列番号9の組み込みは、同様のアプローチによって適用されてもよい。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0109

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0109】

配列番号10に示されるNpgAドナーポリヌクレオチドを調製し、増幅させた。DNA SOEingを使用して、NpgA組み込みのために、3つのポリヌクレオチドから単一のドナーDNA断片を作出した。第1のポリヌクレオチドは、ドナーの特定位置におけるゲノムへの組み込みを可能とするゲノム相同性の5'領域であった。第2のポリヌクレオチドは、NpgA遺伝子カセットをコードしていた。NpgA遺伝子カセットは、Tef1プロモーター、NpgAコード配列及びPrm9ターミネーターを含む。ホスホパンテイニルトランスフェラーゼポリヌクレオチドは、S.セレビシエゲノムへの標的化組み込みを容易にするゲノム相同性に対する3'領域を含んだ。

【手続補正 12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0111

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0111】

配列番号8に示されるMaf1ドナーポリヌクレオチドを調製し、増幅させた。DNAのSOEingを使用して、Maf1組み込みのために、3つのポリヌクレオチドから単一のドナーDNA断片を作出した。第1のポリヌクレオチドは、ドナーの特定位置におけるゲノムへの組み込みを可能とするゲノム相同性の5'領域であった。第2のポリヌクレオチドは、Maf1遺伝子カセットをコードしていた。Maf1遺伝子カセットは、Tef1プロモーター、Maf1コード配列及びPrm9ターミネーターを含む。Maf1ポリヌクレオチドは、S.セレビシエゲノムへの標的化組み込みを容易にするゲノム相同性に対する3'領域を含んだ。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0113】

配列番号6に示されるAcc1-PGK1pドナーポリヌクレオチドを調製し、増幅させた。DNAの

SOEingを使用して、Acc1-PGK1p組み込みのために、3つのポリヌクレオチドから単一のドナーDNA断片を作出した。第1のポリヌクレオチドは、ドナーの特定位置におけるゲノムへの組み込みを可能とするゲノム相同性の5'領域であった。第2のポリヌクレオチドは、PGK1プロモーター領域をコードしていた。Acc1ポリヌクレオチドは、S.セレビシエゲノムへの標的化組み込みを容易にするゲノム相同性に対する3'領域を含んだ。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0168

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0168】

【表 1 1 - 1 7】

<210> 6
 <211> 971
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PGK1 promoter and integration sequences for *Saccharomyces cerevisiae* Accl promoter
 <220>
 <221> PGK1p
 <222> (7)..(750)
 <400> 6
 tgttttatat ttgttgtaaa aagtagataa ttacttcctt gatgatctgt aaaaaagaga 60
 aaaagaaagc atctaagaac ttgaaaaact acgaattaga aaagaccaa tatgtatttc 120
 ttgcattgac caatttatgc aagtttatat atatgtaa atagtttca cgaggttcta 180
 ctaaactaaa ccacccctt ggttagaaga aaagagtgtg tgagaacagg ctgttggtgt 240
 cacacgattc ggacaattct gtttgaaaga gagagagtaa cagtacgatc gaacgaactt 300
 tgctctggag atcacagtgg gcatcatagc atgtggact aaacccttc ccgccattcc 360
 agaacottcg attgcttggt acaaaacctg tgagccgtcg ctaggacctt gttgtgtgac 420
 gaaattggaa gctgcaatca ataggaagac aggaagtcga gcgtgtctgg gttttttcag 480
 tttgtttctt tttgcaaaca aatcacgagc gacggtaatt tctttctcga taagaggcca 540
 cgtgctttat gagggttaaca tcaattcaag aaggaggaa aacttcctt tttctggccc 600
 tgataatagt atgagggtga agccaaaata aaggattcgc gcccaaatcg gcatctttaa 660
 atgcaggat gcgatagttc ctactcttt cttactcac gagtaattct tgcaaatgcc 720
 tattatgcag atgttataat atctgtgctg agggataaaa agagtagaat aaggaaagga 780
 aaattgaaga gagcagaaca attgtagaac cgataacaat tgtgacagtg attgtgctag 840
 gctatactgt gccagaatac gactgggagt gctgttcttc ttatataatct tggcgctgat 900
 tgagcgtata gcctagttca ccaagcagta gagagagtgg caatgagcgg ttgaatttcg 960
 actgacgactt g 971
 <210> 7
 <211> 1724
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Cassette with *Saccharomyces cerevisiae* Accl (S659A; S1157A)

【表 1 1 - 1 8】

coding sequence, regulatory sequences and integration sequences

<220>

<221> T-G Ser659Ala

<222> (108)..(108)

<220>

<221> T-G ser1157ala

<222> (1602)..(1602)

<400> 7

```

ggcgcgccga gggtaaaaga tacaagttca cggtcgctaa atccggtaat gaccgctaca      60
cattatztat caatggttct aaatgtgata tcatactgcg tcaactagct gatgggtgggc      120
tgctgatcgc tatcggcgct aaatcgcata ccatctattg gaaagaagaa gttgctgcta      180
caagattatc cgttgactct atgactactt tgttggaaat tgaaaacgat ccaaccagct      240
tgogtactcc atcccctggt aaattggtta aattcttggg ggaaaatggt gaacacatta      300
tcaagggcca accatatgca gaaattgaag ttatgaaaat gcaaatgcct ttggtttctc      360
aagaaaatgg tatcgtccag ttattaaage aacctggttc taccattggt gcaggtgata      420
tcatggctat tatgactctt gacgatccat ccaaggtcaa gcacgctcta ccatttgaag      480
gtatgctgcc agattttggt tctccagtta tcgaaggaac caaacctgcc tataaattca      540
agtcattagt gtctactttg gaaaacattt tgaagggtta tgacaaccaa gttattatga      600
acgcttcctt gcaacaattg atagaagttt tgagaaatcc aaaactgcct tactcagaat      660
ggaaactaca catctctgct ttacattcaa gattgcctgc taagctagat gaacaaatgg      720
aagagttagt tgcacgttct ttgagacgtg gtgctgtttt cccagctaga caattaagta      780
aattgattga tatggccgtg aagaatcctg aatacaacc cgacaaattg ctgggcgcag      840
tcgtggaacc attggcggat attgctcata agtactctaa cgggtagaa gcccatgaac      900
attctatatt tgtccatttc ttggaagaat attacgaagt tgaaaagtta ttcaatggtc      960
caaatgttcg tgaggaaaat atcattctga aattgcgtga tgaaaaccct aaagatctag     1020
ataaagttgc gctaactggt ttgtctcatt cgaaagtttc agcgaagaat aacctgatcc     1080
tagctatctt gaaacattat caaccattgt gcaagttatc ttctaaagtt tctgccattt     1140
tctctactcc tctacaacat attgttgaac tagaatctaa ggctaccgct aaggctcgtc     1200
tacaagcaag agaaattttg attcaaggcg ctttaccttc ggtcaaggaa agaactgaac     1260
aaattgaaca tatcttaaaa tcctctgttg tgaaggttgc ctatggctca tccaatccaa     1320
agcgcctctga accagatttg aatatcttga aggacttgat cgattctaatac tacggttggt     1380
tcgatgtttt acttcaattc ctaaccatc aagaccagct tgtgactgct gcagctgctc     1440
aagtctatat tcgtcgtgct tatcgtgctt acaccatagg agatattaga gttcacgaag     1500
gtgtcacagt tccaattggt gaatggaaat tccaactacc ttcagctgcg ttctccacct     1560

```

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2018/050189
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12P 17/02</i> (2006.01), <i>C07C 39/08</i> (2006.01), <i>C07C 65/05</i> (2006.01), <i>C12N 1/19</i> (2006.01), <i>C12N 15/52</i> (2006.01), <i>C12N 15/54</i> (2006.01) (more IPCs on the last page)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Keywords used across the whole IPC		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Questel Orbit; PubMed; Library Discovery Tool; Canadian Patent Database; GenomeQuest; STN Keywords: cannabinoids; yeast; polyketide synthase; olivetolic acid synthase; DiPKS; prenyltransferase; NphB prenyltransferase; cytosolic prenyltransferase; SEQ ID NOs: 45, 46, 37, 38; phytocannabinoid analogue of structures II and III		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 2017/161041 A1 (GONZALEZ, R and CHEONG, S) 21 September 2017 (21/09/2017) See for example: [00227]-[00237] and [00248]-[00260]	1, 26-33, 36, 40, 57, 61
P, Y	ZIRPEL, B. et al. Engineering yeasts as platform organisms for cannabinoid biosynthesis. J Biotechnol. 10 October 2017 (10/10/2017), ePub 08 July 2017 (08/07/2017), Vol. 259, pages 204-212, ISSN 0168-1656. See whole document	1, 26-33, 57, 61
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 25 April 2018 (25-04-2018)		Date of mailing of the international search report 17 May 2018 (17-05-2018)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Julie Deschênes-Furry (819) 639-7795

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2018/050189

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GHOSH, R. et al. Dissecting the Functional Role of Polyketide Synthases in <i>Dictyostelium discoideum</i> . Biosynthesis of the differentiation regulating factor 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol. <i>J. Biol. Chem.</i> 25 April 2008 (25-04-2008), Vol. 283, No. 17, pages 11348-11354, ISSN 0021-9258 See whole document, especially Figure 1 and Figure 6	63-66
Y	WO 2016/010827 A1 (POULOS, J.L. and FARNIA, A.N.) 21 January 2016 (21/01/2016) See for example: [0017], [0034]-[0047], and SEQ ID NOS: 24 and 25 Family member cited in application	1-7, 10-12, 15-20, 26-33, 36-39, 57-62
Y	WO 2006/081537 A2 (KUZUYAMA, T. et al.) 3 August 2006 (03-08-2006) See for example : [0013]-[0016], [0021], [0047], Example 5, SEQ ID NO:2	1, 2, 4-7, 26-33, 36-39, 57-62
Y	TAURA, F. et al. Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. <i>FEBS Lett.</i> 18 June 2009 (18-06-2009), Vol. 583, No. 12, pages 2061-2066, ISSN 0014-5793 See whole document, Accession number AB164375	1-7, 26-33, 36-39, 59-62
Y	AB164375 [nucleic acid sequence, NCBI [online database], sequence deposited 28 March 2008 (28-03-2008), Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB164375 >	1-7, 26-33, 36-39, 59-62
Y	US2012/0122180 A1 (AUSTIN, M.B. et al.) 17 May 2012 (17-05-2012) See for example: [0007], [0011], [0020], [0021], [0099], [0129], [0191]-[0203], and SEQ ID NO: 1	1, 2, 4-7, 10-12, 15-20, 26-33, 36-39, 59-62
P, A	CARVALHO, A. et al. Designing microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids. <i>FEMS Yeast Res.</i> June 2017, Vol. 17, No. 4, pages 1-11, ISSN 1567-1356	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2018/050189

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO 2017/161041 A1	21 September 2017 (21-09-2017)	None	
WO 2016/010827 A1	21 January 2016 (21-01-2016)	WO2016010827A1 CA2990071A1 US2016010126A1 US9822384B2 US2018073043A1	21 January 2016 (21-01-2016) 21 January 2016 (21-01-2016) 14 January 2016 (14-01-2016) 21 November 2017 (21-11-2017) 15 March 2018 (15-03-2018)
WO 2006/081537 A2	03 August 2006 (03-08-2006)	WO2006081537A2 WO2006081537A3 CN101137663A JP2008528036A KR20070101359A US2006183211A1 US7361483B2 US2008274478A1 US7544498B2 US2010285502A1 US8124390B2	03 August 2006 (03-08-2006) 29 March 2007 (29-03-2007) 05 March 2008 (05-03-2008) 31 July 2008 (31-07-2008) 16 October 2007 (16-10-2007) 17 August 2006 (17-08-2006) 22 April 2008 (22-04-2008) 06 November 2008 (06-11-2008) 09 June 2009 (09-06-2009) 11 November 2010 (11-11-2010) 28 February 2012 (28-02-2012)
US 2012/122180 A1	17 May 2012 (17-05-2012)	US2012122180A1 US2008233628A1	17 May 2012 (17-05-2012) 25 September 2008 (25-09-2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2018/050189

C12N 15/81 (2006.01), *C12N 9/00* (2006.01), *C12N 9/10* (2006.01)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	4 H 0 0 6
C 1 2 N 15/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/53	
C 1 2 P 7/22 (2006.01)	C 1 2 P 7/22	
C 0 7 D 311/80 (2006.01)	C 0 7 D 311/80	C S P
C 0 7 D 311/04 (2006.01)	C 0 7 D 311/04	
C 0 7 D 307/77 (2006.01)	C 0 7 D 307/77	
C 0 7 D 493/06 (2006.01)	C 0 7 D 493/06	
C 0 7 C 65/03 (2006.01)	C 0 7 C 65/03	D

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

- (72) 発明者 ショハム・ムカジー
カナダ・ケベック・H 2 X・1 Y 4・モントリオール・アヴニユ・デュ・プレジダン - ケネディ・1 4 1・ローカル・エスピー - 5 2 3 0 内
- (72) 発明者 アレクサンダー・ジェームズ・キャンベル
カナダ・ケベック・H 2 X・1 Y 4・モントリオール・アヴニユ・デュ・プレジダン - ケネディ・1 4 1・ローカル・エスピー - 5 2 3 0 内
- (72) 発明者 ザカリー・ダグラス・ウィルトシャー
カナダ・ケベック・H 2 X・1 Y 4・モントリオール・アヴニユ・デュ・プレジダン - ケネディ・1 4 1・ローカル・エスピー - 5 2 3 0 内
- (72) 発明者 ケヴィン・ジョン・チェン
カナダ・ケベック・H 2 X・1 Y 4・モントリオール・アヴニユ・デュ・プレジダン - ケネディ・1 4 1・ローカル・エスピー - 5 2 3 0 内

F ターム(参考) 4B064 AB07 AC14 AC17 AC18 CA19 CB14 CB30 CC24 DA01 DA16
4B065 AA58Y AA72X AA72Y AA79Y AA80Y AA88Y AB01 AC14 BA01 CA05
CA18 CA44 CA60
4C037 XA02
4C062 EE21 HH10
4C071 AA02 AA07 BB01 CC12 EE07 FF17 GG01 HH28 LL01
4H006 AA01 AA03 AB20 AB84 BJ50 BN30 BS30

【要約の続き】

増加させるために、ゲラニルピロリン酸の枯渇を軽減するように改変することができる。