

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-507361

(P2024-507361A)

(43)公表日 令和6年2月19日(2024.2.19)

(51)国際特許分類		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 B 0 6 4
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 5 7
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 6
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全178頁) 最終頁に続く

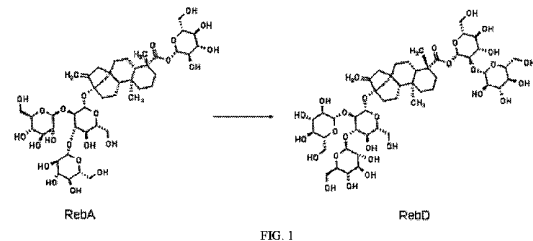
(21)出願番号	特願2023-549555(P2023-549555)	(71)出願人	513048461 アルゼダ コーポレーション アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 1 9 シアトル ソーンダイク アベニュー ダブリュー . 3 4 2 1
(86)(22)出願日	令和4年2月17日(2022.2.17)	(74)代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(85)翻訳文提出日	令和5年9月21日(2023.9.21)	(74)代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(86)国際出願番号	PCT/US2022/016820	(74)代理人	100117189 弁理士 江口 昭彦
(87)国際公開番号	WO2022/178145	(74)代理人	100134120 弁理士 内藤 和彦
(87)国際公開日	令和4年8月25日(2022.8.25)	(72)発明者	ロバーツ, カイル イウジン アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
(31)優先権主張番号	63/150,515		
(32)優先日	令和3年2月17日(2021.2.17)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レバウジオシド D を製造するための組成物及び方法

(57)【要約】

本開示は、酵素、及びそれらの酵素によって糖成分を基質ステピオール配糖体に転移する方法を提供する。特に、具体的には、設計された 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼとスクロースシンターゼをワンポット反応で使用し、ステピオシドと Reb A を Reb E と Reb D に変換する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 6 ~ 882 及び 1333 ~ 1466 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、**変換 - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼポリペプチド。**

【請求項 2】

配列番号 6 ~ 459 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の**変換 - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼポリペプチド。**

10

【請求項 3】

配列番号 460 ~ 534 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の**変換 - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼポリペプチド。**

【請求項 4】

配列番号 535 ~ 765 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の**変換 - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼポリペプチド。**

20

【請求項 5】

配列番号 766 ~ 829 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の**変換 - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼ。**

30

【請求項 6】

配列番号 1333 ~ 1466 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の**変換 - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼ。**

【請求項 7】

表 17 に示す PSSM によってスコア付けされた場合、266.7 超のスコアを有する、**変換 - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼポリペプチド。**

40

【請求項 8】

X X X X V X M X P W L X L G H X N P X L R X A X X X A X R X X X X X X X X T X
X X L X X X X X R I X X X Y X X X I X L X X X X L P X L P E L P X X X X T T N X
L P P H L N X X L X X X X X X X X P X X S K X X X X X X X X L X X X D X L X X W
X X K X A X X X X X P X X X X X T X G X A L X X Y X X X X X X X X G X X F X F X
X I X L X X X X X X X X X E X X X X X X X X X F X X X X X X X X L X X X S R
X X E A K Y X D Y X X X X X X X X V P V G X X X X X X X X X D X X D X E L X X
W L X X K X X X X X V X V S F G S E X F L S X E X X E E X A X G L X L S X X N X
I X V X R F P K G X X X X X X X X L P X G X X X R X X X R X X X X X H L V P Q A
X I L X H X X X G G F X S H C G W N S X X E X X X F G V P I I A M P M Q W D Q P

50

I N A R L X X E X G X A V E X X R X X X G X X X R X X I A X X X X X V X X X X X
 G X X L R X X V X X X X X X X X X R X X E M X X X X X X X X X L X X X X X A X
 X の配列を有するポリペプチドであって、

残基 1 は、R または D または Q または P または S または T であり、

残基 2 は、N または L または S または T であり、

残基 3 は、Q または L または F であり、

残基 4 は、R または Q または T であり、

残基 6 は、A または L または T または V であり、

残基 8 は、L または F または V であり、

残基 12 は、A または G であり、

10

残基 16 は、I または V であり、

残基 19 は、F または Y であり、

残基 22 は、I または L または V であり、

残基 24 は、R または K であり、

残基 25 は、Q または K であり、

残基 26 は、L または M であり、

残基 28 は、D または K であり、

残基 30 は、N または G であり、

残基 31 は、M または F であり、

残基 32 は、H または I または L または S または Y または V であり、

20

残基 33 は、I または V であり、

残基 34 は、H または Y であり、

残基 35 は、L または M または V であり、

残基 36 は、A または C または L または V であり、

残基 37 は、N または S であり、

残基 39 は、A または K または M または P であり、

残基 40 は、I または V であり、

残基 41 は、N または Q または V であり、

残基 43 は、N または E または K または S であり、

残基 44 は、L または M または S であり、

30

残基 45 は、A または I または L または T であり、

残基 46 は、R または K であり、

残基 47 は、G または H または K であり、

残基 50 は、P または T であり、

残基 51 は、N または E または K または Y であり、

残基 52 は、A または K であり、

残基 54 は、A または Q または L または S または V であり、

残基 55 は、N または D または Q または E または L または S であり、

残基 56 は、L または S であり、

残基 58 は、Q または E または H または I であり、

40

残基 60 は、I または V であり、

残基 61 は、E または T であり、

残基 62 は、L または S または Y または V であり、

残基 63 は、A または R または Q または H または S であり、

残基 66 は、Q または E または L であり、

残基 72 は、P または S であり、

残基 73 は、H または Y であり、

残基 74 は、L または Y であり、

残基 75 は、H または W であり、

残基 79 は、A または G であり、

50

残基 8 6 は、 G または K であり、
残基 8 7 は、 R または I または L または T または V であり、
残基 8 9 は、 R または Q または H または I または K であり、
残基 9 0 は、 R または Q または K であり、
残基 9 1 は、 A または L であり、
残基 9 2 は、 L または V であり、
残基 9 3 は、 R または Q または K であり、
残基 9 4 は、 L または M であり、
残基 9 5 は、 A または S であり、
残基 9 6 は、 A または R または Q であり、 10
残基 9 8 は、 N または E または T であり、
残基 9 9 は、 I または L または F または V であり、
残基 1 0 2 は、 Q または I または L または T または V であり、
残基 1 0 3 は、 I または L または V であり、
残基 1 0 4 は、 R または Q または E または K または S であり、
残基 1 0 5 は、 A または N または D または T であり、
残基 1 0 6 は、 I または L または W であり、
残基 1 0 7 は、 N または K であり、
残基 1 0 8 は、 A または P または S または V であり、
残基 1 0 9 は、 A または D または S または T であり、 20
残基 1 1 1 は、 I または L または V であり、
残基 1 1 2 は、 I または L または V であり、
残基 1 1 3 は、 L または F または Y または V であり、
残基 1 1 5 は、 I または L または M または F であり、
残基 1 1 7 は、 A または Q または I または L または V であり、
残基 1 1 8 は、 Q または P であり、
残基 1 2 0 は、 A または L であり、
残基 1 2 1 は、 E または S であり、
残基 1 2 3 は、 I または L または S または V であり、
残基 1 2 5 は、 N または L または K であり、 30
残基 1 2 6 は、 D または E または S であり、
残基 1 2 7 は、 R または Q または L であり、
残基 1 2 8 は、 N または G であり、
残基 1 2 9 は、 I または V であり、
残基 1 3 1 は、 A または G または S または V であり、
残基 1 3 2 は、 I または V であり、
残基 1 3 3 は、 R または K または P であり
残基 1 3 4 は、 L または F であり、
残基 1 3 5 は、 A または I または L または W であり、
残基 1 3 7 は、 F または S であり、 40
残基 1 3 9 は、 A または L または V であり、
残基 1 4 2 は、 L または F または W であり、
残基 1 4 3 は、 A または S であり、
残基 1 4 5 は、 I または L または F であり、
残基 1 4 6 は、 L または M または F または W または V であり、
残基 1 4 7 は、 N または Q または E または H であり、
残基 1 4 8 は、 H または F であり、
残基 1 4 9 は、 L または V であり、
残基 1 5 0 は、 R または D または K または T であり、
残基 1 5 1 は、 R または N または K であり、 50

残基 1 5 2 は、 L または P であり、
 残基 1 5 4 は、 N または E または H または V であり、
 残基 1 5 5 は、 E または P であり、
 残基 1 5 7 は、 L または P であり、
 残基 1 5 9 は、 E または P であり、
 残基 1 6 0 は、 A または E であり、
 残基 1 6 2 は、 R または D または E または H または K または M または S または Y であり

、
 残基 1 6 4 は、 R または S であり、
 残基 1 6 5 は、 E または K であり、 10
 残基 1 6 6 は、 R または I または L または W または Y であり、
 残基 1 6 7 は、 A または E であり、
 残基 1 6 8 は、 Q または L または K であり、
 残基 1 6 9 は、 A または D または Q または V であり、
 残基 1 7 0 は、 K または W であり、
 残基 1 7 1 は、 H または L または M であり、
 残基 1 7 2 は、 R または Y であり、
 残基 1 7 4 は、 A または L または M であり、
 残基 1 7 5 は、 M または F であり、
 残基 1 7 6 は、 E または G であり、 20
 残基 1 7 7 は、 R または K または T であり、
 残基 1 7 8 は、 A または Q または E または G または V であり、
 残基 1 7 9 は、 G または P であり、
 残基 1 8 0 は、 D または K または P または T であり、
 残基 1 8 1 は、 D または E であり、
 残基 1 8 2 は、 R または D または E または L または K であり、
 残基 1 8 3 は、 D または F であり、
 残基 1 8 5 は、 L または F であり、
 残基 1 8 6 は、 A または V であり、
 残基 1 8 7 は、 D または E または K または P または V であり、 30
 残基 1 8 8 は、 A または G または F であり、
 残基 1 8 9 は、 R または N または Q または P または S であり、
 残基 1 9 0 は、 A または N または C または K または M または S または T であり、
 残基 1 9 1 は、 A または Q または G または K であり、
 残基 1 9 2 は、 A または I または Y であり、
 残基 1 9 3 は、 I または L または M または T または V であり、
 残基 1 9 5 は、 I または M または V であり、
 残基 1 9 6 は、 C または M であり、
 残基 1 9 7 は、 S または T であり、
 残基 2 0 0 は、 A または E または I または V であり、 40
 残基 2 0 1 は、 I または L であり、
 残基 2 0 6 は、 I または L または M であり、
 残基 2 0 9 は、 C または L であり、
 残基 2 1 0 は、 A または Q または M または S または T であり、
 残基 2 1 1 は、 E または K または T であり、
 残基 2 1 2 は、 L または W であり、
 残基 2 1 3 は、 M または S または T であり、
 残基 2 1 4 は、 N または G であり、
 残基 2 1 5 は、 R または I または L または K または W または V であり、
 残基 2 1 6 は、 Q または K であり、 50

- 残基 2 1 7 は、 I または V であり、
残基 2 2 2 は、 A または P であり、
残基 2 2 3 は、 P または S または T であり、
残基 2 2 4 は、 F または Y または V であり、
残基 2 2 5 は、 Q または L であり、
残基 2 2 6 は、 D または T または V であり、
残基 2 2 7 は、 A または L または P であり、
残基 2 2 8 は、 N または L または T または V であり、
残基 2 2 9 は、 F または P または T または Y であり、
残基 2 3 0 は、 N または D または E または L または S であり、 10
残基 2 3 2 は、 A または N または D または E または I または L であり、
残基 2 3 3 は、 R または D または G または S または Y であり、
残基 2 3 5 は、 I または K または M または P または S または V あり、
残基 2 3 8 は、 I または M であり、
残基 2 3 9 は、 R または D または K であり、
残基 2 4 2 は、 D または G であり、
残基 2 4 3 は、 K または T であり、
残基 2 4 5 は、 D または P であり、
残基 2 4 6 は、 E または L または P または T であり、
残基 2 4 7 は、 N または H であり、 20
残基 2 4 8 は、 A または S であり、
残基 2 4 9 は、 T または V であり、
残基 2 5 1 は、 F または Y であり、
残基 2 5 8 は、 A または Y であり、
残基 2 6 2 は、 R または K であり、
残基 2 6 4 は、 D または Q であり、
残基 2 6 5 は、 L または M であり、
残基 2 6 8 は、 I または L または V であり、
残基 2 7 0 は、 H または F または W であり、
残基 2 7 3 は、 E または V であり、 30
残基 2 7 6 は、 N または G であり、
残基 2 7 7 は、 A または I または S または V であり、
残基 2 7 9 は、 A または F であり、
残基 2 8 1 は、 I または W であり、
残基 2 8 3 は、 A または V であり、
残基 2 8 9 は、 A または R または E または V であり、
残基 2 9 0 は、 R または E または K であり、
残基 2 9 1 は、 A または R または Q または I または L または V であり、
残基 2 9 2 は、 R または N または H または L または T であり、
残基 2 9 3 は、 A または L であり、 40
残基 2 9 4 は、 E または I であり、
残基 2 9 5 は、 D または E であり、
残基 2 9 6 は、 A または V であり、
残基 2 9 9 は、 R または K または P または S であり、
残基 3 0 1 は、 F または T であり、
残基 3 0 2 は、 L または S であり、
残基 3 0 3 は、 D または E であり、
残基 3 0 5 は、 G または I または V であり、
残基 3 0 6 は、 R または G であり、
残基 3 0 7 は、 D または E であり、 50

残基 3 0 9 は、 A または G であり、
残基 3 1 0 は、 R または M または Y であり、
残基 3 1 1 は、 W または V であり、
残基 3 1 2 は、 R または L であり、
残基 3 1 3 は、 D または P または T であり、
残基 3 2 0 は、 C または H であり、
残基 3 2 3 は、 N または K または S であり、
残基 3 2 5 は、 K または P または S であり、
残基 3 2 6 は、 A または S であり、
残基 3 2 7 は、 I または T または V であり、 10
残基 3 3 1 は、 I または M または V であり、
残基 3 3 9 は、 I または W または V であり、
残基 3 4 0 は、 L または M であり、
残基 3 4 2 は、 A または S であり、
残基 3 4 3 は、 I または L であり、
残基 3 4 4 は、 D または H または Y であり、
残基 3 6 5 は、 I または L または M または V であり、
残基 3 6 6 は、 R または N または V であり、
残基 3 6 8 は、 L または M または W であり、
残基 3 7 0 は、 I または V であり、 20
残基 3 7 4 は、 I または V であり、
残基 3 7 5 は、 R または P または S または V であり、
残基 3 7 7 は、 R または D または Q であり、
残基 3 7 8 は、 D または E であり、
残基 3 7 9 は、 N または D または E または L であり、
残基 3 8 1 は、 R または K または S であり、
残基 3 8 2 は、 I または V であり、
残基 3 8 3 は、 H または P であり、
残基 3 8 5 は、 A または N または D または E または G であり、
残基 3 8 6 は、 A または E であり、 30
残基 3 8 9 は、 R または Q または E または K であり、
残基 3 9 0 は、 C または T または V であり、
残基 3 9 1 は、 I または L または V であり、
残基 3 9 2 は、 R または K であり、
残基 3 9 3 は、 D または E または S であり、
残基 3 9 5 は、 I または M または V であり、
残基 3 9 6 は、 N または C または G または F または S または T または V であり、
残基 3 9 7 は、 E または G であり、
残基 3 9 8 は、 A または K または P であり、
残基 3 9 9 は、 I または L または T であり、 40
残基 4 0 1 は、 Q または E であり、
残基 4 0 2 は、 N または E または I または K であり、
残基 4 0 5 は、 A または R または H または K であり、
残基 4 0 6 は、 N または K であり、
残基 4 0 8 は、 A または R または K であり、
残基 4 0 9 は、 D または E であり、
残基 4 1 0 は、 I または L であり、
残基 4 1 1 は、 A または G または S であり、
残基 4 1 2 は、 A または R または E または L または K または T であり、
残基 4 1 3 は、 R または N または K であり、 50

残基 4 1 4 は、L または W であり、
 残基 4 1 5 は、R または K であり、
 残基 4 1 6 は、A または R または E または L または S であり、
 残基 4 1 7 は、A または R または I または K または T であり、
 残基 4 1 9 は、N または D または E または G または K であり、
 残基 4 2 0 は、E または P または V であり、
 残基 4 2 3 は、N または D または Q または G または T であり、
 残基 4 2 4 は、A または I または K であり、
 残基 4 2 5 は、A または L であり、
 残基 4 2 6 は、A または M または V であり、
 残基 4 2 7 は、E または L であり、
 残基 4 2 8 は、A または E であり、
 残基 4 2 9 は、L または F または Y であり、
 残基 4 3 0 は、I または L または K または M であり、
 残基 4 3 1 は、A または R または Q または L または K または S であり、
 残基 4 3 3 は、C または G または H であり、
 残基 4 3 4 は、R または Q または H または K または F または P または T または Y または
 V であり、
 残基 4 3 5 は、N または H または K であり、
 残基 4 3 6 は、R または L であり、
 残基 4 3 7 は、A または R または N または L または S であり、
 残基 4 3 9 は、A または L または K または F または S または T または Y であり、
 残基 4 4 0 は、N または K または V である（配列番号 1 2 2 8）、前記ポリペプチド。

10

20

【請求項 9】

配列番号 8 3 0 ~ 8 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 6 0 %、
 少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくと
 も 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %
 、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の改変 - 1 , 2 - グ
 リコシルトランスフェラーゼポリペプチド。

【請求項 1 0】

配列番号 8 8 6 と少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくと
 も 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %
 、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む
 、改変スクロースシンターゼポリペプチド。

30

【請求項 1 1】

配列番号 8 8 8 と少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくと
 も 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %
 、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む
 、改変スクロースシンターゼポリペプチド。

【請求項 1 2】

配列番号 8 9 0 ~ 1 2 2 7 及び 1 2 3 1 ~ 1 3 3 2 からなる群から選択されるアミノ酸
 配列と少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少
 なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくと
 も 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、改変スクロ
 ースシンターゼポリペプチド。

40

【請求項 1 3】

配列番号 8 9 0 ~ 9 2 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 6 0 %、
 少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくと
 も 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %
 、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 2 に記載の改変スクロースシ

50

ンターゼポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号 925 ~ 1180 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の改変スクロースシンターゼポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 1231 ~ 1267 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の改変スクロースシンターゼポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号 1268 ~ 1332 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の改変スクロースシンターゼポリペプチド。

【請求項 17】

表 24 に示す PSSM によってスコア付けされた場合、556 超のスコアを有する、改変スクロースシンターゼポリペプチド。

【請求項 18】

M I E X L X X X L X X X X X X X X X X L R X X X X X X R X X X X X X D L X X X
X X X F X Q E A X X X X P W X X X A X
R X R X X X W X Y X R X H X E X L X V E E X X X X E X L X X K E X L V X X X X E
G X A V X X X D X X D X X X X X Q X X K D E S T I G X G X X H L N R H L X G R X
W X D X X X G X X X X X X X L X X H X X X X X X L X L X X X X X X F D X L R X X
X Q Y L G X X P X X X P X X X X X X X X X X X G F E P G X G X T X X R X R X T X
R L L X D X L D S P S P X X L E X F L X R X P X I X X X X I X S X H G X F X Q X
X V L G X P D T G G Q V V X I L D Q X R A L E X E X R X R L X X Q G X D X E P X
I X X X T R L I P X X X G T T C D Q R L E P X X G X X X X X I L R X P F R X E X
G X X X P X W I S R F X X W P Y L E R X X X D X E X E X X A E L G X R P D X I I
G N Y S D G X L X A X X X X X K X G X T Q X N X A H A L E K X K Y X X S D L X W
X X X E X X X H F X C Q F T A D X I A M N A A D X I X T S T Y Q E I A G X D X X
V G Q Y E S X X X X T X P G L Y R X X X G X D V F D X X F N I X S P G A D X X X
Y F X Y X X X E X R X X X L X P E I E X X X X X X X X X X X R G V L X D X X K
P X X X X X X R X D R I K N X X G X X E X X G X X X R L R X L A N L X X X X G H
X D X X X S X D X E E X X X X X R X H X X X D X X X L D G Q X R X X G X X L X K
X X V G E X Y R X X A D X R G X X X Q P A L X E A F G L T V I E X M X S G L P X
X A T X X G G P X E I I E X G V S G F H I D P N X X X X X X E X X A D X X E X X
X X X P X Y W E X I S X X A L X R V X X R Y T W X X X A E R X X T X X R X X G F
W X X V X X R E X Q V X X R Y L Q M X R H L Q X R P L A H A V P X E の配列を有するポリペプチドであって、

- 残基 4 は、R または E または S または V であり、
- 残基 6 は、R または D または E であり、
- 残基 7 は、Q または E であり、
- 残基 8 は、Q または F であり、
- 残基 10 は、A または R または Q または H または L または K または S であり、
- 残基 11 は、D または Q または E または S であり、

- 残基 1 2 は、 N または H または S であり、
 残基 1 3 は、 R または P であり、
 残基 1 4 は、 R または N または D または E であり、
 残基 1 5 は、 A または D または Q または E または S または T であり、
 残基 1 6 は、 L または W または V であり、
 残基 1 7 は、 R または H または Y であり、
 残基 1 8 は、 A または R または L であり、
 残基 1 9 は、 L または F であり、
 残基 2 2 は、 R または H であり、
 残基 2 3 は、 L または Y であり、 10
 残基 2 4 は、 L または V であり、
 残基 2 5 は、 A または G であり、
 残基 2 6 は、 Q または L または S であり、
 残基 2 7 は、 Q または G であり、
 残基 2 9 は、 D または G または P または T であり、
 残基 3 0 は、 I または L または M または F または S であり、
 残基 3 1 は、 L または W であり、
 残基 3 2 は、 Q または L であり、
 残基 3 3 は、 R または H であり、
 残基 3 4 は、 H または S または T であり、 20
 残基 3 7 は、 Q または W であり、
 残基 3 8 は、 R または D または H であり、
 残基 3 9 は、 A または E であり、
 残基 4 0 は、 C または L または F であり、
 残基 4 1 は、 A または D または E または L または K であり、
 残基 4 2 は、 A または R または N または D または E または T であり、
 残基 4 4 は、 R または C または Y であり、
 残基 4 5 は、 A または E であり、
 残基 4 6 は、 Q または E または P であり、
 残基 4 7 は、 D または Q または E または P であり、 30
 残基 4 8 は、 D または G または P であり、
 残基 4 9 は、 N または E であり、
 残基 5 0 は、 E または G であり、
 残基 5 1 は、 E または S または Y であり、
 残基 5 2 は、 A または E または G または L または P であり、
 残基 5 3 は、 E または L であり、
 残基 5 4 は、 A または D または C または G または L または K または M または T であり、
 残基 5 5 は、 D または G または I または S または T であり、
 残基 5 6 は、 G または S であり、
 残基 5 7 は、 A または P または W または V であり、 40
 残基 5 8 は、 L または F であり、
 残基 5 9 は、 A または E または G であり、
 残基 6 0 は、 R または D または Q または E であり、
 残基 6 1 は、 A または L または F または V であり、
 残基 6 2 は、 I または V であり、
 残基 6 3 は、 A または R または Q または E または K であり、
 残基 6 4 は、 A または R または H または K であり、
 残基 6 5 は、 A または C または T であり、
 残基 6 9 は、 A または I または V であり、
 残基 7 0 は、 I または L または F または V であり、 50

- 残基 7 1 は、R または D または E または H または L であり、
 残基 7 2 は、A または D であり、
 残基 7 5 は、A または I または L または M または F または V であり、
 残基 7 6 は、C または Y または V であり、
 残基 7 7 は、L または F であり、
 残基 7 9 は、I または L または W または V であり、
 残基 8 1 は、E または L または P であり、
 残基 8 3 は、P または V であり、
 残基 8 4 は、A または G であり、
 残基 8 5 は、R または V であり、
 残基 8 7 は、R または E または Y であり、
 残基 8 9 は、L または Y または V であり、
 残基 9 1 は、I または F であり、
 残基 9 3 は、I または L または V であり、
 残基 9 5 は、D または Q または T であり、
 残基 9 7 は、A または D または E または T または V であり、
 残基 1 0 1 は、I または L または V であり、
 残基 1 0 2 は、D または S または T であり、
 残基 1 0 3 は、T または V であり、
 残基 1 0 4 は、D または E または S であり、
 残基 1 0 6 は、F または Y であり、
 残基 1 0 8 は、A または Q であり、
 残基 1 0 9 は、A または F であり、
 残基 1 1 2 は、R または Q または E であり、
 残基 1 1 5 は、N または D または G または K または T であり、
 残基 1 1 6 は、G または L であり、
 残基 1 1 7 は、A または N または D または E または G であり、
 残基 1 1 8 は、A または Q または G または H または P または S であり、
 残基 1 2 1 は、N または D または E または P であり、
 残基 1 2 4 は、L または T または W であり、
 残基 1 2 5 は、E または K または T であり、
 残基 1 2 6 は、I または W または V であり、
 残基 1 2 8 は、L または F または W であり、
 残基 1 2 9 は、E または G であり、
 残基 1 3 1 は、L または F であり、
 残基 1 3 2 は、R または N であり、
 残基 1 3 3 は、R または P であり、
 残基 1 3 4 は、N または E または G または H または S または T または V であり、
 残基 1 3 5 は、F または S または V であり、
 残基 1 3 7 は、R または K であり、
 残基 1 3 8 は、L または M であり、
 残基 1 4 6 は、R または N または D であり、
 残基 1 4 8 は、L または V であり、
 残基 1 4 9 は、Q または E または T であり、
 残基 1 5 6 は、A または S であり、
 残基 1 5 9 は、I または L または M であり、
 残基 1 6 1 は、Q または G または T であり、
 残基 1 6 3 は、L または T であり、
 残基 1 6 4 は、A または G または K であり、
 残基 1 6 5 は、A または R または D または Q または E または G または K であり、

10

20

30

40

50

残基 1 6 7 は、 R または D または L または M であり、
 残基 1 6 8 は、 D または Q または E または S または Y であり、
 残基 1 6 9 は、 A または R または Q または K であり、
 残基 1 7 0 は、 I または L であり、
 残基 1 7 1 は、 I または L であり、
 残基 1 7 2 は、 D または E であり、
 残基 1 7 3 は、 F または W であり、
 残基 1 7 5 は、 R または G または S であり、
 残基 1 7 6 は、 L または V であり、
 残基 1 7 8 は、 R または Q であり、 10
 残基 1 7 9 は、 H または I または L または Y であり、
 残基 1 8 0 は、 R または D であり、
 残基 1 8 1 は、 N または G であり、
 残基 1 8 2 は、 R または Q であり、
 残基 1 8 3 は、 N または Q または H であり、
 残基 1 8 5 は、 G または M であり、
 残基 1 8 7 は、 N または S であり、
 残基 1 8 8 は、 N または D または E であり、
 残基 1 8 9 は、 R または G であり、
 残基 1 9 0 は、 N または I または M または F であり、 20
 残基 1 9 1 は、 R または Q または K または T であり、
 残基 1 9 2 は、 D または S であり、
 残基 1 9 5 は、 A または E または G または S であり、
 残基 1 9 8 は、 R または Q であり、
 残基 1 9 9 は、 A または T または V であり、
 残基 2 0 0 は、 E または I または L または M または V であり、
 残基 2 0 5 は、 R または G または K または T であり、
 残基 2 0 6 は、 Q または L であり、
 残基 2 0 8 は、 A または R または D または E または P であり、
 残基 2 0 9 は、 D または E であり、 30
 残基 2 1 0 は、 A または T であり、
 残基 2 1 2 は、 L または W であり、
 残基 2 1 3 は、 A または E または S であり、
 残基 2 1 4 は、 D または E であり、
 残基 2 1 5 は、 L または F または V であり、
 残基 2 1 6 は、 A または R または Q または E または G であり、
 残基 2 1 7 は、 E または H または P であり、
 残基 2 1 8 は、 A または R または D または E または K または T であり、
 残基 2 1 9 は、 L または M であり、
 残基 2 2 0 は、 R または Q であり、 40
 残基 2 2 1 は、 R または E であり、
 残基 2 2 2 は、 R または L または M または W であり、
 残基 2 2 8 は、 L または W であり、
 残基 2 3 0 は、 R または N または D であり、
 残基 2 3 2 は、 A または V であり、
 残基 2 3 3 は、 A または Q または E または G であり、
 残基 2 3 5 は、 I または M または V であり、
 残基 2 3 7 は、 D または E であり、
 残基 2 3 9 は、 L または M であり、
 残基 2 4 3 は、 M または V であり、 50

残基 2 4 5 は、 I または L であり、
 残基 2 5 2 は、 A または R または E または G または S であり、
 残基 2 5 3 は、 A または N または T であり、
 残基 2 5 6 は、 R または E または K または S または T であり、
 残基 2 5 9 は、 A または D または G であり、
 残基 2 6 1 は、 I または V であり、
 残基 2 6 3 は、 L または M であり、
 残基 2 6 5 は、 F または S であり、
 残基 2 6 6 は、 N または S であり、
 残基 2 6 7 は、 I または L または V であり、 10
 残基 2 6 8 は、 A または I または L または T または V であり、
 残基 2 7 0 は、 I または L または V であり、
 残基 2 7 2 は、 I または P または V であり、
 残基 2 7 5 は、 W または Y であり、
 残基 2 7 7 は、 A または G であり、
 残基 2 7 9 は、 A または D または S であり、
 残基 2 8 0 は、 N または K であり、
 残基 2 8 4 は、 R または L または Y であり、
 残基 2 9 3 は、 F または W または Y であり、
 残基 2 9 8 は、 A または V であり、 20
 残基 3 0 3 は、 R または K であり、
 残基 3 0 5 は、 I または L または M であり、
 残基 3 0 7 は、 R または N または D または Q または E または K であり、
 残基 3 1 0 は、 A または R または H または Y であり、
 残基 3 1 1 は、 Q または E であり、
 残基 3 1 4 は、 L または V であり、
 残基 3 1 6 は、 I または V であり、
 残基 3 1 9 は、 R または Q であり、
 残基 3 2 1 は、 I または L であり、
 残基 3 2 2 は、 I または V であり、 30
 残基 3 2 3 は、 A または I または L または V であり、
 残基 3 2 9 は、 D または E であり、
 残基 3 3 0 は、 A または S であり、
 残基 3 3 1 は、 R または D または E または G または K であり、
 残基 3 4 2 は、 I または V であり、
 残基 3 4 3 は、 H または S または V であり、
 残基 3 4 5 は、 A または T であり、
 残基 3 4 6 は、 R または E であり、
 残基 3 4 7 は、 N または H または Y であり、
 残基 3 4 8 は、 A または V であり、 40
 残基 3 4 9 は、 R または Q または H または W であり、
 残基 3 5 3 は、 I または V であり、
 残基 3 5 7 は、 N または Y であり、
 残基 3 5 9 は、 D または S であり、
 残基 3 6 1 は、 R または N または E または T であり、
 残基 3 6 2 は、 I または V であり、
 残基 3 6 3 は、 H または I または L または V であり、
 残基 3 6 5 は、 Q または H であり、
 残基 3 7 1 は、 R または E または K であり、
 残基 3 7 2 は、 I または V であり、 50

残基 379 は、 F または W または Y であり、
 残基 380 は、 A または V であり、
 残基 381 は、 R または Q または E または L または S であり、
 残基 383 は、 A または L または V であり、
 残基 385 は、 R または K であり、
 残基 387 は、 I または L または V であり、
 残基 388 は、 L または K であり、
 残基 393 は、 G または S であり、
 残基 397 は、 A または L または V であり、
 残基 406 は、 N または G であり、 10
 残基 408 は、 I または V であり、
 残基 410 は、 S または T であり、
 残基 411 は、 I または L であり、
 残基 412 は、 I または L または M であり、
 残基 413 は、 A または S であり、
 残基 414 は、 Q または E であり、
 残基 416 は、 L または W であり、
 残基 418 は、 I または V であり、
 残基 421 は、 C または I または M または T または V であり、
 残基 423 は、 I または F であり、 20
 残基 430 は、 S または T であり、
 残基 433 は、 L または P であり、
 残基 434 は、 D または G または Y であり、
 残基 438 は、 H または Y であり、
 残基 440 は、 R または K または P であり
 残基 441 は、 R または D または L または K であり、
 残基 442 は、 N または H または F または Y であり、
 残基 444 は、 A または D または Q または E または P であり、
 残基 445 は、 D または Q または K であり、
 残基 446 は、 H または Y であり、 30
 残基 449 は、 A または S であり、
 残基 456 は、 L または W であり、
 残基 464 は、 A または I または F または V であり、
 残基 466 は、 I または V であり、
 残基 476 は、 N または T であり、
 残基 478 は、 R または N または D または H であり、
 残基 479 は、 E または S であり、
 残基 486 は、 H または Y であり、
 残基 487 は、 A または Q または G または S または T であり、
 残基 488 は、 A または D または H または S であり、 40
 残基 489 は、 F または Y であり、
 残基 491 は、 L または M であり、
 残基 497 は、 I または V であり、
 残基 498 は、 E または I または V であり、
 残基 499 は、 N または H であり、
 残基 501 は、 I または V であり、
 残基 506 は、 P または S であり、
 残基 507 は、 R または K であり、
 残基 511 は、 I または V であり、
 残基 517 は、 A または P であり、 50

残基 5 1 8 は、 R または D または E または S であり、
 残基 5 1 9 は、 I または T または V であり、
 残基 5 2 2 は、 P または S であり、
 残基 5 2 4 は、 A または S または T であり、
 残基 5 2 5 は、 R または D または E であり、
 残基 5 2 6 は、 H または K または T であり、
 残基 5 2 8 は、 R または E または K であり、
 残基 5 3 0 は、 L または F であり、
 残基 5 3 1 は、 S または T であり、
 残基 5 3 2 は、 G または S であり、 10
 残基 5 3 4 は、 H または W であり、
 残基 5 3 9 は、 R または E または K または S であり、
 残基 5 4 0 は、 I または L または M であり、
 残基 5 4 1 は、 I または L または W または V であり、
 残基 5 4 2 は、 F または Y であり、
 残基 5 4 3 は、 G または S であり、
 残基 5 4 4 は、 R または D または G または P であり、
 残基 5 4 5 は、 D または E または P であり、
 残基 5 4 6 は、 D または Q または E または P または T であり、
 残基 5 4 7 は、 R または G であり、 20
 残基 5 4 8 は、 A または G または P であり、
 残基 5 4 9 は、 D または E または P であり、
 残基 5 5 0 は、 A または H または I であり、
 残基 5 5 5 は、 A または E または K または S であり、
 残基 5 5 7 は、 R または P であり、
 残基 5 5 8 は、 D または Q または S であり、
 残基 5 6 1 は、 I または L または V であり、
 残基 5 6 2 は、 I または L であり、
 残基 5 6 3 は、 L または F であり、
 残基 5 6 4 は、 S または T であり、 30
 残基 5 6 5 は、 I または M または V であり、
 残基 5 6 6 は、 A または M または S であり、
 残基 5 6 8 は、 L または M であり、
 残基 5 7 4 は、 Q または I または L または M であり、
 残基 5 7 5 は、 S または T であり、
 残基 5 7 7 は、 L または W であり、
 残基 5 7 8 は、 A または L または M または V であり、
 残基 5 8 0 は、 I または L または W であり、
 残基 5 8 1 は、 F または Y または V であり、
 残基 5 8 3 は、 A または R であり、 40
 残基 5 8 4 は、 N または S であり、
 残基 5 8 5 は、 A または N または E または P または S であり、
 残基 5 8 9 は、 E または S であり、
 残基 5 9 4 は、 I または L または V であり、
 残基 5 9 5 は、 I または L または V であり、
 残基 5 9 6 は、 I または V であり、
 残基 5 9 7 は、 A または G であり、
 残基 6 0 0 は、 I または V であり、
 残基 6 0 2 は、 A または P または V であり、
 残基 6 0 3 は、 A または N または Q または E または G または S であり、 50

残基 6 0 4 は、 A または R または N または Q または E または K であり、
 残基 6 0 6 は、 A または R または N または D または G または M または S または T であり、
 残基 6 0 8 は、 A または R または E または G または H または S であり、
 残基 6 1 1 は、 R または Q であり、
 残基 6 1 2 は、 A または E であり、
 残基 6 1 3 は、 Q または E であり、
 残基 6 1 4 は、 I または M または V であり、
 残基 6 1 5 は、 A または R または Q または E または G または K であり、
 残基 6 1 7 は、 I または L または M であり、 10
 残基 6 1 9 は、 Q または E であり、
 残基 6 2 0 は、 I または L であり、
 残基 6 2 1 は、 I または L または M であり、
 残基 6 2 3 は、 R または E または H または K であり、
 残基 6 2 4 は、 H または Y であり、
 残基 6 2 5 は、 N または Q または G であり、
 残基 6 3 0 は、 A または M または F または V であり、
 残基 6 3 2 は、 L または W であり、
 残基 6 3 3 は、 I または L または V であり、
 残基 6 3 5 は、 A または L または S または V であり、 20
 残基 6 3 6 は、 Q または H であり、
 残基 6 3 8 は、 N または D または E であり、
 残基 6 4 0 は、 R または N または T または V であり、
 残基 6 4 1 は、 R または L または W または V であり、
 残基 6 4 5 は、 I または L であり、
 残基 6 4 8 は、 W または Y または V であり、
 残基 6 4 9 は、 I または L または V であり、
 残基 6 5 2 は、 R または Q または G または H または K または T であり、
 残基 6 5 5 は、 A または I または V であり、
 残基 6 5 6 は、 F または W または V であり、 30
 残基 6 5 7 は、 I または V であり、
 残基 6 6 2 は、 F または Y であり、
 残基 6 7 2 は、 A または V であり、
 残基 6 7 4 は、 A または S または T であり、
 残基 6 7 9 は、 T または V であり、
 残基 6 8 0 は、 F または W であり、
 残基 6 8 3 は、 R または C であり、
 残基 6 8 4 は、 H または Y であり、
 残基 6 8 8 は、 A または L であり、
 残基 6 9 3 は、 D または H であり、 40
 残基 7 0 4 は、 D または Q または H であり、
 残基 7 0 5 は、 G または P であり、
 残基 7 0 6 は、 D または E であり、
 残基 7 0 7 は、 A または Q または E であり、
 残基 7 0 8 は、 A または T または V であり、
 残基 7 0 9 は、 A または L であり、
 残基 7 1 1 は、 R または I または L または K であり、
 残基 7 1 2 は、 I または L または M であり、
 残基 7 1 5 は、 F または W であり、
 残基 7 1 6 は、 L または F であり、 50

- 残基 7 1 8 は、 A または R または H または K であり、
- 残基 7 1 9 は、 A または C であり、
- 残基 7 2 0 は、 A または R または K であり、
- 残基 7 2 1 は、 A または N または E であり、
- 残基 7 2 2 は、 R または N または D または E であり、
- 残基 7 2 4 は、 D または G または K または S または T であり、
- 残基 7 2 8 は、 R または E または K であり、
- 残基 7 3 1 は、 R または D または Q であり、
- 残基 7 3 2 は、 A または G であり、
- 残基 7 3 5 は、 A または Q または E または K であり、
- 残基 7 3 8 は、 R または E または S または Y であり、
- 残基 7 3 9 は、 A または E または S であり、
- 残基 7 4 4 は、 E または K であり、
- 残基 7 4 5 は、 R または L であり、
- 残基 7 4 6 は、 W または Y であり、
- 残基 7 5 0 は、 L または M または W であり、
- 残基 7 5 1 は、 A または L または M であり、
- 残基 7 5 3 は、 I または L であり、
- 残基 7 5 4 は、 A または I または L または M または S または V であり、
- 残基 7 5 6 は、 A または C または I または V であり、
- 残基 7 5 7 は、 A または I または M または F または W または Y であり、
- 残基 7 6 1 は、 R または K であり、
- 残基 7 6 2 は、 F または Y であり、
- 残基 7 6 4 は、 L または S または T であり、
- 残基 7 6 5 は、 N または K または S であり、
- 残基 7 6 8 は、 R または H または S であり、
- 残基 7 7 1 は、 M または T であり、
- 残基 7 7 2 は、 R または E であり、
- 残基 7 7 8 は、 I または F であり、
- 残基 7 8 3 は、 F または W または Y であり、
- 残基 7 9 2 は、 L または M である (配列番号 1 2 2 9)、前記ポリペプチド。

10

20

30

【請求項 19】

配列番号 1 1 8 1 ~ 1 2 2 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 2 に記載の改変スクロースシンターゼポリペプチド。

【請求項 20】

表 2 8 に示す P S S M によってスコア付けされた場合、5 6 9 . 5 超のスコアを有する、改変スクロースシンターゼポリペプチド。

40

【請求項 21】

M T X X L L X X X X X S X X X X X L X Q F X R X L X X X X K X Y X L R N X I L
X A F X X Y C X X X X X P X X X X X S X L X K L X X Y T Q E I I X D X E X L X
W I X R P X I A X Q E V X R L X V X D X T X X P X T I X E L L D X R D R L V N X
Y H P N X G D X X E X D X X P X Y D Y X P X I R D X K N I G X G V E F L N R X X
S S K X F Q D P R Q X Q X X X X X X X X H X Y N G X Q L X X N X R I R X P X X
L X E Q X K Q X L X X L S D X X X X X X X X E X R F E L Q X L G X E P G X G X T
X A R V R X T L E X X X Q X X D S P D H Q V X E A X X S R I P M X F R X X X X S
X H G W F G Q E X V L G R P D T G G Q V V X I L D Q X X X L E X Q X X E D X X X
A G L X X L E X X P K I X X X T R L I P N X E G T X C N X R L E K X Y G T X X A

50

W I L R X P F R E F N P K V T Q N W I X R F E I W P Y L E T X X X D X E X E X X
A E X X X X P D X I I G N Y S D G N L X A F L L X R R X K X T Q X N X A H A L E
K X K Y L F S X L Y W Q D L E D K Y H F S X Q F T A D L I X M N A A X X I X S S
T Y Q E I V G T P D S I G Q Y E S Y Q S F T M P X L Y X X V N G X E L F X P K F
N V X P P G X N E X V Y F P Y X X X X X R X E X X X X R L E E L L F T L E D P X
X I X G X X X X X X K R X X F S M X R X D R I K N X T G L X E X X G X X X X L Q
E X C N L X X V A G X X X X X X S X D X E E X X E I E K X X Q X X X X Y X L X G
K X R X L G I R L P K X D S G E X Y R X X A D X X G X F X Q P A L F E A F G L T
I L E X M I X G L P T F X T X F G G P L E I I Q X X X N G F X I N P T X L E E X
A X X X X X F X X X C X X D P X X W X X X S X X X I X R V X X X Y T W K I X X X
X X X X L X X I X G X W N X X S Q E N R E D X X R Y X E A X X H L L X K P R A Q
X L L A E H L Q R の配列を有するポリペプチドであって、

10

- 残基 3 は、 A または C または S であり、
- 残基 4 は、 D または E または V であり、
- 残基 7 は、 E または K であり、
- 残基 8 は、 A または S であり、
- 残基 9 は、 M または V であり、
- 残基 10 は、 I または L または W または V であり、
- 残基 11 は、 N または D または E であり、
- 残基 13 は、 D または E であり、
- 残基 14 は、 E または H であり、
- 残基 15 は、 R または K であり、
- 残基 16 は、 A または N または E または T であり、
- 残基 17 は、 A または D または E であり、
- 残基 19 は、 R または H であり、
- 残基 22 は、 I または L または F または S であり、
- 残基 24 は、 Q または I または L または Y であり、
- 残基 26 は、 R または D または Q であり、
- 残基 27 は、 A または R または D または L または T であり、
- 残基 28 は、 N または Q または G または K または S であり、
- 残基 29 は、 E または G であり、
- 残基 31 は、 R または G であり、
- 残基 33 は、 L または F であり、
- 残基 37 は、 D または E であり、
- 残基 40 は、 N または D または Q または G であり、
- 残基 43 は、 A または D または E または H であり、
- 残基 44 は、 D または E であり、
- 残基 47 は、 R または H であり、
- 残基 48 は、 A または N または D であり、
- 残基 49 は、 Q または L または K であり、
- 残基 50 は、 D または Q または E または G であり、
- 残基 51 は、 R または K であり、
- 残基 53 は、 A または E または V であり、
- 残基 54 は、 P または Y であり、
- 残基 55 は、 F または P または T であり、
- 残基 56 は、 P または Y であり、
- 残基 57 は、 D または H または L または S であり、
- 残基 58 は、 N または E または S であり、
- 残基 60 は、 R または G または S であり、
- 残基 62 は、 A または S または W であり、

20

30

40

50

残基 6 5 は、 I または V であり、
 残基 6 6 は、 R または H または F または Y であり、
 残基 7 3 は、 I または F または V であり、
 残基 7 5 は、 N または D または E であり、
 残基 7 7 は、 S または W であり、
 残基 7 9 は、 C または W であり、
 残基 8 2 は、 I または V であり、
 残基 8 5 は、 R または Q または K であり、
 残基 8 8 は、 R または Q であり、
 残基 9 2 は、 C または W または Y または V であり、 10
 残基 9 5 は、 H または L であり、
 残基 9 7 は、 D または E であり、
 残基 9 9 は、 L または M であり、
 残基 1 0 1 は、 I または F または V であり、
 残基 1 0 2 は、 E または V であり、
 残基 1 0 4 は、 I または M であり、
 残基 1 0 7 は、 Q または P であり、
 残基 1 1 2 は、 A または L または F であり、
 残基 1 1 9 は、 R または H であり、
 残基 1 2 4 は、 D または E であり、 20
 残基 1 2 7 は、 L または V であり、
 残基 1 2 8 は、 L または F または W であり、
 残基 1 3 0 は、 I または L であり、
 残基 1 3 2 は、 M または W または V であり、
 残基 1 3 3 は、 R または Q または E であり、
 残基 1 3 5 は、 L または F であり、
 残基 1 3 9 は、 F または S であり、
 残基 1 4 1 は、 H または I または K または V であり、
 残基 1 4 5 は、 A または P であり、
 残基 1 5 0 は、 R または K であり、 30
 残基 1 5 8 は、 F または Y であり、
 残基 1 5 9 は、 I または L または M であり、
 残基 1 6 3 は、 A または L であり、
 残基 1 7 0 は、 G または W であり、
 残基 1 7 2 は、 Q または E であり、
 残基 1 7 3 は、 A または R または N または L または K または T であり、
 残基 1 7 4 は、 L または F であり、
 残基 1 7 5 は、 I または L または F であり、
 残基 1 7 6 は、 N または D または Q であり、
 残基 1 7 7 は、 F または W であり、 40
 残基 1 7 8 は、 L または M であり、
 残基 1 7 9 は、 R または Q であり、
 残基 1 8 0 は、 I または V であり、
 残基 1 8 2 は、 R または Q であり、
 残基 1 8 6 は、 Q または I または Y であり、
 残基 1 8 9 は、 G または L であり、
 残基 1 9 0 は、 I または W または V であり、
 残基 1 9 2 は、 D または E であり、
 残基 1 9 6 は、 N または S であり、
 残基 1 9 8 は、 Q または P であり、 50

残基 199 は、 Q または H であり、
 残基 201 は、 A または L または M または S であり、
 残基 204 は、 I または V であり、
 残基 207 は、 A または L であり、
 残基 209 は、 K または V であり、
 残基 210 は、 A または I または F または T または W または Y または V であり、
 残基 214 は、 R または Q であり、
 残基 215 は、 A または P であり、
 残基 216 は、 P または S であり、
 残基 217 は、 A または D または T であり、 10
 残基 218 は、 A または E であり、
 残基 219 は、 A または P であり、
 残基 220 は、 F または W または Y であり、
 残基 221 は、 Q または E または S であり、
 残基 223 は、 I または F であり、
 残基 229 は、 N または E であり、
 残基 232 は、 F または W であり、
 残基 236 は、 L または W であり、
 残基 238 は、 R または N または K であり、
 残基 240 は、 A または V であり、 20
 残基 245 は、 D または E であり、
 残基 249 は、 I または L であり、
 残基 250 は、 I または L または M または W であり、
 残基 251 は、 A または D または L であり、
 残基 253 は、 A または L または V であり、
 残基 254 は、 A または I または L または M であり、
 残基 262 は、 L または W であり、
 残基 265 は、 L または F または W であり、
 残基 266 は、 L または F または V であり、
 残基 272 は、 I または L であり、 30
 残基 275 は、 I または V であり、
 残基 276 は、 A または I または L または V であり、
 残基 277 は、 I または L であり、
 残基 278 は、 I または V であり、
 残基 280 は、 A または I または M または P または V であり、
 残基 288 は、 N または G であり、
 残基 301 は、 I または L または W または Y であり、
 残基 306 は、 A または V であり、
 残基 307 は、 R または Q または K であり、
 残基 308 は、 A または N または S であり、 40
 残基 311 は、 R または K であり、
 残基 313 は、 I または L または M であり、
 残基 314 は、 R または Q であり、
 残基 317 は、 I または L であり、
 残基 318 は、 Q または E または K であり、
 残基 319 は、 E または L であり、
 残基 323 は、 D または E または G であり、
 残基 324 は、 W または V であり、
 残基 327 は、 A または I であり、
 残基 328 は、 R または Q であり、 50

残基 3 3 2 は、 I または L または V であり、
残基 3 3 3 は、 I または V であり、
残基 3 3 4 は、 A または I または L であり、
残基 3 4 1 は、 A または C または S であり、
残基 3 4 5 は、 R または L または T であり、
残基 3 4 8 は、 Q または E であり、
残基 3 5 3 は、 I または V であり、
残基 3 5 7 は、 N または D または E であり、
残基 3 5 8 は、 N または D または H であり、
残基 3 6 4 は、 I または V であり、
残基 3 7 9 は、 S または T であり、
残基 3 9 0 は、 A または F または W であり、
残基 3 9 1 は、 A または T または V であり、
残基 3 9 2 は、 I または L であり、
残基 3 9 4 は、 A または I または L または V であり、
残基 3 9 6 は、 R または K または T であり、
残基 3 9 8 は、 A または I または L または V であり、
残基 3 9 9 は、 R または L であり、
残基 4 0 2 は、 L または M または F であり、
残基 4 0 3 は、 Q または G であり、
残基 4 0 4 は、 G または H であり、
残基 4 0 5 は、 R または H または V であり、
残基 4 0 8 は、 L または V であり、
残基 4 1 9 は、 I または V であり、
残基 4 2 4 は、 A または S であり、
残基 4 2 7 は、 L または M または W であり、
残基 4 2 9 は、 I または V であり、
残基 4 3 2 は、 C または I または L または V であり、
残基 4 3 4 は、 I または M であり、
残基 4 4 1 は、 S または T であり、
残基 4 4 7 は、 N または D であり、
残基 4 6 1 は、 L または M であり、
残基 4 6 9 は、 A または T であり、
残基 4 7 4 は、 N または D であり、
残基 4 7 5 は、 A または F であり、
残基 4 7 7 は、 I または V であり、
残基 5 0 4 は、 D または E であり、
残基 5 0 7 は、 R または H であり、
残基 5 0 8 は、 I または V であり、
残基 5 1 2 は、 I または L であり、
残基 5 1 6 は、 H または S であり、
残基 5 2 2 は、 I または V であり、
残基 5 2 6 は、 A または V であり、
残基 5 2 9 は、 N または Q または E であり、
残基 5 3 5 は、 T または Y であり、
残基 5 3 6 は、 R または E または H であり、
残基 5 3 7 は、 R または N または Q または K または T または Y であり、
残基 5 3 8 は、 Q または E または T であり、
残基 5 3 9 は、 R または N または D または E または K であり、
残基 5 4 1 は、 L または V であり、

10

20

30

40

50

残基 5 4 3 は、 N または G または S であり、
 残基 5 4 4 は、 D または E であり、
 残基 5 4 5 は、 A または R であり、
 残基 5 4 6 は、 Q または E であり、
 残基 5 5 9 は、 Q または E または S であり、
 残基 5 6 0 は、 Q または E であり、
 残基 5 6 2 は、 F または Y または V であり、
 残基 5 6 4 は、 N または H または K または Y であり、
 残基 5 6 5 は、 I または L であり、
 残基 5 6 6 は、 D または E または S であり、 10
 残基 5 6 7 は、 A または N または D または H であり、
 残基 5 6 8 は、 Q または L または P であり、
 残基 5 6 9 は、 N または Q または E または H または K または S であり、
 残基 5 7 2 は、 M または P であり、
 残基 5 7 3 は、 I または L であり、
 残基 5 7 7 は、 A または S であり、
 残基 5 7 9 は、 A または L であり、
 残基 5 8 5 は、 Q または I または L であり、
 残基 5 8 9 は、 A または L または M であり、
 残基 5 9 1 は、 A または C または L であり、 20
 残基 5 9 2 は、 F または Y または V であり、
 残基 5 9 4 は、 R または K であり、
 残基 5 9 5 は、 N または S であり、
 残基 5 9 6 は、 Q または K または P であり、
 残基 5 9 7 は、 A または E または K であり、
 残基 6 0 1 は、 R または Q または H または K であり、
 残基 6 0 5 は、 I または V であり、
 残基 6 0 6 は、 I または L または V であり、
 残基 6 1 0 は、 K または Y であり、
 残基 6 1 1 は、 A または L または V であり、 30
 残基 6 1 2 は、 R または D であり、
 残基 6 1 3 は、 P または T または V であり、
 残基 6 1 4 は、 A または E であり、
 残基 6 1 5 は、 D または G であり、
 残基 6 1 7 は、 S または T であり、
 残基 6 1 9 は、 R または S または Y であり、
 残基 6 2 2 は、 R または I または K であり、
 残基 6 2 3 は、 A または D であり、
 残基 6 2 8 は、 I または L または M であり、
 残基 6 2 9 は、 H または Y であり、 40
 残基 6 3 1 は、 I または L であり、
 残基 6 3 2 は、 I または M または V であり、
 残基 6 3 3 は、 D または E または H または K であり、
 残基 6 3 4 は、 Q または E であり、
 残基 6 3 6 は、 N または Q であり、
 残基 6 3 8 は、 N または Q または H または K または S であり、
 残基 6 4 1 は、 A または I または V であり、
 残基 6 4 3 は、 L または F または W であり、
 残基 6 5 1 は、 A または N または G または I であり、
 残基 6 5 6 は、 I または V であり、 50

残基 6 5 9 は、 I または V であり、
 残基 6 6 0 は、 I または V であり、
 残基 6 6 3 は、 R または H であり、
 残基 6 6 4 は、 Q または G であり、
 残基 6 6 6 は、 A または I または V であり、
 残基 6 6 8 は、 A または V であり、
 残基 6 8 3 は、 A または S であり、
 残基 6 8 6 は、 S または T であり、
 残基 6 9 2 は、 A または G であり、
 残基 6 9 4 は、 R または Q であり、 10
 残基 7 0 4 は、 N または D または H であり、
 残基 7 0 5 は、 Q または G であり、
 残基 7 0 6 は、 K または V であり、
 残基 7 1 0 は、 H または Y であり、
 残基 7 1 5 は、 D または H であり、
 残基 7 1 9 は、 M または T であり、
 残基 7 2 1 は、 E または K であり、
 残基 7 2 2 は、 A または K または T であり、
 残基 7 2 3 は、 I または L であり、
 残基 7 2 4 は、 L または M または F または V であり、 20
 残基 7 2 5 は、 R または K であり、
 残基 7 2 7 は、 I または L または F であり、
 残基 7 2 8 は、 A または E であり、
 残基 7 2 9 は、 A または R または Q または H または K であり、
 残基 7 3 1 は、 N または D であり、
 残基 7 3 2 は、 R または Q または H または K であり、
 残基 7 3 5 は、 N または Q または E であり、
 残基 7 3 6 は、 Q または E または H または Y であり、
 残基 7 3 8 は、 Q または E または Y であり、
 残基 7 3 9 は、 R または E であり、 30
 残基 7 4 0 は、 I または L であり、
 残基 7 4 2 は、 Q または E または K であり、
 残基 7 4 3 は、 A または R または K であり、
 残基 7 4 4 は、 A または G または S であり、
 残基 7 4 6 は、 D または Q または E であり、
 残基 7 4 9 は、 R または Y であり、
 残基 7 5 0 は、 E または S であり、
 残基 7 5 1 は、 N または K または T であり、
 残基 7 5 7 は、 H または F または W または Y であり、
 残基 7 5 8 は、 A または C または T であり、 40
 残基 7 5 9 は、 E または K または S または T であり、
 残基 7 6 0 は、 R または K であり、
 残基 7 6 1 は、 I または L または M または W であり、
 残基 7 6 2 は、 L または M であり、
 残基 7 6 3 は、 S または T であり、
 残基 7 6 5 は、 A または I または S または V であり、
 残基 7 6 6 は、 R または K であり、
 残基 7 6 8 は、 M または Y であり、
 残基 7 7 0 は、 L または F であり、
 残基 7 7 3 は、 F または Y であり、 50

残基 774 は、I または M または S または T または V であり、
 残基 782 は、L または M であり、
 残基 783 は、L または M または W であり、
 残基 786 は、I または L または M であり、
 残基 789 は、I または L または M であり、
 残基 790 は、F または Y であり、
 残基 794 は、F または Y であり、
 残基 800 は、A または R または Q または K である（配列番号 1230）、前記ポリペプチド。

【請求項 22】

糖成分を基質ステピオール配糖体に転移する方法であって、B12GT 及びスクロースシンターゼを 1 つ以上のステピオール配糖体、非 UDPヌクレオチドニリン酸、及びスクロースと接触させることを含む、前記方法。

【請求項 23】

前記 B12GT ポリペプチドは、配列番号 1 ~ 882 及び 1333 ~ 1466 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む改変 B12GT である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 Susy ポリペプチドは、配列番号 883 ~ 1227 及び 1231 ~ 1332 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む改変スクロースシンターゼである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

(a) 前記 B12GT ポリペプチドは、配列番号 1 ~ 882 及び 1333 ~ 1466 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む改変 B12GT であり、及び

(b) 前記 Susy ポリペプチドは、配列番号 883 ~ 1227 及び 1231 ~ 1332 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む改変スクロースシンターゼである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 B12GT ポリペプチドは、表 17 に示す PSSM によってスコア付けされた場合、266.7 超のスコアを有する改変 B12GT である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 Susy ポリペプチドは、表 24 に示す PSSM によってスコア付けされた場合、556 超のスコアを有する改変スクロースシンターゼである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 Susy ポリペプチドは、表 28 に示す PSSM によってスコア付けされた場合、194.5 超のスコアを有する改変スクロースシンターゼである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 29】

(a) 前記 B12GT ポリペプチドは、表 17 に示す PSSM によってスコア付けされた場合、266.7 超のスコアを有する改変 B12GT であり、及び

(b) 前記 Susy ポリペプチドは、表 28 に示す PSSM によってスコア付けされた

10

20

30

40

50

場合、194.5超のスコアを有する改変スクロースシターゼである、請求項22に記載の方法。

【請求項30】

(a)前記B12GTポリペプチドは、表17に示すPSSMによってスコア付けされた場合、266.7超のスコアを有する改変B12GTであり、及び

(b)前記Susyポリペプチドは、表24に示すPSSMによってスコア付けされた場合、556超のスコアを有する改変スクロースシターゼである、請求項22に記載の方法。

【請求項31】

前記基質ステピオール配糖体は、ステピオール、ステピオール-13-O-グルコシド、ステピオール-19-O-グルコシド、ルブソシド、ステピオール-1,2-ピオシド、ステピオール-1,3-ピオシド、ルブソシド、ダルコシドB、ダルコシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドG、ステピオシド、レバウジオシドC、レバウジオシドF、レバウジオシドA、レバウジオシドI、レバウジオシドE、レバウジオシドH、レバウジオシドL、レバウジオシドK、レバウジオシドJ、レバウジオシドM、レバウジオシドD、レバウジオシドN、レバウジオシドO、レバウジオシドQ、それらの異性体、合成ステピオール配糖体、またはそれらの組み合わせである、請求項22~30のいずれかに記載の方法。

10

【請求項32】

前記基質ステピオール配糖体は、ステピオシドとレバウジオシドAとの混合物である、請求項22~30のいずれかに記載の方法。

20

【請求項33】

標的ステピオール配糖体は、ステピオール、ステピオール-13-O-グルコシド、ステピオール-19-O-グルコシド、ルブソシド、ステピオール-1,2-ピオシド、ステピオール-1,3-ピオシド、ルブソシド、ダルコシドB、ダルコシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドG、ステピオシド、レバウジオシドC、レバウジオシドF、レバウジオシドA、レバウジオシドI、レバウジオシドE、レバウジオシドH、レバウジオシドL、レバウジオシドK、レバウジオシドJ、レバウジオシドM、レバウジオシドD、レバウジオシドN、レバウジオシドO、レバウジオシドQ、それらの異性体、合成ステピオール配糖体、またはそれらの組み合わせである、請求項22~32のいずれかに記載の方法。

30

【請求項34】

前記標的ステピオール配糖体は、レバウジオシドEとレバウジオシドDとの混合物である、請求項22~32のいずれかに記載の方法。

【請求項35】

前記標的ステピオール配糖体は、レバウジオシドDである、請求項22~32のいずれかに記載の方法。

【請求項36】

前記標的ステピオール配糖体は、レバウジオシドEである、請求項22~32のいずれかに記載の方法。

40

【請求項37】

前記非UDPヌクレオチド二リン酸は、ADP、GDP、CDP、またはTDPである、請求項22~36のいずれかに記載の方法。

【請求項38】

前記非UDPヌクレオチド二リン酸は、ADPである、請求項22~37のいずれかに記載の方法。

【請求項39】

請求項1~18のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項40】

請求項36に記載のポリヌクレオチドを異種発現する宿主微生物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2021年2月17日に出願された米国仮特許出願第63/150,515号の利益を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の組み込み

本明細書と共に電子的に提出されるテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。配列表のコンピュータ可読形式のコピー（ファイル名：ARZE__034__01WO__SeqList__ST25.txt、データ記録日：2022年2月17日、ファイルサイズ約6.84メガバイト）。

【0003】

本開示は、ステビオール配糖体を産生するための酵素及び生体触媒プロセスに関する。本開示は、特に、ADP-グルコース糖供与体からステビオール配糖体にグルコース成分を転移できるグリコシルトランスフェラーゼの使用に関する。

【背景技術】

【0004】

砂糖の過剰摂取は、糖尿病及び心臓病などの世界的な健康伝染病に関連する。医療システムでは、それらの病気の治療に関連して法外な費用がかかる。食品に添加された砂糖の代わりに、低カロリーで高甘味度の甘味料を使用することは、健康と経済に大きな影響を与える。

【0005】

*Stevia rebaudiana*は、その甘い葉を目的として広く栽培されており、伝統的に甘味料として使用される。*Stevia*抽出物は、砂糖の200~300倍甘く、高強度甘味料として商業的に使用される。*Stevia*の葉の主な配糖体成分は、ステビオシド及びレバウジオシドである。その葉には、10種類以上の異なるステビオール配糖体がかかりの量で存在する。主な甘味化合物は、ステビオシド及びレバウジオシドAである。レバウジオシドA (*Reb A*)は、甘味が増して苦味が減少するため、ステビオシドに比べて値が高いと考えられている。

【0006】

レバウジオシドD (*Reb D*)の甘味と苦味のプロファイルは、*Reb A*に比べて改善されるが、*Reb D*は、*Stevia*の葉に非常に少量しか存在しない。*Reb D*は、単一のグルコース分子を*Reb A*に追加することによって作製され得る。*Reb D*を作製する天然グリコシルトランスフェラーゼは、*Reb A*に転移するためのグルコース源としてUDPグルコースを使用する。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、酵素、特に非天然酵素、及びそれらの酵素によって糖成分を基質ステビオール配糖体（本明細書では、「SG」とも呼ばれる）に転移する方法を提供する。具体的には、1,2-グリコシルトランスフェラーゼ（本明細書では、「B12GT」とも呼ばれる）及びスクロースシンターゼ（本明細書では、「Susy」とも呼ばれる）をワンポット反応で使用し、ステビオシドと*Reb A*をそれぞれレバウジオシドE (*Reb E*)と*Reb D*に変換する。

【0008】

天然グリコシルトランスフェラーゼとは対照的に、本開示は、*Reb A*を*Reb D*に変換するために糖供与体としてADP-グルコースを利用できるグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドを提供する。本開示は、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドを提供し、該グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、配列番号6~882及び1333~1466からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なく

10

20

30

40

50

とも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、配列番号6~882及び1333~1466からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得るか、それらで構成され得る。ポリペプチドは、溶解、発現及び/または精製に使用される1つ以上のペプチドタグを含み得、それは、例えば、4~10個のヒスチジン残基、好ましくは6個のヒスチジン残基のポリヒスチジntagである。他の適切なタグは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、FLAG、マルトース結合タンパク質(MBP)、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、及びMycタグを含むが、それらに限定されない。適切なリンカーは、GSGSなどのグリシン及びセリンで構成されるポリペプチド、ポリグリシンリンカー、反復性EAAAK、ならびに、第Xa因子、エンテロキナーゼ、及びトロンピンなどの酵素の切断部位を含む配列を含むが、それらに限定されない。

10

【0009】

UDP-グルコースとADP-グルコースの両方を含むヌクレオチド糖供与体は、高価な共基質であり、該化合物を利用するプロセスに多大なコストを追加する。スクロースシンターゼ(Susy、EC2.4.1.13)は、ヌクレオチドニリン酸(NDP)とスクロースの化学反応を触媒し、NDP-グルコースとフルクトースを形成する。従って、スクロースシンターゼは、NDPをB12GTに必要なNDP-グルコース(例示的なグリコシルトランスフェラーゼ)に変換するために使用され得る。本開示は、スクロースシンターゼポリペプチドを提供し、該スクロースシンターゼポリペプチドは、配列番号890~1227及び1231~1332からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。具体的には、開示されたスクロースシンターゼは、ADPを、開示されたB12GTに必要なADP-グルコース補因子に変換することができる。

20

【0010】

本開示は、ワンポット反応でB12GTポリペプチドと組み合わせたSusy ADP-グルコースリサイクルシステムにより、Reb A及び/またはステビオシドをそれぞれReb D及びReb Eに変換する方法を更に提供する。いくつかの実施形態では、該方法は、50%超のReb A(RA50)、ADP、及びスクロースを含むように精製されたSteviaの葉抽出物を、B1,2グリコシルトランスフェラーゼ及びスクロースシンターゼと接触させ、Reb D及び/またはReb Eを作製することを含む。

30

【0011】

本開示を更に理解できるように、添付の図面が提供される。図面は、本開示の実施形態を示し、説明と共に、本開示の実施形態の原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】レバウジオシドA(Reb A)からレバウジオシドD(Reb D)への変換(グリコシル化)を示す。

40

【図2】糖供与体としてADP-グルコースまたはGDP-グルコースのいずれかを使用した場合、3つの天然UDP-グルコースB12GTの測定されたReb AからのReb D活性を示す。

【図3】ADPをADP-グルコースに変換する(上)、GDPをGDP-グルコースに変換する(中)、及びUDPをUDP-グルコースに変換する(下)、天然スクロースシンターゼの測定された能力を示す。

【図4】(上)は、B12GT pA10143と7つの天然スクロースシンターゼのうちの1つのワンポット反応におけるReb AからReb D、そしてReb M2への測定された変換を示す。(下)は、B12GT pA12549と7つの天然スクロース

50

シンターゼのうちの1つのワンポット反応における *Reb A* から *Reb D* への測定された変換を示す。

【図5】活性部位の部位飽和突然変異誘発ライブラリーからの pA10143 の上位の設計物を示す。親酵素の pA10143 は、灰色で示される。

【図6】変異残基による、pA10143 活性部位 *SSM* ライブラリーからの全ての酵素について測定された *Reb A* から *Reb D* への変換を示す。

【図7】pA21841 及び pA29798 の大規模なワンポット反応によって生成された反応生成物の *LCMS* クロマトグラムを示す。

【図8】pA21841 及び pA29646 の大規模なワンポット反応から生成された反応生成物の *LCMS* クロマトグラムを示す。

【図9】*Pichia pastoris* 発現から精製された設計された B12GT の *SDS-PAGE* ゲルを示す。

【図10】Aは、1Lの *Pichia pastoris* 発酵から精製された2つの設計された B12GT の *SDS-PAGE* ゲルを示す（左から右の順で、pA29798 (B12GT-1)、ラダー、pA32946 (B12GT-2)）。Bは、1Lの *Pichia pastoris* 発酵から精製された2つの設計された *Susy* の *SDS-PAGE* ゲルを示す（左から右への順序で、ラダー、pA34103 (*Susy*-1)、ラダー、pA32691 (*Susy*-2)）。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本開示は、基質ステビオール配糖体、スクロース、及び *NDP* を含む原料組成物を、*NDP*-グルコシルトランスフェラーゼポリペプチド及びスクロースシンターゼと接触させることにより、標的ステビオール配糖体を含む組成物を調製し、最後に、基質ステビオール配糖体よりも1つ以上の追加のグルコース単位を含む標的ステビオール配糖体を含む組成物を製造する酵素及び生体触媒プロセスを提供する。

【0014】

本明細書で使用される場合、「生体触媒」または「生体触媒の」は、有機化合物において化学変換を行うための、タンパク質酵素などの天然触媒の使用を指す。生体触媒は、生体内変換または生合成としても公知である。単離生体触媒法と全細胞生体触媒法の両方が当技術分野で公知である。生体触媒タンパク質酵素は、天然に存在するタンパク質であっても、組み換えタンパク質であってもよい。

【0015】

本明細書で使用される場合、「ステビオール配糖体（複数可）」という用語は、天然に存在するステビオール配糖体、（例えば、ステビオール-13-O-グルコシド、ステビオール-19-O-グルコシド、ルブソシド、ステビオール-1,2-ピオシド、ステビオール-1,3-ピオシド、ルブソシド、ダルコシドB、ダルコシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドG、ステビオシド、レバウジオシドC、レバウジオシドF、レバウジオシドA、レバウジオシドI、レバウジオシドE、レバウジオシドH、レバウジオシドL、レバウジオシドK、レバウジオシドJ、レバウジオシドM、レバウジオシドD、レバウジオシドN、レバウジオシドO、レバウジオシドQ）、合成ステビオール配糖体（例えば、酵素的にグルコシル化されたステビオール配糖体）、及びそれらの組み合わせを含むが、それに限定されない、ステビオールの配糖体を指す。

【0016】

本明細書で使用される場合、「原料組成物」という用語は、1つ以上のステビオール配糖体を含む任意の組成物（一般的に水溶液）を指し、1つ以上のステビオール配糖体は、生体内変換の基質として機能する。

【0017】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、文脈によって示されない限り、互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、典型的には、*DNA* のいずれかのポリマー形態を

10

20

30

40

50

指すために使用される。

【0018】

本明細書で使用される場合、「発現」は、文脈によって、ポリヌクレオチドが mRNA に転写され、転写された mRNA が続いてポリペプチドに翻訳される 2 段階プロセスのいずれかまたは両方の段階を指す。

【0019】

「転写制御下」は、ポリヌクレオチド、通常、DNA 配列の転写が、転写を促進する要素に作動可能に連結することに依存することを意味する。

【0020】

「作動可能に連結する」は、ポリヌクレオチド要素が細胞内で機能できるように配置されることを意味し、典型的には、細胞内でポリペプチドを生成し、例えば、本開示は、ポリペプチドをコードする下流配列に作動可能に連結されたプロモーターを提供する。

【0021】

「コードする」という用語は、ポリヌクレオチドが転写されて mRNA を産生し、次いで翻訳されてポリペプチドまたはそのフラグメントを産生できる場合、ポリヌクレオチドが mRNA またはポリペプチドを産生する能力を指す。それぞれの場合に、ポリヌクレオチドは、mRNA をコードするもの、及びポリペプチドをコードするものと呼ばれる。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補鎖であり、コード配列は、そこから推定され得る。同様に、「コード配列」は、mRNA またはポリペプチドをコードする核酸の領域を指す。

【0022】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、コード配列の転写の開始及び速度を制御するポリヌクレオチド配列の一部である制御配列を指す。「エンハンサー」は、標的配列の発現を増加させる調節要素である。「プロモーター/エンハンサー」は、プロモーター及びエンハンサー機能の両方を提供する配列を有するポリヌクレオチドである。

【0023】

エンハンサー及びプロモーターなどの調節要素は、「同種」または「異種」であり得る。「同種」調節要素は、ゲノム内の特定のポリヌクレオチドと自然に連結するものであり、例えば、それは、コードされたポリペプチドの上流にある生物において天然に見出されるプロモーターであり得る。「異種」調節要素は、組み換え分子生物学的技術によってポリヌクレオチドに並置されるものであるが、自然界に見出される組み合わせではない。多くの場合、プロモーター、エンハンサー及び他の調節要素は、ポリペプチドが天然に存在する宿主細胞以外の宿主細胞におけるポリペプチドの発現を促進するために異種である。従って、本明細書で使用される「異種発現」は、微生物などの宿主細胞内で mRNA 及び/またはポリペプチドを産生することを指し、ポリヌクレオチドは天然に見出されないが、宿主細胞内でポリヌクレオチドに作動可能に連結する 1 つ以上の調節要素が天然に見出されない。

【0024】

「ポリペプチド」という用語は、本明細書では、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸の 2 つ以上のサブユニットの分子を指すために使用される。典型的には、常にではないが、ポリペプチドは、数百のアミノ酸、例えば、約 400 ~ 約 800 個のアミノ酸を含む。

【0025】

「プラスミド」は、通常、染色体 DNA から分離され、染色体 DNA とは独立して複製できる DNA 分子である。多くの場合、それは、環状で二本鎖である。プラスミドベクターは、染色体外環状 DNA 分子として存在することが多いが、ランダムにまたは標的を定めて宿主染色体に安定して組み込まれるようにプラスミドベクターを設計することもできることが当技術分野で公知である。様々な用途に多くのプラスミドが市販される。複製される遺伝子は、細胞を特定の抗生物質に対して耐性にする遺伝子と、マルチクローニングサイト (MCS、またはポリリンカー) とを含むプラスミドのコピーに挿入され、マルチ

10

20

30

40

50

クローニングサイトは、この位置にDNAフラグメントを簡単に挿入できるようにする、広く使用されるいくつかの制限部位を含む短い領域である。典型的には、本明細書に開示されるポリペプチドは、プラスミドから発現される。

【0026】

数値の直前にある「約」または「大体」という用語は、範囲（例えば、その値の±10%）を意味する。例えば、開示の文脈で別途指示のない限り、または、そのような解釈と矛盾しない限り、「約50」は、45~55を意味し得、「約25,000」は、22,500~27,500などを意味し得る。例えば、「約49、約50、約55、...」、「約50」などの数値のリストでは、前値及び後値間の間隔（複数可）の半分未満、例えば、49.5超~52.5未満、に及ぶ範囲を意味する。更に、「約」値「未満」または「約」値「超」という語句は、本明細書で提供される「約」という用語の定義を考慮して理解されるべきである。同様に、一連の数値または値の範囲（例えば、「約10、20、30」または「約10~30」）の前にある「約」という用語は、それぞれ、一連の全ての値、または範囲の終点を指す。

10

【0027】

本明細書で使用される場合、「微小生物」または「微生物」という用語は、広義に解釈されるべきである。それらの用語は同じ意味で使用され、細菌及び古細菌の2つの原核生物ドメイン、ならびに、特定の真核菌類及び原生生物を含むが、それらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示は、本開示に存在するリスト及び図面の「微小生物」または「微生物」を指す。特徴付けは、同定された分類学的属だけでなく、同定された分類学的種、ならびに前記表または図面における任意の生物の様々な新規及び新たに同定または設計された株も指すことができる。同じ特徴付けは、実施例など、明細書の他の部分でのそれらの用語の説明にも当てはまる。

20

【0028】

核酸配列またはタンパク質配列に言及する場合、「同一性」という用語は、2つの配列間の類似性を示すために使用される。配列同一性または類似性は、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所配列同一性アルゴリズムを含むが、それに限定されない当技術分野で公知の標準的技術を使用して、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443 (1970)の配列同一性アライメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 (1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WIにおける、GAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)のコンピュータ化された実装によって、Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387-395 (1984)により記載されるBest Fit配列プログラムによって、または調査によって、決定され得る。適切なアルゴリズムの別の例は、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990)及びKarlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5787 (1993)に記載の、BLASTアルゴリズムである。典型的なBLASTプログラムは、WU-BLAST-2プログラムであり、Altschul et al., Methods in Enzymology, 266, 460-480 (1996)、blast.wustl.edu/blast/README.html, から取得した。WU-BLAST-2は、いくつかの検索パラメータを使用し、それらのパラメータは、好ましくはデフォルト値に設定される。パラメータは、動的な値であり、特定の配列の構成、及び目的の配列が検索される特定のデータベースの構成に応じて、プログラム自体によって確立されるが、感度を増大させるために値を調節することもできる。他のアルゴリズムは、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402により報告されるギャップ化BLASTである。他のアルゴリズムにつ

30

40

50

いても本明細書で説明することができる。

【0029】

本開示は、ステビオシドを Re b E に、及び Re b A を Re b D に変換するために ADP - グルコース糖供与体を使用することができる、非天然の改変 - 1, 2 - ADP グリコシルトランスフェラーゼ (B 1 2 G T) を提供する。特定の実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、配列番号 6 ~ 8 8 2 及び 1 3 3 3 ~ 1 4 6 6 のうちの 1 つである。別の実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、配列番号 6 ~ 8 8 2 及び 1 3 3 3 ~ 1 4 6 6 のうちの 1 つと少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるポリペプチド配列である。

【0030】

生物情報学では、関連するポリペプチド配列を見つけて決定するためにいくつかの方法は開発される。例えば、配列同一性パーセント、位置特異的スコアリング行列 (P S S M)、及び隠れマルコフモデル (H M M) は全て、特定のクエリ配列に類似した配列を見つけるために広く使用される。配列同一性パーセントは、2 つの配列間で共有されるアミノ酸の数を計算する。配列同一性パーセントは、2 つの配列間の特定のアライメントに基づいて計算される。同一性のパーセンテージは、アラインメントプログラム Clustal Omega (/ www . e b i . a c . u k / T o o l s / m s a / c l u s t a l o / で入手可能) を使用してデフォルト設定で計算され得る。デフォルトの遷移行列は G o n n e t、ギャップ開始ペナルティは 6 ビット、ギャップ拡張は 1 ビットである。Clustal Omega は、H H a l i g n アルゴリズム及びそのデフォルト設定をコアアラインメントエンジンとして使用する。該アルゴリズムは、S o d i n g , J . (2 0 0 5) ' P r o t e i n h o m o l o g y d e t e c t i o n b y H M M - H M M c o m p a r i s o n ' . B i o i n f o r m a t i c s 2 1 , 9 5 1 - 9 6 0 に記載される。

【0031】

位置特異的スコアリング行列 (P S S M) は、多くの関連配列を表す簡潔な方法である。PSSM は、多くの場合、複数の配列アライメントによって生成される。配列検索ツール P S I - B L A S T は、PSSM を生成し、それらを使用して関連するポリペプチド配列を検索する。ポリペプチド配列のスコア付けに使用される PSSM は、2 1 列 × N 行で構成される行列 (つまり、表) であり、N は関連する配列の長さである。各行は、ポリペプチド配列内の位置に対応し、各列は、その残基位置が取ることができる異なるアミノ酸 (またはギャップ) を表す。PSSM の各エントリは、ポリペプチド配列内の特定の位置にある特定のアミノ酸のスコアを表す。PSSM を使用して配列をスコア付けするには、最初に配列を参照配列にアラインメントし、次に、以下の合計を計算し、

【数 1】

$$S_{PSSM} = \sum_{i=1}^N PSSM(i, aa_i),$$

式中、i は配列の位置、aa_i は位置 i のアミノ酸である。関連するポリペプチド配列は全て高い PSSM スコアを有するが、無関係な配列は低いスコアを有する。

【0032】

本開示はまた、ADP を ADP - グルコースに変換するためにスクロース糖供与体を使用することができる、非天然の改変スクロースシターゼ (S u S y s) を提供する。特定の実施形態では、SuSy ポリペプチドは、配列番号 8 9 0 ~ 1 2 2 7 及び 1 2 3 1 ~ 1 3 3 2 のうちの 1 つである。別の実施形態では、SuSy ポリペプチドは、配列番号 8 9 0 ~ 1 2 2 7 及び 1 2 3 1 ~ 1 3 3 2 のうちの 1 つと少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0

%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリペプチド配列である。

【0033】

いくつかの実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼ及び/またはスクロースシンターゼポリペプチドは、宿主微生物における発現によって調製される。適切な宿主微生物としては、*E. coli*、*Saccharomyces sp.*、*Aspergillus sp.*、*Pichia sp.*、*Bacillus sp.*が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼ及びスクロースシンターゼは、*E. coli*で発現される。特定の実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼ及びスクロースシンターゼは、*Pichia pastoris*で発現される。

10

【0034】

B12GT及び/またはSusyポリペプチドは、遊離型、固定化型、または全細胞系を含む任意の適切な形態で提供され得る。グルコシルトランスフェラーゼポリペプチドの純度は様々であり得、例えば、粗酵素調製物、半精製酵素調製物、または精製酵素調製物として提供され得る。一実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼポリペプチドは遊離である。別の実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、固体支持体、例えば、無機または有機支持体に固定化される。いくつかの実施形態では、固体支持体は、誘導体化セルロース、ガラス、セラミック、メタクリレート、スチレン、アクリル、金属酸化物、または膜である。いくつかの実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、共有結合、吸着、架橋、封入、またはカプセル化によって固体支持体に固定化される。

20

【0035】

更に、別の実施形態では、B12GT及び/またはSusyポリペプチドは、全細胞系の形態で、例えば、生きた発酵微生物細胞として、または死滅して安定化された微生物細胞として、または細胞溶解物の形態で提供される。

【0036】

本開示は、基質ステビオール配糖体を含む原料組成物から標的ステビオール配糖体を含む組成物を調製するための生体触媒プロセスを提供し、標的ステビオール配糖体は、基質ステビオール配糖体よりも1つ以上の追加のグルコース単位を含む。生体触媒プロセスは、B12GT及びSusyを、1つ以上のステビオール配糖体、非UDPヌクレオチドニリン酸、及びスクロースを含む原料組成物と接触させることを含む。別の実施形態では、生体触媒プロセスは、改変B12GT及びSusyを、1つ以上のステビオール配糖体、非UDPヌクレオチドニリン酸、及びスクロースを含む原料組成物と接触させることを含む。別の実施形態では、生体触媒プロセスは、改変B12GT及び改変Susyを、1つ以上のステビオール配糖体、非UDPヌクレオチドニリン酸、及びスクロースを含む原料組成物と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、RA50、ADP、及びスクロースを、改変B1,2グルコシルトランスフェラーゼ及びスクロースシンターゼと接触させ、Reb D及びReb Eを作製することを含む。

30

【0037】

一実施形態では、B12GTポリペプチドは、配列番号1~882及び1333~1466のうちの1つである。別の実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、配列番号1~882のうちの1つと少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリペプチド配列である。別の実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、配列番号6~882及び1333~1466のうちの1つと少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリペプチド配列である。好ましくは、B12GTポリペプチドの触媒ドメインは

40

50

、配列番号5に従って番号付けされた、15位のH、114位のD、357位のD、及び358位のQに対応する残基を含む。

【0038】

一実施形態では、スクロースシターゼは、スクロースシターゼ活性を有する任意のポリペプチドである。別の実施形態では、スクロースシターゼは、細菌ドメインの生物に由来する。別の実施形態では、スクロースシターゼは、植物界の生物に由来する。別の実施形態では、スクロースシターゼは、植物界の生物に由来する。別の実施形態では、スクロースシターゼは、プロテオバクテリア門、デフェリバクテレス門、またはシアノバクテリア門に属する生物に由来する。別の実施形態では、スクロースシターゼは、*Acidithiobacillus caldus*、*Nitrosomonas europaea*、*Denitrovibrio acetiphilus*、*Thermosynechococcus elongatus*、*Oryza sativa*、*Arabidopsis thaliana*、または*Coffea arabica*に由来する。一実施形態では、スクロースシターゼは、配列番号883~1227及び1231~1332のうちの一つである。別の実施形態では、スクロースシターゼは、配列番号883~1227の一つと少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性であるポリペプチド配列を有する改変スクロースシターゼである。別の実施形態では、スクロースシターゼは、配列番号890~1227及び1231~1332の一つと少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性であるポリペプチド配列を有する改変スクロースシターゼである。好ましくは、SuSyポリペプチドの触媒ドメインは、配列番号885に従って番号付けされた、425位のH、567位のR、572位のK、及び663位のEに対応する残基、または、配列番号888に従って番号付けされた、436位のH、578位のR、583位のK、及び674位のEに対応する残基を含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼ及び/またはスクロースシターゼポリペプチドは、宿主微生物における発現によって調製される。適切な宿主微生物としては、*E. coli*、*Saccharomyces sp.*、*Aspergillus sp.*、*Pichia sp.*、*Bacillus sp.*が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼ及びスクロースシターゼは、*E. coli*で発現される。別の実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼ及びスクロースシターゼは、*Pichia pastoris*で発現される。別の実施形態では、グルコシルトランスフェラーゼ及び/またはスクロースシターゼポリペプチドは、無細胞発現によって調製される。

【0040】

B12GT及びスクロースシターゼポリペプチドは、遊離型、固定化型、または全細胞系を含む任意の適切な形態で提供され得る。ポリペプチドの純度は様々であり得、それらは、例えば、粗酵素調製物、半精製酵素調製物、または精製酵素調製物として提供され得る。一実施形態では、B12GT及び/またはSuSyポリペプチドは遊離である。別の実施形態では、B12GT及び/またはSuSyポリペプチドは、固体支持体、例えば、無機または有機支持体に固定化される。いくつかの実施形態では、固体支持体は、誘導体化セルロース、ガラス、セラミック、メタクリレート、スチレン、アクリル、金属酸化物、または膜である。いくつかの実施形態では、B12GT及び/またはSuSyポリペプチドは、共有結合、吸着、架橋、封入、またはカプセル化によって固体支持体に固定化される。

【0041】

更に、別の実施形態では、B12GT及び/またはSuSyポリペプチドは、全細胞系

10

20

30

40

50

の形態で、例えば、生きた発酵微生物細胞として、または死滅して安定化された微生物細胞として、または細胞溶解物の形態で提供される。

【 0 0 4 2 】

原料組成物のステビオール配糖体成分（複数可）は、本明細書に記載されるように、標的ステビオール配糖体（複数可）の産生のための基質（複数可）として機能する。標的ステビオール配糖体の標的（複数可）は、1つ以上の追加のグルコース単位により、対応する基質ステビオール配糖体とは化学的に異なる。

【 0 0 4 3 】

原料ステビオール配糖体組成物は、少なくとも1つの基質ステビオール配糖体を含み得る。一実施形態では、基質ステビオール配糖体は、ステビオール、ステビオール - 1 3 - O - グルコシド、ステビオール - 1 9 - O - グルコシド、ルブソシド、ステビオール - 1 , 2 - ピオシド、ステビオール - 1 , 3 - ピオシド、ルブソシド、ダルコシド B、ダルコシド A、レバウジオシド B、レバウジオシド G、ステビオシド、レバウジオシド C、レバウジオシド F、レバウジオシド A、レバウジオシド I、レバウジオシド E、レバウジオシド H、レバウジオシド L、レバウジオシド K、レバウジオシド J、レバウジオシド M、レバウジオシド D、レバウジオシド N、レバウジオシド O、レバウジオシド Q、それらの異性体、合成ステビオール配糖体、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される。別の実施形態では、原料ステビオール配糖体組成物は、ステビオシド及び R e b A で構成される。別の実施形態では、原料ステビオール配糖体組成物は、ステビオシドで構成される。更に、別の実施形態では、原料ステビオール配糖体組成物は R e b A で構成される。

【 0 0 4 4 】

原料ステビオール配糖体組成物は、合成または精製（部分的または完全）、市販のもの、または調製したものであり得る。本開示の方法において有用な原料組成物の一例は、S t e v i a r e b a u d i a n a 植物材料（例えば、葉）の精製から得られた抽出物である。原料組成物の別の例は、溶媒で溶液にした市販の s t e v i a 抽出物である。更に、原料組成物の別の例は、溶媒で溶液にしたステビオール配糖体の市販の混合物である。他の適切な原料組成物は、ステビオール配糖体を単離及び精製するためのプロセスの副産物を含む。

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、原料組成物は、精製基質ステビオール配糖体を含む。例えば、原料組成物は、無水基準で約 5 0 重量% 超、約 6 0 重量% 超、約 7 0 重量% 超、約 8 0 重量% 超、約 8 5 重量% 超、約 9 0 重量% 超、約 9 1 重量% 超、約 9 2 重量% 超、約 9 3 重量% 超、約 9 4 重量% 超、約 9 5 重量% 超、約 9 6 重量% 超、約 9 7 重量% 超、約 9 8 重量% 超、約 9 9 重量% 超、または約 9 9 . 6 重量% 超の1つ以上の基質ステビオール配糖体を含み得る。

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、原料組成物は、部分的に精製された基質ステビオール配糖体組成物を含む。例えば、原料組成物は、無水基準で約 0 . 5 重量% 超、約 1 重量% 超、約 2 重量% 超、約 3 重量% 超、約 4 重量% 超、約 5 重量% 超、約 1 0 重量% 超、約 2 0 重量% 超、約 3 0 重量% 超、約 4 0 重量% 超、または約 5 0 重量% 超の1つ以上の基質ステビオール配糖体を含有する。

【 0 0 4 7 】

別の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、精製レバウジオシド A またはその異性体である。特定の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、無水基準で 9 9 重量% 超のレバウジオシド A またはその異性体を含む。別の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、部分的に精製されたレバウジオシド A を含む。特定の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、無水基準で約 1 重量%、5 重量%、1 0 重量%、2 0 重量%、3 0 重量%、4 0 重量%、5 0 重量%、6 0 重量%、7 0 重量%、8 0 重量% または 9 0 重量% 超のレバウジオシド A を含有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

更に、別の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、精製ステビオシドまたはその異性体を含む。特定の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、無水基準で99重量%超のステビオシドまたはその異性体を含む。別の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、部分的に精製されたステビオシドを含む。特定の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、無水基準で約10重量%、20重量%、30重量%、40重量%、50重量%、60重量%、70重量%、80重量%または90重量%超のステビオシドを含む。

【 0 0 4 9 】

更に、別の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、ステビオシドとレバウジオシド A との組み合わせである。特定の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、無水基準で約5重量%超のステビオシド及び約5重量%超の R e b A、約10重量%超のステビオシド及び約10重量%超の R e b A、約20重量%超のステビオシド及び約20重量%超の R e b A、約30重量%超のステビオシド及び約30重量%超の R e b A、約40重量%超のステビオシド及び約40重量%超の R e b A、約45重量%超のステビオシド及び約45重量%超の R e b A、約40重量%超のステビオシド及び約50重量%超の R e b A、約30重量%超のステビオシド及び約60重量%超の R e b A、約20重量%超のステビオシド及び約70重量%超の R e b A、約10重量%超のステビオシド及び約80重量%超の R e b A、約5重量%超のステビオシド及び約90重量%超の R e b A、約50重量%超のステビオシド及び約40重量%超の R e b A、約60重量%超のステビオシド及び約30重量%超の R e b A、約70重量%超のステビオシド及び約20重量%超の R e b A、約80重量%超のステビオシド及び約10重量%超の R e b A、または約90重量%超のステビオシド及び約5重量%超の R e b A を含有する。

【 0 0 5 0 】

なお、別の実施形態では、基質ステビオール配糖体は、s t e v i a の葉抽出物に由来する。一実施形態では、R A 5 0 (R e b A を 5 0 % 以上含むように精製された s t e v i a の葉抽出物) は、ステビオール配糖体基質として使用される。一実施形態では、R A 5 0 は、約 1 ~ 8 0 0 m g / m L の濃度で使用される。別の実施形態では、R A 5 0 は、約 1 0 0 m g / m L の濃度で使用される。

【 0 0 5 1 】

ワンポット反応は、スクロースシンターゼによって N D P - グルコースに変換できるヌクレオチド補因子で実行され得る。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、非 U D P ヌクレオチド (即ち、A D P - グルコース、G D P - グルコース、C D P - グルコース、または T D P - グルコース) であり得る。別の実施形態では、ヌクレオチドは A D P である。特定の実施形態では、ワンポット反応は、約 0 . 0 1 ~ 1 0 m M、例えば、0 . 0 1 m M ~ 0 . 0 5 m M、0 . 0 5 m M ~ 0 . 1 m M、0 . 1 m M ~ 0 . 5 m M、0 . 5 m M ~ 1 m M、1 m M ~ 5 m M、または 5 m M ~ 1 0 m M の濃度の A D P によって実行され得る。特定の実施形態では、A D P は、0 . 5 m M の濃度で使用される。

【 0 0 5 2 】

ワンポット反応は、約 1 0 m M ~ 2 M、例えば、1 0 m M 超、5 0 m M 超、1 0 0 m M 超、2 5 0 m M 超、5 0 0 m M 超、1 M 超、1 . 5 M 超、及び 2 M 超の濃度のスクロースで実行され得る。特定の実施形態では、スクロースは、2 5 0 m M の濃度で使用される。

【 0 0 5 3 】

一実施形態では、反応は、任意の温度で実行される。別の実施形態では、ワンポット反応は、約 1 0 ~ 8 0 の温度で実行される。それは、例えば、1 0 ~ 2 0、2 0 ~ 3 0、3 0 ~ 4 0、4 0 ~ 5 0、5 0 ~ 6 0、6 0 ~ 7 0、7 0 ~ 8 0、または 8 0 などである。特定の実施形態では、ワンポット反応は、6 0 で実行される。

【 0 0 5 4 】

変換用の反応媒体は、通常、水性であり、それは、例えば、精製水、緩衝液、またはそ

10

20

30

40

50

これらの組み合わせである。特定の実施形態では、反応媒体は、緩衝液である。適切な緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、H E P E S、及びリン酸緩衝液を含むが、それらに限定されない。特定の実施形態では、反応媒体は、リン酸緩衝液である。反応媒体は、約 4 ~ 10 の pH を有することができる。特定の実施形態では、反応媒体の pH は 6 である。あるいは、反応媒体は、有機溶媒であり得る。

【 0 0 5 5 】

原料組成物をグリコシルトランスフェラーゼ及びスクロースシンターゼポリペプチドと接触させるステップは、約 1 時間 ~ 1 週間、例えば、30 分間 ~ 1 時間、1 時間 ~ 4 時間、4 時間 ~ 6 時間、6 時間 ~ 12 時間、12 時間 ~ 24 時間、1 日間 ~ 2 日間、2 日間 ~ 3 日間、3 日間 ~ 4 日間、4 日間 ~ 5 日間、6 日間 ~ 7 日間で実行され得る。特定の実施形態では、反応は 24 時間で実行される。

10

【 0 0 5 6 】

反応は、H P L C、L C M S、T L C、I R または N M R を含むが、それらに限定されない適切な方法によって監視され得る。

【 0 0 5 7 】

標的ステビオール配糖体は、任意のステビオール配糖体であり得る。一実施形態では、標的ステビオール配糖体は、ステビオール、ステビオール - 13 - O - グルコシド、ステビオール - 19 - O - グルコシド、ルブソシド、ステビオール - 1, 2 - ピオシド、ステビオール - 1, 3 - ピオシド、ルブソシド、ダルコシド B、ダルコシド A、レバウジオシド B、レバウジオシド G、ステビオシド、レバウジオシド C、レバウジオシド F、レバウジオシド A、レバウジオシド I、レバウジオシド E、レバウジオシド H、レバウジオシド L、レバウジオシド K、レバウジオシド J、レバウジオシド M、レバウジオシド D、レバウジオシド N、レバウジオシド O、レバウジオシド Q、7 つの共有結合したグルコース単位を有するレバウジオシド（例えば、レバウジオシド M + 1 グルコース単位）、合成ステビオール配糖体、その異性体、及び / またはステビオール配糖体組成物である。別の実施形態では、標的ステビオール配糖体は、レバウジオシド E またはその異性体である。別の実施形態では、標的ステビオール配糖体は、レバウジオシド D またはその異性体である。なお、別の実施形態では、標的ステビオール配糖体は、R e b D 及び R e b E である。

20

【 0 0 5 8 】

一実施形態では、R e b A から R e b D 及び / または R e b D 異性体への変換は、上記の方法のいずれかによって決定されるように、少なくとも約 2 % 完了する。特定の実施形態では、R e b A から R e b D 及び / または R e b D 異性体（複数可）への変換が少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、または少なくとも約 90 % 完了する。特定の実施形態では、r e b A から r e b D 及び / または r e b D 異性体（複数可）への変換は、少なくとも約 95 % 完了する。いくつかの実施形態では、原料組成物中の R e b A の少なくとも約 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % は R e b D 及び / または R e b D 異性体（複数可）に変換される。

30

【 0 0 5 9 】

一実施形態では、ステビオシドから R e b E 及び / または R e b E 異性体への変換は、上記の方法のいずれかによって決定されるように、少なくとも約 2 % 完了する。特定の実施形態では、ステビオシドから R e b E 及び / または R e b E 異性体（複数可）の変換が少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、または少なくとも約 90 % 完了する。特定の実施形態では、ステビオシドから R e b E 及び / または R e b E 異性体（複数可）への変換は、少なくとも約 95 % 完了する。いくつかの実施形態では、原料組成物中のステビオシドの少なくとも約 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % は R e b E 及び / または R e b E 異性体（複数可）に変換される。

40

50

【 0 0 6 0 】

標的ステビオール配糖体（複数可）は、水和物、溶媒和物、無水物、またはそれらの組み合わせを含む、任意の多形性または非晶質形態であり得る。

【 0 0 6 1 】

必要に応じて、本開示の方法は、標的組成物から標的ステビオール配糖体を分離することを更に含む。標的ステビオール配糖体（複数可）は、例えば、結晶化、膜による分離、遠心分離、抽出、クロマトグラフィー分離、またはそのような方法の組み合わせなどの任意の適切な方法によって分離され得る。

【 0 0 6 2 】

一実施形態では、標的ステビオール配糖体（複数可）の分離により、無水基準で約 8 0 重量%超の標的ステビオール配糖体を含む組成物、即ち、高度に精製されたステビオール配糖体組成物を産生する。別の実施形態では、分離により、約 0 . 5 重量%超、約 1 重量%超、約 2 重量%超、約 3 重量%超、約 4 重量%超、約 5 重量%超、約 1 0 重量%超、約 2 0 重量%超、約 3 0 重量%超、約 4 0 重量%超、約 5 0 重量%超、約 6 0 重量%超、約 7 0 重量%超、約 8 0 重量%超、約 8 5 重量%超、約 9 0 重量%超、約 9 1 重量%超、約 9 2 重量%超、約 9 3 重量%超、約 9 4 重量%超、約 9 5 重量%超、約 9 6 重量%超、約 9 7 重量%超、約 9 8 重量%超、約 9 9 重量%超、または約 9 9 . 6 重量%超の標的ステビオール配糖体を含む組成物を産生する。特定の実施形態では、組成物は、約 9 5 重量%超の標的ステビオール配糖体（複数可）を含む。

【 0 0 6 3 】

精製標的ステビオール配糖体は、甘味料として消費製品に使用され得る。適切な消費者製品は、食品、飲料、医薬組成物、タバコ製品、栄養補助食品組成物、口腔衛生組成物、及び化粧品組成物を含むが、それらに限定されない。

【 0 0 6 4 】

配列番号 1 ~ 1 2 2 7 及び 1 2 3 1 ~ 1 4 6 6 を有する酵素をコードする核酸を含むプラスミドは、以下の表 1 に記載される。

【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1

配列 番号	プラスミドID	配列 番号	プラスミドID	配列 番号	プラスミドID
1	pA10132	489	pA33193	977	pA32698
2	pA10143	490	pA33194	978	pA32700
3	pA12549	491	pA33195	979	pA32701
4	pA12550	492	pA33196	980	pA32702
5	pA28422	493	pA33197	981	pA32704
6	pA30328	494	pA33198	982	pA32706
7	pA30329	495	pA33199	983	pA32708
8	pA30331	496	pA33200	984	pA32712
9	pA30332	497	pA33201	985	pA32715
10	pA30333	498	pA33202	986	pA32716
11	pA30334	499	pA33203	987	pA32717
12	pA30335	500	pA33204	988	pA32719
13	pA30337	501	pA33205	989	pA32721
14	pA30338	502	pA33206	990	pA32723
15	pA30339	503	pA33207	991	pA32731
16	pA30340	504	pA33208	992	pA32732
17	pA30341	505	pA33209	993	pA32734
18	pA30342	506	pA33210	994	pA32736
19	pA30343	507	pA33211	995	pA32737

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

20	pA30345	508	pA33212	996	pA32739
21	pA30347	509	pA33213	997	pA32748
22	pA30348	510	pA33214	998	pA32750
23	pA30350	511	pA33215	999	pA32754
24	pA30351	512	pA33216	1000	pA32758
25	pA30352	513	pA33217	1001	pA32767
26	pA30354	514	pA33218	1002	pA32770
27	pA30358	515	pA33219	1003	pA32779
28	pA30362	516	pA33220	1004	pA32781
29	pA30463	517	pA33221	1005	pA32787
30	pA30468	518	pA33222	1006	pA32790
31	pA30471	519	pA33223	1007	pA32793
32	pA30472	520	pA33224	1008	pA32796
33	pA30473	521	pA33225	1009	pA32797
34	pA30557	522	pA33226	1010	pA32799
35	pA30565	523	pA33227	1011	pA32800
36	pA30568	524	pA33228	1012	pA32801
37	pA30569	525	pA33229	1013	pA32802
38	pA30570	526	pA33230	1014	pA32804
39	pA30571	527	pA33231	1015	pA32806
40	pA30785	528	pA33232	1016	pA32808
41	pA30787	529	pA33233	1017	pA32816
42	pA30790	530	pA33234	1018	pA32819
43	pA30791	531	pA33235	1019	pA32820
44	pA30793	532	pA33236	1020	pA32821
45	pA30796	533	pA33237	1021	pA32824
46	pA30797	534	pA33238	1022	pA32825
47	pA30798	535	pA29767	1023	pA32826
48	pA30799	536	pA29768	1024	pA32828
49	pA30802	537	pA29769	1025	pA32831
50	pA30803	538	pA29770	1026	pA32834
51	pA30805	539	pA29771	1027	pA32835

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

52	pA30806	540	pA29772	1028	pA32837
53	pA30808	541	pA29773	1029	pA32842
54	pA30811	542	pA29774	1030	pA32844
55	pA30812	543	pA29775	1031	pA32845
56	pA30814	544	pA29776	1032	pA32847
57	pA30817	545	pA29777	1033	pA32848
58	pA30820	546	pA29778	1034	pA32854
59	pA30879	547	pA29779	1035	pA32855
60	pA30880	548	pA29780	1036	pA32858
61	pA30882	549	pA29781	1037	pA32863
62	pA30883	550	pA29782	1038	pA32864
63	pA30884	551	pA29783	1039	pA32865
64	pA30885	552	pA29784	1040	pA32866
65	pA30886	553	pA29785	1041	pA32868
66	pA30887	554	pA29786	1042	pA32876
67	pA30888	555	pA29787	1043	pA32880
68	pA30892	556	pA29788	1044	pA32916
69	pA30894	557	pA29789	1045	pA32919
70	pA30895	558	pA29790	1046	pA32924
71	pA30935	559	pA29791	1047	pA32926
72	pA30936	560	pA29792	1048	pA32934
73	pA30937	561	pA29793	1049	pA32632
74	pA30938	562	pA29794	1050	pA32634
75	pA30939	563	pA29795	1051	pA32638
76	pA30940	564	pA29796	1052	pA32646
77	pA30941	565	pA29797	1053	pA32653
78	pA30942	566	pA29798	1054	pA32722
79	pA30943	567	pA29799	1055	pA32724
80	pA30944	568	pA29800	1056	pA32727
81	pA30945	569	pA29801	1057	pA32729
82	pA30946	570	pA29802	1058	pA32735
83	pA30947	571	pA29803	1059	pA32738

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

84	pA30948	572	pA29804	1060	pA32742
85	pA30949	573	pA29805	1061	pA32743
86	pA30951	574	pA29806	1062	pA32746
87	pA30952	575	pA29807	1063	pA32747
88	pA30953	576	pA29808	1064	pA32749
89	pA30997	577	pA29809	1065	pA32751
90	pA30998	578	pA29810	1066	pA32752
91	pA31001	579	pA29811	1067	pA32757
92	pA31003	580	pA29812	1068	pA32760
93	pA31004	581	pA29813	1069	pA32761
94	pA31005	582	pA29814	1070	pA32763
95	pA31006	583	pA29815	1071	pA32765
96	pA31009	584	pA29816	1072	pA32769
97	pA31011	585	pA29817	1073	pA32775
98	pA31012	586	pA29818	1074	pA32780
99	pA31014	587	pA29615	1075	pA32782
100	pA31016	588	pA29616	1076	pA32785
101	pA31017	589	pA29617	1077	pA32791
102	pA31018	590	pA29618	1078	pA32869
103	pA31020	591	pA29619	1079	pA32871
104	pA31022	592	pA29620	1080	pA32875
105	pA31024	593	pA29621	1081	pA32879
106	pA31026	594	pA29622	1082	pA32881
107	pA31029	595	pA29623	1083	pA32882
108	pA31068	596	pA29624	1084	pA32884
109	pA31069	597	pA29625	1085	pA32885
110	pA31070	598	pA29626	1086	pA32886
111	pA31071	599	pA29627	1087	pA32888
112	pA31073	600	pA29628	1088	pA32892
113	pA31074	601	pA29629	1089	pA32894
114	pA31075	602	pA29630	1090	pA32895
115	pA31076	603	pA29631	1091	pA32902

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

116	pA31078	604	pA29632	1092	pA32903
117	pA31080	605	pA29633	1093	pA32904
118	pA31081	606	pA29634	1094	pA32906
119	pA31086	607	pA29635	1095	pA32908
120	pA31125	608	pA29636	1096	pA32912
121	pA31126	609	pA29637	1097	pA32913
122	pA31127	610	pA29638	1098	pA32914
123	pA31128	611	pA29639	1099	pA32917
124	pA31129	612	pA29640	1100	pA32918
125	pA31130	613	pA29641	1101	pA32922
126	pA31134	614	pA29642	1102	pA32923
127	pA31135	615	pA29643	1103	pA32930
128	pA31136	616	pA29645	1104	pA32932
129	pA31138	617	pA29646	1105	pA32579
130	pA31142	618	pA29647	1106	pA32581
131	pA31163	619	pA29648	1107	pA32583
132	pA31167	620	pA29649	1108	pA32585
133	pA31169	621	pA29650	1109	pA32587
134	pA31172	622	pA29651	1110	pA32597
135	pA31173	623	pA29652	1111	pA32599
136	pA31174	624	pA29653	1112	pA32610
137	pA31175	625	pA29654	1113	pA32613
138	pA31177	626	pA29655	1114	pA32617
139	pA31178	627	pA29656	1115	pA32619
140	pA31179	628	pA29657	1116	pA32621
141	pA31181	629	pA29658	1117	pA32627
142	pA31258	630	pA29659	1118	pA32631
143	pA31259	631	pA29660	1119	pA32633
144	pA31261	632	pA29661	1120	pA32637
145	pA31262	633	pA29662	1121	pA32641
146	pA31263	634	pA29664	1122	pA32647
147	pA31264	635	pA29665	1123	pA32656

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

148	pA31265	636	pA29666	1124	pA32658
149	pA31267	637	pA29667	1125	pA32673
150	pA31268	638	pA29668	1126	pA32677
151	pA31273	639	pA29669	1127	pA32679
152	pA31274	640	pA29671	1128	pA32681
153	pA31276	641	pA29672	1129	pA32683
154	pA31278	642	pA29673	1130	pA32685
155	pA31279	643	pA29675	1131	pA32689
156	pA31280	644	pA29676	1132	pA32691
157	pA31282	645	pA29677	1133	pA32693
158	pA31285	646	pA29678	1134	pA32695
159	pA31286	647	pA29679	1135	pA32711
160	pA31287	648	pA29680	1136	pA32725
161	pA31288	649	pA29681	1137	pA32740
162	pA31289	650	pA29682	1138	pA32744
163	pA31290	651	pA29683	1139	pA32764
164	pA31291	652	pA29684	1140	pA32768
165	pA31294	653	pA29685	1141	pA32772
166	pA31297	654	pA29686	1142	pA32773
167	pA31298	655	pA29687	1143	pA32774
168	pA31300	656	pA29688	1144	pA32776
169	pA31302	657	pA29689	1145	pA32777
170	pA31303	658	pA29690	1146	pA32778
171	pA31304	659	pA29692	1147	pA32795
172	pA31305	660	pA29693	1148	pA32803
173	pA31306	661	pA29694	1149	pA32805
174	pA31307	662	pA29695	1150	pA32807
175	pA31308	663	pA29696	1151	pA32809
176	pA31309	664	pA29697	1152	pA32813
177	pA31310	665	pA29698	1153	pA32815
178	pA31311	666	pA29699	1154	pA32817
179	pA31313	667	pA29700	1155	pA32827

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

180	pA31336	668	pA29701	1156	pA32832
181	pA31345	669	pA29702	1157	pA32833
182	pA31346	670	pA29703	1158	pA32839
183	pA31347	671	pA29704	1159	pA32841
184	pA31350	672	pA30015	1160	pA32843
185	pA31352	673	pA30016	1161	pA32849
186	pA31353	674	pA30017	1162	pA32851
187	pA31354	675	pA30018	1163	pA32853
188	pA31355	676	pA30019	1164	pA32857
189	pA31356	677	pA30020	1165	pA32859
190	pA31358	678	pA30021	1166	pA32867
191	pA31360	679	pA30022	1167	pA32872
192	pA31362	680	pA30023	1168	pA32873
193	pA31364	681	pA30024	1169	pA32887
194	pA31366	682	pA30025	1170	pA32889
195	pA31367	683	pA30026	1171	pA32891
196	pA31368	684	pA30027	1172	pA32897
197	pA31369	685	pA30028	1173	pA32901
198	pA31505	686	pA30029	1174	pA32907
199	pA31506	687	pA30030	1175	pA32911
200	pA31507	688	pA30031	1176	pA32915
201	pA31508	689	pA30032	1177	pA32920
202	pA31509	690	pA30033	1178	pA32927
203	pA31510	691	pA30034	1179	pA32929
204	pA31511	692	pA30035	1180	pA32931
205	pA31512	693	pA30036	1181	pA34086
206	pA31513	694	pA30037	1182	pA34087
207	pA31515	695	pA30038	1183	pA34088
208	pA31516	696	pA30039	1184	pA34089
209	pA31517	697	pA30040	1185	pA34090
210	pA31518	698	pA30041	1186	pA34091
211	pA31519	699	pA30042	1187	pA34092

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

212	pA31520	700	pA30044	1188	pA34094
213	pA31521	701	pA30045	1189	pA34095
214	pA31522	702	pA30046	1190	pA34096
215	pA31523	703	pA30047	1191	pA34097
216	pA31545	704	pA30048	1192	pA34098
217	pA31548	705	pA30049	1193	pA34099
218	pA31549	706	pA30050	1194	pA34100
219	pA31558	707	pA32939	1195	pA34101
220	pA31559	708	pA32940	1196	pA34102
221	pA31560	709	pA32941	1197	pA34103
222	pA31561	710	pA32942	1198	pA34104
223	pA29916	711	pA32943	1199	pA34105
224	pA29917	712	pA32944	1200	pA34106
225	pA29918	713	pA32945	1201	pA34107
226	pA29919	714	pA32946	1202	pA34109
227	pA29920	715	pA32947	1203	pA34110
228	pA29921	716	pA32948	1204	pA34111
229	pA29922	717	pA32949	1205	pA34112
230	pA29923	718	pA32950	1206	pA34113
231	pA29924	719	pA32951	1207	pA34115
232	pA29925	720	pA32952	1208	pA34116
233	pA29926	721	pA32953	1209	pA34117
234	pA29927	722	pA32954	1210	pA34118
235	pA29928	723	pA32955	1211	pA34119
236	pA29929	724	pA32956	1212	pA34120
237	pA29930	725	pA32957	1213	pA34121
238	pA29931	726	pA32958	1214	pA34122
239	pA29932	727	pA32959	1215	pA34123
240	pA29933	728	pA32960	1216	pA34124
241	pA29934	729	pA32962	1217	pA34125
242	pA29935	730	pA32963	1218	pA34126
243	pA29937	731	pA32965	1219	pA34127

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

244	pA29938	732	pA32966	1220	pA34128
245	pA29939	733	pA32967	1221	pA34129
246	pA29941	734	pA32968	1222	pA34130
247	pA29942	735	pA32969	1223	pA34131
248	pA29943	736	pA32970	1224	pA34132
249	pA29944	737	pA32971	1225	pA34133
250	pA29945	738	pA32972	1226	pA34134
251	pA29946	739	pA32973	1227	pA34135
252	pA29947	740	pA32977	1231	pA35407
253	pA29948	741	pA32978	1232	pA35408
254	pA29949	742	pA32979	1233	pA35409
255	pA29950	743	pA32980	1234	pA35410
256	pA29951	744	pA32981	1235	pA35411
257	pA29952	745	pA32982	1236	pA35412
258	pA29953	746	pA32983	1237	pA35413
259	pA29954	747	pA32984	1238	pA35414
260	pA29955	748	pA32985	1239	pA35415
261	pA29956	749	pA32987	1240	pA35416
262	pA29957	750	pA32988	1241	pA35417
263	pA29958	751	pA32989	1242	pA35418
264	pA29959	752	pA32990	1243	pA35419
265	pA29960	753	pA32991	1244	pA35420
266	pA29961	754	pA32992	1245	pA35421
267	pA29962	755	pA32993	1246	pA35422
268	pA29963	756	pA32994	1247	pA35423
269	pA29964	757	pA32995	1248	pA35424
270	pA29965	758	pA32996	1249	pA35425
271	pA29966	759	pA32997	1250	pA35426
272	pA29967	760	pA32998	1251	pA35427
273	pA29968	761	pA32999	1252	pA35428
274	pA29969	762	pA33000	1253	pA35429
275	pA29970	763	pA33001	1254	pA35430

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 0】

276	pA29971	764	pA33002	1255	pA35431
277	pA29972	765	pA33004	1256	pA35432
278	pA29973	766	pA33005	1257	pA35434
279	pA29976	767	pA33006	1258	pA35435
280	pA29977	768	pA33007	1259	pA35436
281	pA29978	769	pA33008	1260	pA35437
282	pA29979	770	pA33009	1261	pA35438
283	pA29980	771	pA33010	1262	pA35439
284	pA29981	772	pA33011	1263	pA35440
285	pA29982	773	pA33012	1264	pA35441
286	pA29983	774	pA33014	1265	pA35442
287	pA29984	775	pA33015	1266	pA35443
288	pA29985	776	pA33016	1267	pA35444
289	pA29986	777	pA33017	1268	pA35872
290	pA29987	778	pA33018	1269	pA35873
291	pA29989	779	pA33019	1270	pA35874
292	pA29990	780	pA33020	1271	pA35875
293	pA29991	781	pA33021	1272	pA35876
294	pA29992	782	pA33023	1273	pA35877
295	pA29993	783	pA33024	1274	pA35878
296	pA29994	784	pA33025	1275	pA35879
297	pA29995	785	pA33027	1276	pA35880
298	pA29996	786	pA33028	1277	pA35881
299	pA29997	787	pA33029	1278	pA35882
300	pA29998	788	pA33030	1279	pA35884
301	pA30000	789	pA33031	1280	pA35886
302	pA30001	790	pA33032	1281	pA35887
303	pA30002	791	pA33033	1282	pA35888
304	pA30003	792	pA33035	1283	pA35889
305	pA30004	793	pA33036	1284	pA35890
306	pA30005	794	pA33037	1285	pA35891
307	pA30006	795	pA33038	1286	pA35892

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

308	pA30007	796	pA33040	1287	pA35893
309	pA30008	797	pA33041	1288	pA35895
310	pA30009	798	pA33042	1289	pA35896
311	pA30010	799	pA33043	1290	pA35897
312	pA30011	800	pA33044	1291	pA35898
313	pA30012	801	pA33046	1292	pA35899
314	pA30013	802	pA33047	1293	pA35901
315	pA30014	803	pA33048	1294	pA35902
316	pA29705	804	pA33051	1295	pA35903
317	pA29706	805	pA33053	1296	pA35904
318	pA29707	806	pA33054	1297	pA35905
319	pA29708	807	pA33056	1298	pA35906
320	pA29709	808	pA33057	1299	pA35907
321	pA29710	809	pA33058	1300	pA35908
322	pA29711	810	pA33059	1301	pA35909
323	pA29712	811	pA33060	1302	pA35910
324	pA29713	812	pA33061	1303	pA35911
325	pA29714	813	pA33063	1304	pA35912
326	pA29715	814	pA33065	1305	pA35913
327	pA29716	815	pA33066	1306	pA35914
328	pA29717	816	pA33067	1307	pA35915
329	pA29718	817	pA33068	1308	pA35916
330	pA29719	818	pA33069	1309	pA35917
331	pA29720	819	pA33070	1310	pA35919
332	pA29721	820	pA33071	1311	pA35921
333	pA29722	821	pA33074	1312	pA35922
334	pA29723	822	pA33075	1313	pA35923
335	pA29724	823	pA33076	1314	pA35924
336	pA29725	824	pA33077	1315	pA35925
337	pA29726	825	pA33078	1316	pA35926
338	pA29727	826	pA33079	1317	pA35927
339	pA29728	827	pA33080	1318	pA35928

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 2】

340	pA29729	828	pA33081	1319	pA35929
341	pA29730	829	pA33082	1320	pA35930
342	pA29731	830	pA29819	1321	pA35931
343	pA29732	831	pA29820	1322	pA35932
344	pA29733	832	pA29821	1323	pA35933
345	pA29734	833	pA29822	1324	pA35935
346	pA29735	834	pA29823	1325	pA35936
347	pA29736	835	pA29824	1326	pA35937
348	pA29737	836	pA29825	1327	pA35938
349	pA29738	837	pA29826	1328	pA35939
350	pA29740	838	pA29827	1329	pA35940
351	pA29741	839	pA29828	1330	pA35941
352	pA29742	840	pA29829	1331	pA35942
353	pA29743	841	pA29830	1332	pA35943
354	pA29744	842	pA29831	1333	pA35481
355	pA29745	843	pA29832	1334	pA35482
356	pA29746	844	pA29833	1335	pA35483
357	pA29747	845	pA29834	1336	pA35484
358	pA29748	846	pA29835	1337	pA35485
359	pA29749	847	pA29836	1338	pA35486
360	pA29750	848	pA29837	1339	pA35487
361	pA29751	849	pA29838	1340	pA35488
362	pA29752	850	pA29839	1341	pA35489
363	pA29753	851	pA29840	1342	pA35490
364	pA29754	852	pA29841	1343	pA35491
365	pA29755	853	pA29842	1344	pA35492
366	pA29756	854	pA29843	1345	pA35493
367	pA29757	855	pA29844	1346	pA35494
368	pA29758	856	pA29845	1347	pA35495
369	pA29759	857	pA29846	1348	pA35496
370	pA29760	858	pA29847	1349	pA35497
371	pA29761	859	pA29848	1350	pA35498

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 3】

372	pA29762	860	pA29849	1351	pA35499
373	pA29763	861	pA29850	1352	pA35500
374	pA29764	862	pA29851	1353	pA35501
375	pA29765	863	pA29852	1354	pA35502
376	pA32567	864	pA29853	1355	pA35503
377	pA32568	865	pA29854	1356	pA35504
378	pA32569	866	pA29855	1357	pA35505
379	pA32570	867	pA29856	1358	pA35506
380	pA32571	868	pA29857	1359	pA35507
381	pA32572	869	pA29858	1360	pA35508
382	pA32573	870	pA29859	1361	pA35509
383	pA32574	871	pA29860	1362	pA35510
384	pA32576	872	pA29861	1363	pA35511
385	pA33083	873	pA29862	1364	pA35512
386	pA33084	874	pA29863	1365	pA35513
387	pA33085	875	pA29864	1366	pA35514
388	pA33086	876	pA29865	1367	pA35515
389	pA33087	877	pA29866	1368	pA35516
390	pA33088	878	pA29867	1369	pA35517
391	pA33089	879	pA29868	1370	pA35518
392	pA33090	880	pA29869	1371	pA35519
393	pA33091	881	pA29870	1372	pA35520
394	pA33092	882	pA29871	1373	pA35521
395	pA33094	883	pA10142	1374	pA35522
396	pA33095	884	pA12546	1375	pA35523
397	pA33096	885	pA21838	1376	pA35524
398	pA33097	886	pA21839	1377	pA35525
399	pA33098	887	pA21840	1378	pA35526
400	pA33099	888	pA21841	1379	pA35527
401	pA33100	889	pA21842	1380	pA35528
402	pA33101	890	pA33240	1381	pA35529
403	pA33102	891	pA33241	1382	pA35530

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 4】

404	pA33103	892	pA33242	1383	pA35531
405	pA33104	893	pA33244	1384	pA35532
406	pA33105	894	pA33246	1385	pA35533
407	pA33106	895	pA33247	1386	pA35534
408	pA33107	896	pA33248	1387	pA35535
409	pA33108	897	pA33249	1388	pA35536
410	pA33109	898	pA33250	1389	pA35537
411	pA33110	899	pA33252	1390	pA35538
412	pA33111	900	pA33253	1391	pA35539
413	pA33112	901	pA33254	1392	pA35540
414	pA33114	902	pA33255	1393	pA35541
415	pA33115	903	pA33258	1394	pA35542
416	pA33116	904	pA33259	1395	pA35543
417	pA33117	905	pA33260	1396	pA35544
418	pA33118	906	pA33261	1397	pA35545
419	pA33119	907	pA33262	1398	pA35546
420	pA33120	908	pA33263	1399	pA35547
421	pA33122	909	pA33264	1400	pA35548
422	pA33123	910	pA33267	1401	pA35549
423	pA33124	911	pA33269	1402	pA35550
424	pA33125	912	pA33270	1403	pA35551
425	pA33129	913	pA33271	1404	pA35552
426	pA33130	914	pA33272	1405	pA35553
427	pA33131	915	pA33273	1406	pA35554
428	pA33132	916	pA33274	1407	pA35555
429	pA33133	917	pA33276	1408	pA35556
430	pA33134	918	pA33278	1409	pA35557
431	pA33135	919	pA33279	1410	pA35558
432	pA33136	920	pA33280	1411	pA35559
433	pA33137	921	pA33281	1412	pA35560
434	pA33138	922	pA33282	1413	pA35561
435	pA33139	923	pA33285	1414	pA35562

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 5】

436	pA33140	924	pA33286	1415	pA35563
437	pA33141	925	pA32582	1416	pA35564
438	pA33142	926	pA32586	1417	pA35565
439	pA33143	927	pA32589	1418	pA35566
440	pA33144	928	pA32591	1419	pA35567
441	pA33145	929	pA32594	1420	pA35568
442	pA33146	930	pA32595	1421	pA35569
443	pA33147	931	pA32596	1422	pA35570
444	pA33148	932	pA32600	1423	pA35571
445	pA33149	933	pA32601	1424	pA35572
446	pA33150	934	pA32602	1425	pA35573
447	pA33151	935	pA32603	1426	pA35574
448	pA33152	936	pA32605	1427	pA35575
449	pA33153	937	pA32606	1428	pA35576
450	pA33154	938	pA32608	1429	pA35577
451	pA33159	939	pA32609	1430	pA35578
452	pA33160	940	pA32614	1431	pA35579
453	pA33162	941	pA32616	1432	pA35580
454	pA33163	942	pA32620	1433	pA35581
455	pA33164	943	pA32622	1434	pA35582
456	pA33165	944	pA32623	1435	pA35583
457	pA33166	945	pA32625	1436	pA35584
458	pA33167	946	pA32629	1437	pA35585
459	pA33168	947	pA32639	1438	pA35586
460	pA32557	948	pA32650	1439	pA35587
461	pA32558	949	pA32651	1440	pA35588
462	pA32559	950	pA32652	1441	pA35589
463	pA32560	951	pA32655	1442	pA35590
464	pA32562	952	pA32657	1443	pA35591
465	pA32563	953	pA32659	1444	pA35592
466	pA32565	954	pA32661	1445	pA35593
467	pA32566	955	pA32662	1446	pA35594

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 6】

468	pA33169	956	pA32663	1447	pA35595
469	pA33171	957	pA32664	1448	pA35596
470	pA33172	958	pA32665	1449	pA35597
471	pA33173	959	pA32666	1450	pA35598
472	pA33174	960	pA32667	1451	pA35599
473	pA33175	961	pA32668	1452	pA35600
474	pA33176	962	pA32669	1453	pA35601
475	pA33177	963	pA32670	1454	pA35602
476	pA33178	964	pA32671	1455	pA35603
477	pA33179	965	pA32672	1456	pA35604
478	pA33180	966	pA32675	1457	pA35605
479	pA33181	967	pA32678	1458	pA35606
480	pA33182	968	pA32680	1459	pA35607
481	pA33184	969	pA32682	1460	pA35608
482	pA33185	970	pA32684	1461	pA35609
483	pA33186	971	pA32686	1462	pA35610
484	pA33188	972	pA32688	1463	pA35611
485	pA33189	973	pA32690	1464	pA35612
486	pA33190	974	pA32692	1465	pA35613
487	pA33191	975	pA32696	1466	pA35614
488	pA33192	976	pA32697		

10

20

30

【実施例】

【0066】

実施例 1：天然型 - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼ (B12GT) の生体内産生

5つの異なる生物由来の既知の - 1, 2 - UDP - グリコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド (表 1. 1) を合成し (Twist Bioscience)、pARZ4 発現ベクターに挿入した。ポリヌクレオチドは、完全長遺伝子として順序付けされるか、遺伝子フラグメントとして順序付けされてから、ギブソン・アセンブリを使用して組み立てられた。ヒートショック法で組み換えベクターを使用して *E. coli* HMS174 (DE3) (Novagen) を形質転換し、それによって組み換え微生物を調製した。

40

【0067】

形質転換された各組み換え微生物を 1 ml の LB - カナマイシン培地に植菌し、37 で一晚振盪培養した。培養物を 5 ml の TB - カナマイシン培地に接種し、37 で 2 時間、続いて 25 で 1 時間増殖させた。培養物を 50 μ L の 50 mM IPTG で誘導し、一晚増殖させた。最後に、培養物を最高速度で 5 分間遠心分離し、- 80 で保存した。

50

【 0 0 6 8 】

【 表 2 】

表 1. 1 : 天然 β -1, 2-UDP-グリコシルトランスフェラーゼ

プラスミド ID	生物
pA101 32	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i> (米)
pA101 43	<i>Solanum lycopersicum</i> (トマト)
pA125 49	<i>Lycium barbarum</i> (Barbary matrimony-vine)
pA125 50	<i>Solanum lycopersicum</i> (トマト)
pA284 22	<i>Solanum tuberosum</i> (ジャガイモ)

10

20

【 0 0 6 9 】

実施例 2 : - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼ (B 1 2 G T) の精製

実施例 1 で作製した微生物を溶解緩衝液 (リゾチーム、DNAse I、Bugbuster、300 mL の 20 mM の HEPES pH 7.5、500 mM の NaCl、及び 20 mM のイミダゾール) に溶解した。2 ~ 3 個のガラスビーズが各ウェルに加えられ、25、220 rpm で 30 分間振盪することによって破壊された。破碎液を 2200 x g で 6 ~ 10 分間遠心分離した。得られた上清を Ni-NTA プレートにロードし、室温で 10 分間振盪した。プレートを 100 x g で 4 分間遠心分離し、続いて 500 μ L の結合緩衝液 (300 mL の 20 mM の HEPES pH 7.5、500 mM の NaCl、20 mM のイミダゾール) で 2 回洗浄し、2 分間遠心分離 (500 x g) した。タンパク質を 150 μ L の溶出緩衝液 (15 mL の 20 mM の HEPES pH 7.5、500 mM の NaCl、500 mM のイミダゾール) で溶出し、0.25 の最大振盪速度で 1 分間振盪し、続いて 500 x g で 2 分間遠心分離した。回収したタンパク質を酵素活性評価用緩衝液 (50 mM の HEPES pH 7.5、50 mM の NaCl) 中で脱塩した。

30

【 0 0 7 0 】

実施例 3 : ADP - グルコース及び GDP - グルコースを使用した - 1, 2 - グリコシルトランスフェラーゼ (B 1 2 G T) 活性の測定

野生型 - 1, 2 - UDP - グリコシルトランスフェラーゼ、pA10132、pA10143、及び pA12549 を、ADP - グルコース及び GDP - グルコースに対する活性についてアッセイした。精製タンパク質を、pH 7.8 の 50 mM の MOPS 緩衝液中の 0.5 mM の RA99 (99% 純度の Reb A)、2 mM の NDP - グルコース (ADP - グルコースまたは GDP - グルコース) と 30 で 72 時間反応させた。図 1 に示すように、Reb A から Reb D への変換は、Agilent 6470 QQQ 質量分析計を使用した液体クロマトグラフィー質量分析 (LCMS) によって監視した (カラム : Waters ACQUITY UPLC HSS T3 カラム、100 mm x

40

50

2.1 mm)。QQQは、多重反応監視(MS/MS)によって実行され、本発明のステビオール配糖体を正確に定量した。てADP-グルコースまたはGDP-グルコースを反応糖供与体とし使用した場合、3つの野生型B12GTは全て最小限のReb AからReb D活性を示した(図2)。

【0071】

実施例4：天然スクロースシンターゼの生体内産生

7つの異なる生物由来のスクロースシンターゼ(SuSys)のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド(表2)を合成し(Twist Bioscience)、pARZ4発現ベクターに挿入した。ポリヌクレオチドは、完全長遺伝子として順序付けされるか、遺伝子フラグメントとして順序付けされてから、ギブソン・アセンブリを使用して組み立てられた。ヒートショック法で組み換えベクターを使用してE. coli NEBT7EL(New England Biolabs)を形質転換し、それによって組み換え微生物を調製した。

【0072】

形質転換された各組み換え微生物を1mlのLB-カナマイシン培地に植菌し、37で一晩振盪培養した。培養物を5mlのTB-カナマイシン培地に接種し、37で2時間、続いて25で1時間増殖させた。培養物を50µLの50mM IPTGで誘導し、一晩増殖させた。最後に、培養物を最高速度で5分間遠心分離し、-80で保存した。

【0073】

【表3】

表2：野生型スクロースシンターゼ配列

プラスミド ID	生物
pA10142	Arabidopsis thaliana
pA12546	Coffea arabica
pA21838	Acidithiobacillus caldus
pA21839	Nitrosomonas europaea
pA21840	Denitrovibrio acetiphilus
pA21841	Thermosynechococcus elongatus
pA21842	Oryza sativa subsp. japonica (コメ)

10

20

30

40

50

【0074】

実施例5：天然スクロースシンターゼの精製

実施例4で作製した微生物を溶解緩衝液（リゾチーム、DNAse I、Bugbuster、300 mLの20 mMのHEPES pH 7.5、500 mMのNaCl、及び20 mMのイミダゾール）に溶解した。2～3個のガラスビーズが各ウェルに加えられ、25、220 rpmで30分間振盪することによって破壊された。破碎液を2200 × gで6～10分間遠心分離した。得られた上清をNi-NTAプレートにロードし、室温で10分間振盪した。プレートを100 × gで4分間遠心分離し、続いて500 μLの結合緩衝液（300 mLの20 mMのHEPES pH 7.5、500 mMのNaCl、20 mMのイミダゾール）で2回洗浄し、2分間遠心分離（500 × g）した。タンパク質を150 μLの溶出緩衝液（15 mLの20 mMのHEPES pH 7.5、500 mMのNaCl、500 mMのイミダゾール）で溶出し、0.25の最大振盪速度で1分間振盪し、続いて500 × gで2分間遠心分離した。回収したタンパク質を酵素活性評価用緩衝液（50 mMのMOPS pH 6.5、50 mMのNaCl）中で脱塩した。

【0075】

実施例6：UDP、GDP、ADPによるスクロースシンターゼ活性の測定

実施例5からの精製酵素を、50 mMのMOPS緩衝液（pH 6.5）及び50 mMのNaCl中で50 mMのスクロース及び5 mMのヌクレオチド（ADP、GDPまたはUDP）と60 で24時間反応させた。NDPからNDP-グルコースへの変換は、Agilent 6545 QTOF質量分析計（カラム：Agilent HILIC-OH 150 × 2.1 mm）を使用した液体クロマトグラフィー質量分析（LCMS）によって監視した。野生型スクロースシンターゼは、3つのヌクレオチドすべてに対して活性であった（図3）。

【0076】

実施例7：ワンポット反応でのReb AからReb Dへの変換

B12GT及びSuSyを含むワンポット反応を実施し、SuSyによって生成されたADPグルコースを使用してReb AをReb Dに変換する能力を実証した。精製B12GT（pA10143（図4（上））またはpA12549（図4（下）））及び精製SuSy（pA10142、pA12546、pA21838、pA21839、pA21840、pA21841、またはpA21842）を、50 mMのMOPS緩衝液（pH 6.5）、3.0 mMのMgCl₂及び50 mMのNaCl中の0.5 mg/mLのRA99、50 mMのスクロース、及び5 mMのADPと30 で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMSによって監視した。全てのワンポット反応でReb AからReb Dを生成することができた（図4）。pA10143を含むワンポット反応によって、生成されたReb DをReb M2に更に変換した。

【0077】

実施例8：部位飽和突然変異誘発によるpA10143の活性の改善

pA10143によってコードされるB12GTの相同性モデルは生成され、タンパク質の活性部位残基を同定するために使用された。以下の20個の活性部位残基位置が部位飽和突然変異誘発のために選択された。81、82、88、139、178、185、260、284、317、320、324、332、336、339、341、358、359、360、362、363。架橋オリゴを使用するギブソン・アセンブリは、pA10143の217個の単一点突然変異体の変異体（配列番号6～222）を作製するために使用された。各B12GT変異体は実施例2と同様に発現、精製された。各B12GT変異体は、SuSy、pA10142とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB12GT及びSuSyを、50 mMのリン酸緩衝液（pH 7）、3.0 mMのMgCl₂及び50 mMのNaCl中の4 mg/mLのRA50、40 mMのスクロース、及び1 mMのADPと30 で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMSによって監視した。いくつかの変異体は親pA10143に比べて活性の改善を示した（図5）。活性部位の位置358、341、及び317の活性が最も大きく改善さ

れた（図6）。

【0078】

実施例9：コンピュータによる設計によって引き起こされる p A 1 0 1 4 3 の活性の改善

p A 1 0 1 4 3 によってコードされる B 1 2 G T の相同性モデルを、p A 1 0 1 4 3 を改善するためのコンピュータによる設計への入力として使用した。コンピュータによる設計は、B 1 2 G T の安定性及び発現を改善するために実施された。93種類のコンピュータによる設計物は実験的検証のために選択される（配列番号223～315）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例1と同様に構築された。各 B 1 2 G T 変異体は実施例2と同様に発現、精製された。各 B 1 2 G T 変異体は、S u S y、p A 1 0 1 4 2 とのワンポット反応でアッセイされた。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、50mMのリン酸緩衝液（pH7）、3.0mMのMgCl₂及び50mMのNaCl中の4mg/mLのRA50、40mMのスクロース、及び1mMのADPと30 で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMSによって監視した。いくつかの変異体は、親 p A 1 0 1 4 3 に比べて、発現及び/または R e b D 変換の改善を示した（18%の変換率、39uMの精製タンパク質、表3）。

【0079】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 3 : p A 1 0 1 4 3 の上位のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA29938	60.5	79.2
pA29923	44.5	24.6
pA29955	34.5	48
pA29979	34.4	56.4
pA29977	25.9	68
pA29983	25.7	65.3
pA29920	25.3	21.3
pA29932	25	74.1
pA29934	22	54.6
pA29939	21.8	38.5
pA29953	18.4	42.7
pA29918	16.1	119.5
pA29984	14	32.6
pA29967	13.3	38.2

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

pA30006	12.7	10
pA29957	11.2	22.5
pA29963	10.4	23.2
pA29944	9.5	64.5
pA29961	9.1	28
pA29916	8	35.5
pA29949	7.9	36.4
pA29966	7.9	22.8
pA29951	7.8	45.6
pA30008	7.7	7.6
pA29921	7.4	15.2
pA29981	7.1	39.8
pA29973	6.7	33.2
pA29995	5.2	61.9
pA29985	5	65.1
pA29969	4.8	22.6
pA29950	4.8	46.2
pA29931	4.7	22.5
pA29968	4.6	51.1
pA29933	4.6	8.6
pA30007	4.6	8
pA29917	4.5	26.6
pA29992	4.4	37.7
pA29978	4.4	44.6
pA29960	4.3	19
pA29986	4.3	17.5
pA29919	3.8	14.3
pA29942	3.7	43.3
pA29954	3.6	10.8
pA29970	3.5	13.4
pA29996	3.4	39.8
pA29922	2.9	13.2

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

pA29990	2.7	35.5
pA29926	2.5	81
pA29991	2.4	52.8
pA29964	2.3	14
pA29987	2.2	67.6
pA29937	2.1	10.4
pA29925	1.5	21.9
pA30003	1.5	30.4
pA29952	1.4	9.1
pA29941	1.4	9.8
pA29993	1.3	55.7
pA29971	1.3	11.1
pA29998	1.2	32.3
pA29935	1.2	14.6
pA30005	1.2	6.5
pA30001	1	37.6
pA29945	1	7.7
pA29962	1	6.3
pA29948	1	9.8
pA29980	0.9	14
pA29959	0.9	38.5
pA29976	0.8	17.8
pA29927	0.7	12
pA29989	0.7	35.3
pA29946	0.6	9.8
pA29928	0.6	39.5
pA29947	0.6	8.9
pA29924	0.4	130.4
pA29972	0.4	56.6
pA30009	0.3	6.4
pA29982	0.3	33

10

20

30

40

【0080】

pA10143のコンピュータによる設計は、更に、共進化情報により、B12GTの安定性と発現を改善するために実施された。60種類のコンピュータによる設計物は実験的検証のために選択された(配列番号316~375)。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例1と同様に構築された。各B12GT変異体は実施例2と同様に発現、精製された。各B12GT変異体は、SuSy、pA10142とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB12GT及びSuSyを、50mMのリン酸緩衝液(pH7)、3.0mMのMgCl₂及び50mMのNaCl中の4mg/mLのRA50、40mMのスクロース、及び1mMのADPと30 で24時間反応させた。生成

50

物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に LCMS によって監視した。コンピュータによる設計物の変異体は、親 p A 1 0 1 4 3 に比べて、発現及び / または R e b D 変換の改善を示した (4 . 7 % の変換率、 3 5 u M の精製タンパク質、表 4)。

【 0 0 8 1 】

【表 5 - 1】

表 4 : p A 1 0 1 4 3 の上位のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA29711	6.7	45.4
pA29743	5.9	18.6
pA29733	5.6	27.8
pA29734	5.1	5.4
pA29713	3	20
pA29717	2.3	41.6
pA29729	2.1	12.4
pA29745	2.1	40.2
pA29741	1.6	27.7
pA29742	1.5	7.5
pA29723	1.3	30.4
pA29763	1.3	24.7
pA29719	1.1	29.3
pA29747	0.9	34.4
pA29735	0.9	21.1
pA29765	0.8	23.7
pA29740	0.8	12.5
pA29707	0.7	36.8
pA29751	0.7	28.3
pA29720	0.7	23.2
pA29705	0.7	38

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

pA29715	0.7	30
pA29760	0.7	18.2
pA29721	0.6	11.3
pA29757	0.5	27.6
pA29749	0.5	16.1
pA29709	0.5	45.5
pA29710	0.4	6.4
pA29759	0.4	24.5
pA29712	0.4	4.5
pA29764	0.4	0.6
pA29744	0.4	26
pA29736	0.4	24.8
pA29727	0.4	21.2
pA29737	0.4	31.1
pA29738	0.4	9.6
pA29725	0.4	19.8
pA29728	0.3	17.6
pA29731	0.3	3.2
pA29752	0.3	26.6
pA29718	0.3	3.4
pA29753	0.3	36.6
pA29746	0.2	3.6
pA29730	0.2	1.9
pA29750	0.2	1.6
pA29748	0.2	2.7
pA29722	0.2	ND
pA29756	0.1	1.7
pA29724	0.1	ND
pA29761	0.1	35.3
pA29708	0.1	1.7
pA29758	0.1	6.9
pA29732	0.1	ND

10

20

30

40

【0082】

pA10143のコンピュータによる設計も実施し、活性部位の変異を組み合わせた。9種類のコンピュータによる設計が実験的検証のために選択された(配列番号376~384)。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例1と同様に構築された。各B12GT変異体は実施例2と同様に発現、精製された。各B12GT変異体は、SuSy、pA10142とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB12GT及びSuSyを、50mMのリン酸緩衝液(pH7)、3.0mMのMgCl₂及び50mMのNaCl中の4mg/mLのRA50、40mMのスクロース、及び1mMのADPと30 で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMS

50

によって監視した。上位の設計物である p A 3 2 5 7 6 は、親 p A 1 0 1 4 3 に匹敵する活性を示した（21%の変換率、表5）。

【0083】

【表6】

表5：pA10143の上位のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA32576	20.1	63.1
pA32568	0.9	20
pA32572	0.7	21.8
pA32569	0.7	25.2
pA32571	0.6	18.7
pA32570	0.6	24.5
pA32573	0.5	24.3
pA32567	0.5	21.7
pA32574	0.3	14.7

10

20

【0084】

追加の変異を組み合わせるために、pA10143のコンピュータによる設計も実施した。75種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された（配列番号385～459）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例1と同様に構築された。各B12GT変異体は実施例2と同様に発現、精製された。各B12GT変異体は、SuSy、pA10142とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB12GT及びSuSyを、50mMのリン酸緩衝液（pH7）、3.0mMのMgCl₂及び50mMのNaCl中の4mg/mLのRA50、40mMのスクロース、及び1mMのADPと30で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMSによって監視した。コンピュータによる設計物の変異体は、Reb AからReb Dへの変換を示した（表6）。

30

【0085】

40

50

【表 7】

表 6 : p A 1 0 1 4 3 の上位のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA33106	3.9	9.4
pA33091	2.7	11.8
pA33123	2.2	10.2
pA33137	1.1	57.5
pA33154	0.7	15.8
pA33149	0.6	14.7
pA33088	0.6	13.4
pA33086	0.5	17.3
pA33110	0.5	19.7
pA33083	0.2	21.9
pA33085	0.1	15.3
pA33165	0.1	17.2

10

20

【 0 0 8 6 】

実施例 1 0 : コンピュータによる設計によって引き起こされる p A 1 2 5 4 9 の活性の改善

p A 1 2 5 4 9 によってコードされる B 1 2 G T の相同性モデルを、 p A 1 2 5 4 9 を改善するためのコンピュータによる設計への入力として使用した。 p A 1 2 5 4 9 のコンピュータによる設計を、同種 B 1 2 G T に有益であることが公知の活性部位の変異を組み合わせるために実施した。 8 種類のコンピュータによる設計物は実験的検証のために選択された (配列番号 4 6 0 ~ 4 6 7) 。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例 1 と同様に構築された。各 B 1 2 G T 変異体は実施例 2 と同様に発現、精製された。各 B 1 2 G T 変異体は、 S u S y 、 p A 1 0 1 4 2 とのワンポット反応でアッセイされた。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、 5 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 7) 、 3 . 0 m M の M g C l ₂ 及び 5 0 m M の N a C l 中の 0 . 5 m g / m L の R A 9 9 、 1 0 m M のスクロース、及び 1 m M の A D P と 3 0 で 2 4 時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に L C M S によって監視した。いくつかの変異体は、親 p A 1 2 5 4 9 に比べて、発現及び / または R e b D 変換の改善を示した (表 7) 。

30

40

【 0 0 8 7 】

50

【表 8】

表 7：上位の p A 1 2 5 4 9 のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA32563	12.7	9.2
pA32562	8	6.8
pA32565	6.5	38.9
pA32560	4.6	10.1
pA32566	4.5	11.2
pA32558	3.6	11.6
pA32559	1.7	12.1

10

【 0 0 8 8 】

p A 1 2 5 4 9 のコンピュータによる設計は、同種 B 1 2 G T に有益であることが公知の変異を組み合わせるために実施された。6 7 種類のコンピュータによる設計物は実験的検証のために選択された（配列番号 4 6 8 ~ 5 3 4）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例 1 と同様に構築された。各 B 1 2 G T 変異体は実施例 2 と同様に発現、精製された。各 B 1 2 G T 変異体は、S u S y、p A 1 0 1 4 2 とのワンポット反応でアッセイされた。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、5 0 m M のリン酸緩衝液（p H 7）、及び 5 0 m M の N a C l 中の 0 . 5 m g / m L の R A 9 9、1 0 m M のスクロース、及び 1 m M の A D P と 3 0 で 2 4 時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に L C M S によって監視した。1 つのコンピュータ設計物の変位体は、R e b A から R e b D への変換の改善を示した（表 8）。

20

【 0 0 8 9 】

30

40

50

【表 9】

表 8 : 上位の p A 1 2 5 4 9 のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA33202	25.2	11.4
pA33194	6.6	16.7
pA33196	5.3	14.1
pA33236	4.8	14.1
pA33200	4.2	8.8
pA33223	3	6.1
pA33177	1.9	9.9
pA33217	1.8	22.7
pA33205	1.7	10.6
pA33229	1.3	11
pA33176	1	16.7
pA33235	0.9	14.4
pA33174	0.5	15.2
pA33185	0.5	15.3
pA33171	0.5	15.8
pA33173	0.5	9.5
pA33220	0.4	7.8
pA33204	0.4	11.3
pA33180	0.3	10.5
pA33186	0.3	5.9
pA33172	0.3	13.7
pA33179	0.3	11.7
pA33175	0.2	10.8
pA33182	0.2	15.1
pA33232	0.2	18

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

実施例 1 1 : コンピュータによる設計によって引き起こされるシロイヌナズナの S U S 1 の活性及び発現の改善

シロイヌナズナ由来の S U S 1 の結晶構造は、p A 1 0 1 4 2 を改良するためのコンピュータによる設計への入力として使用された。コンピュータによる設計は、S u S y の安定性及び発現を改善するために実施された。3 5 種類のコンピュータによる設計物は実験的検証のために選択された (配列番号 8 9 0 ~ 9 2 4) 。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例 1 と同様に構築された。各 S u S y 変異体は実施例 2 と同様に発現、精製された。各 S u S y 変異体は、B 1 2 G T、p A 1 0 1 4 3 とのワンポッ

50

ト反応でアッセイされる。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、5 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 7)、及び 5 0 m M の N a C l 中の 4 m g / m L の R A 5 0、4 0 m M のスクロース、及び 1 m M の A D P と 3 0 で 2 4 時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に L C M S によって監視した。いくつかの変異体は、親 p A 1 0 1 4 2 に比べて、発現及び / または R e b D 変換の改善を示した。上位の設計物は、収量で最大 2 倍の改善、発現で 3 倍の改善を示した (4 3 % の変換率、8 u M の精製タンパク質、表 9)

【 0 0 9 1 】

【 表 1 0 - 1 】

表 9 : p A 1 0 1 4 2 の上位のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA33271	79.8	23.2
pA33264	79.7	11.3
pA33276	79	17.5
pA33273	78.1	11.2
pA33272	77.9	8.8
pA33279	77.6	24.6
pA33281	76.6	18.8
pA33248	76.4	32.9

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 2】

pA33263	76.3	19.8
pA33285	75.9	17.2
pA33247	75.4	26.6
pA33261	74.5	12.1
pA33240	74	20.5
pA33262	74	21
pA33260	72.7	8.8
pA33259	71	23.7
pA33280	70.2	26.1
pA33267	70	20
pA33282	70	21.7
pA33269	68.3	12.5
pA33242	65.5	17.6
pA33254	64.8	15.9
pA33241	62.8	22.8
pA33274	57.8	8.6
pA33270	57.1	12.2
pA33244	45.7	26
pA33278	44.8	9.4
pA33258	42.3	25.1
pA33286	38.1	13
pA33249	26.4	16
pA33246	20.8	24.5
pA33250	16.8	15.1
pA33253	10.6	2.8
pA33255	1.6	11.2
pA33252	0.3	4.5

10

20

30

40

【 0 0 9 2】

実施例 1 2 : A D P グルコース依存性 B 1 2 G T のコンピュータによる設計

p A 2 8 4 2 2 の B 1 2 G T 変異体の構造モデルが生成され、コンピュータによる設計の開始点として使用された。コンピュータによる設計は、B 1 2 G T の安定性及び発現を改善するために実施された。5 2 種類のコンピュータによる設計物は実験的検証のために選択される（配列番号 5 3 5 ~ 5 8 6）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例 1 と同様に構築された。各 B 1 2 G T 変異体は実施例 2 と同様に発現、精製される。各 B 1 2 G T 変異体は、p A 2 1 8 3 8 の S u S y 変異体とのワンポット反応でアッセイされた。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、5 0 m M のリン酸緩衝液（p H

50

6)、3 mMのMgCl₂及び50 mMのNaCl中の100 mg/mLのRA50、250 mMのスクロース、及び0.5 mMのADPと60 で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMSによって監視した。いくつかの設計された酵素は良好に発現し、Reb AからReb Dへの変換に活性であった(表10)。

【0093】

【表11-1】

表10：上位のB12GTのコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA29798	76.1	57.3
pA29781	67.1	51.9
pA29807	64.9	17.9
pA29795	61.7	64.8
pA29796	57.8	74.3
pA29771	54.3	49.3
pA29775	53.6	67
pA29770	45	61
pA29808	43.4	95.1
pA29774	42.8	86.8
pA29784	38.5	44.1
pA29767	33.8	37
pA29801	16.9	74.7
pA29779	13	39.6
pA29773	12	49.7
pA29800	9.4	95.8
pA29799	9.3	39.7
pA29789	8.7	75.8
pA29804	7.9	88.1
pA29797	7.4	69.3
pA29806	7	77.9
pA29769	6.4	37.9
pA29787	5.2	68.6
pA29805	4.8	38.4

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

pA29817	3.3	37.3
pA29790	3.2	77.5
pA29802	3.1	35.8
pA29792	3	71.7
pA29816	2.2	30.9
pA29782	2.1	58.1
pA29809	1.9	56.5
pA29780	1.6	57.3
pA29783	1.3	41.3
pA29811	1	77.4
pA29813	1	37.3
pA29794	0.7	32.8
pA29785	0.6	19.6
pA29814	0.4	21.4
pA29791	0.4	17.5
pA29788	0.4	7.7
pA29812	0.1	44.6
pA29776	0.1	37.8

10

20

30

【0094】

コンピュータによる設計は、更に、共進化情報を使用して、B12GTの安定性と発現を改善するために実施される。85種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された（配列番号587～671）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例1と同様に構築された。各B12GT変異体は実施例2と同様に発現、精製された。各B12GT変異体は、pA21838のSuSy変異体とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB12GT及びSuSyを、50mMのリン酸緩衝液（pH6）、3mMのMgCl₂及び50mMのNaCl中の100mg/mLのRA50、250mMのスクロース、及び0.5mMのADPと60 で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMSによって監視した。いくつかの設計された酵素は良好に発現し、Reb AからReb Dへの変換に活性であった（表11）。

40

【0095】

50

【表 1 2 - 1】

表 1 1 : 上位の B 1 2 G T のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA29620	92.6	93.7
pA29619	91.8	29.7
pA29665	90.5	142.7
pA29621	88.7	62
pA29661	87	29.4
pA29618	82.5	77.7
pA29660	56	7.6
pA29615	54.4	191.9
pA29616	53.8	123
pA29646	40.4	60.8
pA29617	34.7	150.1
pA29642	32.3	71.3
pA29636	24.9	28.1
pA29662	22.7	12.4
pA29639	21.9	49.3
pA29669	21.4	60.3
pA29625	21.2	11.4
pA29632	20.9	94.1
pA29676	18.7	74.5
pA29664	18.5	19.7
pA29640	16.7	37.6
pA29683	13.2	19.9
pA29672	12.9	19
pA29624	12.7	66.8
pA29638	12.2	29.4
pA29671	11.8	12.6
pA29675	10.9	23
pA29650	9.9	18.9
pA29677	9.2	48.8
pA29657	8.5	11.8
pA29668	8.5	74.8
pA29666	8.1	108
pA29630	7.7	20.7
pA29652	7.1	11.2

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

pA29623	7	25.3
pA29667	6.7	67.9
pA29684	6.5	105.2
pA29678	6.4	15
pA29654	6.1	22.2
pA29685	5.8	91.7
pA29634	5.2	47.7
pA29627	4.9	26.6
pA29682	4.9	82.9
pA29622	4.8	68.4
pA29659	3.9	31.1
pA29635	3.9	29.1
pA29648	3.5	10.1
pA29633	3.4	9.7
pA29673	3.3	50.6
pA29626	3.2	26.5
pA29680	3	18.6
pA29679	1.9	15.2
pA29681	1.9	106.5
pA29631	1.6	34.9
pA29637	1.6	77.7
pA29687	0.9	44
pA29695	0.7	56.4
pA29690	0.7	36.3
pA29686	0.4	24.8
pA29689	0.4	52.7
pA29628	0.4	5.2
pA29688	0.4	11
pA29629	0.3	102.1
pA29696	0.2	31
pA29703	0.2	29
pA29698	0.1	43.9

10

20

30

40

【0096】

コンピュータによる設計は、更に、埋もれたタンパク質コアを再設計及び再パッキングすることにより、B12GTの安定性と発現を改善するために実施された。35種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された(配列番号672~706)。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例1と同様に構築された。各B12GT変異体は実施例2と同様に発現、精製された。各B12GT変異体は、pA21838のSuSy変異体とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB12GT及びSuSyを、50mMのリン酸緩衝液(pH6)、3mMのMgCl₂及び50mMのNaCl中の100mg/mLのRA50、250mMのスクロース、及び0.5mMの

50

A D P と 6 0 で 2 4 時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に L C M S によって監視した。いくつかの設計された酵素は良好に発現し、R e b A から R e b D への変換に活性であった（表 1 2 ）。

【 0 0 9 7 】

【表 1 3 - 1 】

表 1 2 : 上位の B 1 2 G T のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA30048	86.4	96.8
pA30047	50.9	106.7
pA30027	48.7	168
pA30050	35.9	185.3
pA30037	26.7	95.9
pA30019	24.4	93.4
pA30034	23.5	69.8
pA30028	14.1	229.9
pA30031	13.8	9.6
pA30036	13.3	107.1
pA30017	12.9	68.2
pA30040	8.5	48.2
pA30049	8.3	209.7
pA30032	8.3	7.6
pA30039	7.3	92.1
pA30042	4.8	60.4
pA30029	4.5	141
pA30035	3.6	21.6
pA30026	3	158.6
pA30030	2.8	280.3

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

pA30041	2.2	69.1
pA30025	1.9	74.8
pA30045	1.9	70
pA30046	1.4	103.1
pA30018	1.2	38.5
pA30038	1.1	94.4
pA30015	0.8	13.3
pA30020	0.7	69.8
pA30023	0.7	128.2
pA30016	0.3	16.3
pA30033	0.2	16.8

10

20

【0098】

コンピュータによる設計は、更に、同種 B 1 2 G T に有益であることが公知の変異を組み合わせるにより、B 1 2 G T を改善するために実施された。59種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された（配列番号707～765）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例1と同様に構築された。各 B 1 2 G T 変異体は実施例2と同様に発現、精製される。各 B 1 2 G T 変異体は、pA21838のSuSy変異体とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB 1 2 G T及びSuSyを、50mMのリン酸緩衝液（pH6）、及び50mMのNaCl中の100mg/mLのRA50、250mMのスクロース、及び0.5mMのADPと60で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMSによって監視した。いくつかの設計された酵素は良好に発現し、Reb AからReb Dへの変換に活性であった（表13）。上位の設計物を区別するために、それらは、より低いタンパク質濃度で再アッセイされた（表14）。

30

【0099】

【表 1 4 - 1】

表 1 3 : 上位の B 1 2 G T のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA32962	92.3	95.6
pA32940	91.9	122.6
pA32945	91.3	74.5
pA32947	91.2	80

40

50

【表 1 4 - 2】

pA32952	90.9	83.3
pA32941	90.8	114.3
pA32946	90.7	75.8
pA32943	90.3	113.7
pA32942	89.4	120.4
pA32939	85.7	115.5
pA32944	77.4	31.6
pA32970	33.4	56.9
pA32960	30.3	12.6
pA32956	30.1	44.1
pA32951	27.5	81.2
pA32966	26.2	31.6
pA32967	12.6	64.9
pA32954	8	111
pA32950	6.6	48.2
pA32949	6.5	16.7
pA32978	5.1	33.9
pA32971	4.1	19.6
pA32988	3.9	18.7
pA33004	3.4	15.1
pA32987	3.3	17.6
pA32981	3.1	32.8
pA32958	2.7	26.6
pA32959	2.2	20.2
pA32963	1.8	13.4
pA32953	1.7	97
pA32973	1.3	64
pA32948	1.2	10.9
pA32965	1.2	7.6
pA32957	0.8	14.7
pA32955	0.7	19.1
pA32998	0.7	30

10

20

30

40

【表 1 4 - 3】

pA33001	0.7	12.8
pA32982	0.3	16
pA32997	0.2	32.2
pA33002	0.2	14.2

50

【 0 1 0 0 】

【 表 1 5 】

表 1 4 : 上位の B 1 2 G T のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA32947	82	89
pA32941	81.4	154
pA32940	78.3	120
pA32946	77.8	85.5
pA32962	60	96.1
pA32945	59.4	65.7
pA32943	55.3	102.9
pA32939	42	150.1
pA32942	40.5	96
pA32952	39.6	120.2
pA32944	28.5	31.4
pA32960	17.3	9.4
pA32966	15.5	52.8
pA32951	13	104.5
pA32970	11.3	44.3
pA32956	10.1	33.5
pA32967	6.4	56.9
pA32949	5.8	9.5
pA32950	4.6	45.5
pA32954	3.3	115.2

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

実施例 1 3 : A D P グルコース依存性 B 1 2 G T のコンピュータによる設計

p A 2 8 4 2 2 の第 2 の B 1 2 G T 変異体の構造モデルが生成され、コンピュータによる設計の開始点として使用された。コンピュータによる設計は、同種 B 1 2 G T に有益であることが公知の変異を組み合わせることにより、B 1 2 G T を改善するために実施された。64 種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された (配列番号 7 6 6 ~ 8 2 9)。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例 1 と同様に構築された。各 B 1 2 G T 変異体は実施例 2 と同様に発現、精製された。各 B 1 2 G T 変異体は、p A 2 1 8 3 8 の S u S y 変異体とのワンポット反応でアッセイされた。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、5 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 6)、及び 5 0 m M の N

50

a C 1 中の 1 0 0 m g / m L の R A 5 0、2 5 0 m M の ス ク ロ ー ス、及 び 0 . 5 m M の A D P と 6 0 で 2 4 時 間 反 応 さ せ た。生 成 物 レ バ ウ ジ オ シ ド は、実 施 例 3 と 同 様 に L C M S に よ っ て 監 視 し た。い く つ か の 設 計 さ れ た 酵 素 は 良 好 に 発 現 し、R e b A か ら R e b D へ の 変 換 に 活 性 で あ っ た (表 1 5)。上 位 の 設 計 物 を 区 別 す る た め に、そ れ ら は、よ り 低 い タ ン パ ク 質 濃 度 で 再 ア ッ セ イ さ れ た (表 1 6)。

【 0 1 0 2 】

【 表 1 6 】

表 1 5 : 上 位 の B 1 2 G T の コ ン プ ュ ー タ に よ る 設 計 物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA33014	91	55.4
pA33009	90.8	39.3
pA33008	90.1	74.5
pA33016	89	64
pA33020	57.3	72.7
pA33007	52.7	31.9
pA33012	44.3	51.6
pA33019	40.2	143.3
pA33011	24.9	93.2
pA33043	20.5	59.7
pA33018	16	79.5
pA33005	14.3	26.9
pA33056	13.3	14.4
pA33015	9.4	29.2
pA33030	5.2	48.4
pA33006	4.9	37.5
pA33038	4.3	40.1
pA33010	3.1	49.7
pA33029	1.9	95.4
pA33065	1.8	32.1
pA33017	1	64.8
pA33025	0.8	29.3
pA33057	0.8	25.5
pA33031	0.4	19
pA33077	0.4	38.2
pA33069	0.3	25
pA33070	0.2	32
pA33078	0.1	37.5
pA33035	0.1	18.8
pA33068	0.1	46.5

10

20

30

40

【 0 1 0 3 】

50

【表 17】

表 16 : 上位の B 1 2 G T のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA33008	88.7	37.4
pA33009	85.4	28.3
pA33016	71.5	25.4
pA33007	49.5	10.2
pA33014	41.7	54.1
pA33020	28.3	77.3
pA33005	27.9	16.2
pA33012	21.7	55
pA33019	19.9	120.2
pA33056	16.9	3.7
pA33011	15	58.3
pA33043	14.7	19.3
pA33018	10.4	52
pA33015	6.2	11.5
pA33006	3.9	15.1
pA33030	3	33.8

10

20

30

【0104】

実施例 14 : P S S M による成功した B 1 2 G T 設計物の表現

実施例 12 及び実施例 13 で成功した B 1 2 G T 設計物を、P S S M を生成するために使用した (表 17)。P S S M は、成功した設計物と関連配列を表す簡潔な方法である。266.7 超の P S S M スコアを有する配列は、実施例 12 及び実施例 13 に記載のアクティブなコンピュータによる設計物に関連すると考えられる。P S S M によって配列をスコア付けするには、まず代表配列である配列番号 5 の配列をアライメントする必要がある。例えば、以下の成功した設計物、p A 2 9 6 4 6、p A 3 2 9 4 6、p A 2 9 6 4 2、p A 2 9 7 9 8 の P S S M スコアは、287.2、288.0、279.2、276.8 であるが、野生型 B 1 2 G T の p A 2 8 4 2 2 の P S S M スコアはわずか 257.4 である。

40

【0105】

50

【表 1 8 - 1】

表 1 7 : 成功した B 1 2 G T 設計物の位置特異的スコア行列 (P S S M)

配列位置	アミノ酸																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	-
1	0	1	0	1	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0.6	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
17	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
23	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 18 - 2】

27	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0.6
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
34	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	1	0	0	0	0	0	0	1
36	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
37	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0
39	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
41	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	1	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0	0	0.6	0	0	0	0
45	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
46	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	1	0	0	0
51	0	0	1	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
52	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
54	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	1
55	0	0	0.6	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	1	1	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 1 8 - 3】

59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
61	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	1	0	0	1	1	
63	0.6	0.6	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
66	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
69	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	0	
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.6	0	
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	
78	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
79	1	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
83	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
85	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
86	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	
87	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0.6	0	0	1	
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
89	0	1	0	0	0	1	0	0	0.6	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
90	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

40

50

【表 18 - 4】

91	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1
93	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0	0	0	0	0	0	
95	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
96	0.6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
98	0	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0.6	0	0	0	0	1	
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	
102	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0	1	0	1	
103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	
104	0	1	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
105	1	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	
107	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	
108	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	1	
109	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.6	
112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	
113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0.6	1	
114	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0.6	0	0	0	0	0	
116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
117	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.6	
118	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	
119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	
120	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
121	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

40

50

【表 18 - 5】

123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0.6	0
124	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
126	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
127	0	1	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
131	0.6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
133	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
135	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
136	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0
137	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0	0	0	0	0
138	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
139	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
140	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0
143	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0
145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.6	0	0	0	1	0	1	0
147	0	0	0.6	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
148	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
150	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0
151	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
153	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
154	0	0	1	0	0	0	0.6	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

10

20

30

40

50

【表 18 - 6】

155	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
158	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
159	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
160	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
162	0	0.6	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
164	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
166	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
167	1	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
169	1	0	0	0.6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	0
171	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
172	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
173	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
174	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0
176	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
177	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0
178	1	0	0	0	0	1	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
179	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
180	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0.6	0	0	0	0
181	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	0	1	0	1	0	0	0.6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
186	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

10

20

30

40

50

【表 18 - 7】

187	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0
188	0.6	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
189	0	1	0.6	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
190	0.6	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
191	1	0	0	0	0	1	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
192	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.6	0	0	0	1	0	0	1	0
194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
195	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	1	0
196	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0
198	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
199	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
203	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0
206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
207	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0
209	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
210	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.6	0	0	0	0
211	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.6	0	0	0	0
214	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0
216	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
218	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0

10

20

30

40

50

【表 18 - 8】

219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
221	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
222	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
223	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	1	0	0	0	0
224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	1	0
225	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
226	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
227	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
228	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
229	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.6	0	1	0
230	0	0	1	1	0	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
231	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
232	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
233	0	1	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
234	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
235	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0.6	1	0	0	0	1	0
236	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
239	0	1	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0
241	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
242	0	0	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0
244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
245	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
246	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
247	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
248	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
249	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6	0
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0

10

20

30

40

50

【表 18 - 9】

251	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0
252	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
253	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
254	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
255	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
257	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
258	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0
259	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
261	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
262	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
263	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
264	0	0	0	0.6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
265	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
266	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
267	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
268	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
269	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0
271	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
272	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
274	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
276	0	0	0.6	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
277	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.6	0
278	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
279	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
281	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0
282	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0

10

20

30

40

50

【表 18 - 10】

283	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
284	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
285	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0		
286	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0		
287	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
288	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
289	1	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
290	0	1	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
291	1	1	0	0	0	0.6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
292	0	0.6	0.6	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
293	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
294	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
295	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
296	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
298	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
299	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
301	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0
302	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
303	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
304	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
305	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
306	0	1	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
307	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
308	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
309	1	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
310	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
311	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0	0	0
312	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
313	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
314	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 1 8 - 1 1】

315	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
316	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
317	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
318	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
319	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
320	0	0	0	0	1	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
321	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
322	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
323	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
324	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0
326	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
327	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0
328	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
329	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
331	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
332	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
333	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
334	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
335	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0
337	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
338	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
339	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0
340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
341	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
342	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
343	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
344	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
345	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
346	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 1 8 - 1 2】

347	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
348	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
349	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
351	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
352	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
354	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0
355	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
356	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0
357	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
358	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
359	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
361	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
362	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
363	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
364	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
365	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	1	0	0	0	0	0	1	0
366	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0
367	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
368	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	1	0	0	0	0	1	0	0
369	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
370	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
371	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
373	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
375	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0.6
376	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
377	0	1	0	0.6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
378	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 1 8 - 1 3】

379	0	0	1	0.6	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
380	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
381	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
382	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
383	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
384	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
385	0.6	0	1	1	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
386	1	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
388	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
389	0	0.6	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
390	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6
391	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1
392	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
393	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
395	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
396	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0.6	1	0	0	1
397	0	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
398	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.6	0	0	0	0	0
399	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
401	0	0	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
402	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0.6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
403	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
404	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
405	0.6	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
406	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
407	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6
408	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
409	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 1 8 - 1 4】

411	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0
412	0.6	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.6	0	0	0	0	1	0	0	0
413	0	0.6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
414	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	1	0	0
415	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
416	0.6	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
417	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
418	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
419	0	0	1	1	0	0	0.6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
420	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
421	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
422	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
423	0	0	0.6	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
424	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
425	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
426	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
427	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
428	1	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	1	0	0	0	0	1	0
430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
431	1	1	0	0	0	0.6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
433	0	0	0	0	0.6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
434	0	0.6	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
435	0	0	0.6	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
436	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
437	1	1	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
438	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
439	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0.6	0
440	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	1

10

20

30

40

【 0 1 0 6】

実施例 1 5 : A D P グルコース依存性 B 1 2 G T のコンピュータによる設計

改善された B 1 2 G T は、実施例 1 2 及び実施例 1 3 から設計された B 1 2 G T を更なる設計ラウンドの開始足場として使用することによって設計された。コンピュータによる設計方法は、実施例 1 2 及び実施例 1 3 からの 7 つの B 1 2 G T の安定性及び発現を改善するために使用された。1 3 4 種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された（配列番号 1 3 3 3 ~ 1 4 6 6）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例 1 と同様に構築された。各 B 1 2 G T 変異体は実施例 2 と同様に発現、精製された。各 B 1 2 G T 変異体は、p A 2 1 8 3 8 の S u S y 変異体とのワンポット反

50

応でアッセイされた。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、5 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 6)、及び 5 0 m M の N a C l 中の 1 0 0 m g / m L の R A 5 0、2 5 0 m M のスクロース、及び 0 . 5 m M の A D P と 6 0 で 2 4 時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に L C M S によって監視した。いくつかの設計された酵素は良好に発現し、R e b A から R e b D への変換に活性であった (表 1 8)。

【 0 1 0 7 】

【 表 1 9 - 1 】

表 1 8 : 改善された B 1 2 G T のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA35535	42.8	38.1
pA35532	38.9	27.1
pA35534	37.9	44.6
pA35594	36	12.7
pA35536	35.5	65.5
pA35568	33.5	25
pA35531	33	20.7
pA35574	32.5	42.4
pA35526	31.8	13.6
pA35565	31.8	28.5
pA35576	30	13.5
pA35564	28.9	23.8
pA35575	25.6	22.3
pA35525	22.7	10.5
pA35511	22.4	42.9
pA35562	20.6	43.2
pA35508	19.2	92.7
pA35561	18.3	37.3
pA35503	18.1	86.4

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

pA35533	17.6	56.9
pA35522	17.1	13.2
pA35530	16.9	38.6
pA35613	16.5	11.8
pA35515	13.4	66.4
pA35507	12.1	76.3
pA35510	11.9	33.2
pA35516	11.8	57.7
pA35506	11.5	63.3
pA35513	11.1	48.3
pA35514	9.8	65.8
pA35592	8.5	18.4
pA35563	8.2	32.9
pA35593	8.1	6
pA35567	7.2	49.1
pA35614	6.5	9
pA35501	6.3	69.1
pA35496	6.1	36.6
pA35598	5.9	8.4
pA35502	5.9	69.7
pA35493	5.6	40.5
pA35570	5.6	25.5
pA35497	5.4	27.3
pA35509	5.4	53.2
pA35495	5.4	40.9
pA35499	5.2	67.2
pA35517	5.1	6.4
pA35569	5	47
pA35505	4.8	97.3
pA35528	4.7	14.1
pA35490	4.6	68.8
pA35603	4.5	10.1

10

20

30

40

50

【表 19 - 3】

pA35487	4.4	44.9
pA35498	4.4	31.1
pA35584	4.3	17.6
pA35566	4.3	47.6
pA35492	4.2	55
pA35527	4.1	11.8
pA35518	3.9	5.7
pA35520	3.8	2.6
pA35529	3.7	13.5
pA35504	3.6	50.1
pA35484	3.6	13.9
pA35489	3.6	36.2
pA35548	3.6	5.4
pA35571	3.5	27.6
pA35524	3.5	3.1
pA35488	3.5	36
pA35483	3.5	14.8
pA35543	3.5	2.9
pA35541	3.5	3.6
pA35482	3.5	16.2
pA35500	3.4	46.5
pA35546	3.4	2.2
pA35545	3.4	4.1
pA35494	3.4	44.3
pA35519	3.4	3.1
pA35491	3.3	44.5
pA35604	3.3	6.9
pA35521	3.3	4.4
pA35542	3.3	3.9
pA35486	3.2	31.2
pA35547	3.2	2.1
pA35544	3.1	4.2

10

20

30

40

50

【表 19 - 4】

pA35523	3.1	1.8
pA35481	3.1	18.4
pA35537	3	0.8
pA35485	3	31.3
pA35538	3	2.1
pA35540	2.8	3.2
pA35559	2.7	14.6
pA35539	2.7	3.9
pA35557	2.7	25
pA35581	1.5	24.3
pA35560	1.4	40.5
pA35512	1.1	24
pA35588	1.1	16.5
pA35580	1.1	6.8
pA35589	0.9	2.8
pA35591	0.8	16.6
pA35587	0.6	10
pA35556	0.5	16.5
pA35602	0.4	3.8
pA35586	0.4	13.2
pA35590	0.4	16.2
pA35553	0.4	9.9
pA35555	0.2	15.9
pA35558	0.2	30.4

10

20

30

【0108】

実施例 16 : ADP グルコース依存性 B 1 2 G T のコンピュータによる設計

p A 2 8 4 2 2 の第 3 の B 1 2 G T 変異体の構造モデルが生成され、コンピュータによる設計の開始点として使用された。コンピュータによる設計は、B 1 2 G T の安定性及び発現を改善するために実施された。53 種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された (配列番号 8 3 0 ~ 8 8 2)。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例 1 と同様に構築された。各 B 1 2 G T 変異体は実施例 2 と同様に発現、精製された。各 B 1 2 G T 変異体は、p A 2 1 8 3 8 の S u S y 変異体とのワンポット反応でアッセイされた。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、50 mM のリン酸緩衝液 (pH 6)、3 mM の M g C l₂ 及び 50 mM の N a C l 中の 10 mg / mL の R A 5 0、100 mM のスクロース、及び 10.5 mM の A D P と 60 ° C で 24 時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に L C M S によって監視した。いくつかの設計された酵素は良好に発現し、R e b A から R e b D への変換に活性であった (表 1

40

50

9)。

【0109】

【表20】

表19：上位のB12GTのコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA29846	21	11.3
pA29856	20	27.6
pA29850	19.6	28.9
pA29870	13.6	18.2
pA29845	13.5	20.1
pA29823	10.6	0.6
pA29847	9.7	12.1
pA29822	8.7	20.7
pA29837	8.4	-3.1
pA29848	7.6	54
pA29829	7	9.1
pA29821	6.4	5.7
pA29828	6.1	3.8
pA29859	5.3	12.6
pA29853	4.7	29.8
pA29824	4.3	10.5
pA29854	3.9	16.9
pA29852	3.7	
pA29836	3.4	0.5
pA29839	3.1	2
pA29864	2.9	75.3
pA29860	2.8	44.5
pA29831	0.7	20.3

10

20

30

40

【0110】

実施例17：ADP依存性スクロースシンターゼのコンピュータによる設計

pA21838の2つのSusy変異体の構造モデルが生成され、コンピュータによる設計の開始点として使用された。ADPG依存性B12GTの設計に使用された設計戦略が、改善されたADP依存性スクロースシンターゼの設計に使用された。256種類のコンピュータによる設計物は実験的検証のために選択された(配列番号925~1180)。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例4と同様に構築された。

50

各 S u S y 変異体は実施例 5 と同様に発現、精製された。各 S u S y 変異体は、p A 2 8 4 2 2 の B 1 2 G T 変異体とのワンポット反応でアッセイされた。精製した B 1 2 G T 及び S u S y を、5 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 6)、3 m M の M g C l 2 及び 5 0 m M の N a C l 中の 1 0 0 m g / m L の R A 5 0、2 5 0 m M のスクロース、及び 0 . 5 m M の A D P と 6 0 で 2 4 時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に L C M S によって監視した。設計された酵素、配列番号 9 2 5 ~ 1 0 4 8 の相対的な発現及び R e b A から R e b D への変換は表 2 0 に示す。設計された酵素、配列番号 1 0 4 9 ~ 1 1 0 4 の相対的な発現及び R e b A から R e b D への変換は、表 2 1 に示す。前の 2 つの実験の上位ヒットは、より妥当なタンパク質濃度で再評価された (表 2 2)。最後に、設計された酵素、配列番号 1 1 0 5 ~ 1 1 8 0 の相対的な発現及び R e b A から R e b D への変換は、表 2 3 に示す。

10

【 0 1 1 1 】

【表 2 1 - 1 】

表 2 0 : 上位の S u S y のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA32819	11.9	15.5
pA32719	11.7	22.2
pA32712	11	13.6
pA32667	10.5	22.7
pA32602	9.9	19
pA32854	9.9	26.9
pA32924	9.9	18
pA32858	9.6	30.2
pA32732	9.6	31.1
pA32652	9.6	23.5
pA32582	9.5	32.3
pA32692	9.5	35.4
pA32657	9.2	13.2
pA32734	9.2	26.3
pA32821	9.1	25.3
pA32704	9.1	20.9

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

pA32601	9	15
pA32706	8.8	28
pA32721	8.6	20.6
pA32614	8.5	23.8
pA32684	8.5	26.7
pA32736	8.3	33.2
pA32609	8.3	30.3
pA32926	8.3	19.5
pA32639	8.2	13.1
pA32655	8.1	64.4
pA32696	8.1	30.3
pA32855	8	30.2
pA32704	7.9	19.4
pA32820	7.9	20.1
pA32651	7.9	8.4
pA32819	7.7	10.6
pA32697	7.7	11.2
pA32602	7.6	19.4
pA32723	7.5	59
pA32625	7.5	27.1
pA32678	7.4	51.5
pA32622	7.3	15
pA32731	7	5.4
pA32629	6.9	11.8
pA32700	6.7	24.4
pA32608	6.6	26.4
pA32708	6.4	9.3
pA32686	6.2	15
pA32698	6	28.6
pA32589	5.9	35.5
pA32680	5.8	22.3
pA32586	5.7	22.8

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 3】

pA32700	5.7	28.6
pA32606	5.6	24.6
pA32620	5.6	15.6
pA32596	5.5	54.2
pA32616	5.4	39
pA32696	5.4	66.8
pA32600	4.8	29.4
pA32669	4.7	56.5
pA32682	4.6	33.2
pA32845	4.2	17.1
pA32868	4.1	9.6
pA32715	4.1	27.5
pA32650	3.8	29.7
pA32620	3.6	16.4
pA32690	3.6	15
pA32716	3.5	37.9
pA32702	3.5	13.2
pA32863	3.4	10
pA32605	3.2	29.1
pA32595	2.9	41.2
pA32847	2.6	8.8
pA32594	2.5	23.5
pA32670	2.4	24.7
pA32675	2.2	28.8
pA32880	2.1	11.5
pA32837	2.1	19.6
pA32702	2.1	12.4
pA32688	2	22.8
pA32591	1.9	47.5
pA32662	1.9	23.6
pA32701	1.7	21.9
pA32758	1.5	19.7

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 4】

pA32603	1.5	57.3
pA32671	1.2	15.6
pA32671	1.1	22.4
pA32842	0.9	5.5
pA32781	0.9	10
pA32934	0.9	15.3
pA32831	0.9	7.6
pA32793	0.8	7.4
pA32662	0.8	15.2
pA32701	0.8	23.3
pA32717	0.8	30.7
pA32748	0.8	28.3
pA32672	0.7	32.3
pA32826	0.7	2
pA32816	0.7	13.6
pA32664	0.7	9.7
pA32754	0.6	22.6
pA32666	0.6	46
pA32770	0.5	11.7
pA32779	0.5	8.3
pA32844	0.5	6.4
pA32665	0.4	21
pA32659	0.4	25.1
pA32799	0.3	33.5
pA32790	0.2	22.6
pA32787	0.2	14.3
pA32623	0.2	13.8
pA32866	0.2	29.3
pA32767	0.2	23
pA32828	0.2	9
pA32876	0.2	5.4
pA32797	0.1	9.6

10

20

30

40

【 0 1 1 2 】

50

【表 2 2 - 1】

表 2 1 : 上位の S u S y のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA32930	89.9	2.7
pA32894	87.3	4.8
pA32892	86	9.6
pA32729	83.3	3.1
pA32732	80.2	3.3
pA32869	78.3	11.8
pA32734	77.3	3.4
pA32646	69.8	5.4
pA32735	53.9	4
pA32652	49.8	2.8
pA32923	47.8	5.5
pA32724	40.5	2.8
pA32722	36.8	1.3
pA32723	36.4	2.7
pA32727	30.5	1.8
pA32653	26.1	3.4
pA32888	25.3	3.9
pA32650	24.3	3.1
pA32868	21.7	2.6
pA32632	20.2	3
pA32634	19.2	2.7
pA32922	18	1.7
pA32765	12.3	2.8
pA32895	12.3	2.8
pA32884	10.9	4.3
pA32880	10.6	3
pA32638	10.2	3.3
pA32751	10.2	1.2
pA32903	9.5	3.3
pA32769	8.9	1.6

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

pA32871	8.5	2.8
pA32770	7.9	1.3
pA32780	7.9	1.9
pA32754	7.2	1.6
pA32752	6.6	3.8
pA32760	6.4	1.5
pA32775	6.3	2.5
pA32904	6.2	3.2
pA32761	6.2	2.2
pA32793	6	2.1
pA32881	5.7	1.4
pA32902	5.5	3.2
pA32779	5.5	1.7
pA32623	5.4	0.8
pA32918	5.2	4.8
pA32758	5.2	1.3
pA32746	5	3.8
pA32750	4.6	2.1
pA32882	4.6	1.9
pA32747	4.5	5.1
pA32876	4.2	1.2
pA32782	4.1	1.4
pA32767	4	2.2
pA32785	3.9	2.1
pA32749	3.9	3.1
pA32914	3.7	2.2
pA32875	3.7	2.1
pA32917	3.4	2
pA32763	3.2	2.1
pA32737	3.2	1.8
pA32886	3.2	2.4
pA32757	3.2	2.3

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 3】

pA32743	2.8	3.6
pA32932	2.8	2.8
pA32885	2.8	2.6
pA32865	2.7	1.3
pA32791	2.7	2.4
pA32913	2.6	2.3
pA32742	2.5	1.4
pA32879	2.4	1
pA32738	2.1	3.7
pA32916	1.9	0.9
pA32912	1.7	0.8
pA32906	1.7	3.1

10

20

【 0 1 1 3 】

30

40

50

【表 2 3 - 1】

表 2 2 : 上位の S u S y のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA32821	57.6	39.4
pA32888	54.8	40.1
pA32854	52.3	28.7
pA32858	51.8	55.2
pA32855	47.6	28.8
pA32868	46.4	35.4
pA32924	45.7	25.2
pA32930	45.7	44
pA32926	42.6	31.7
pA32692	41.7	28.5
pA32684	40.8	31.1
pA32819	40.7	19.5
pA32820	40	24.7
pA32731	37.9	67.2
pA32655	37.5	39.4
pA32894	37	48.2
pA32646	36.9	28.8

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

pA32892	35.9	50.8
pA32629	35.4	12.5
pA32625	34.5	11.4
pA32869	30.9	54.8
pA32732	30.7	83.5
pA32923	28.7	40.4
pA32706	28.7	41.3
pA32719	26.9	47.4
pA32729	26.6	87.8
pA32697	26.4	13.5
pA32652	26.3	37.2
pA32704	23.9	29.1
pA32696	23.3	56.5
pA32712	22.1	22.6
pA32650	21	34.9
pA32639	19.8	14.7
pA32722	18.5	44.1
pA32734	18.1	66
pA32724	17.7	25.7
pA32727	17.7	27
pA32922	17.3	25.2
pA32715	17.1	31.7
pA32845	16.9	7.4
pA32651	16.8	15.4
pA32620	16.1	19.3
pA32602	16	37.9
pA32735	15.5	76.1
pA32667	15	44.6
pA32736	14	59.7
pA32622	14	29.6
pA32708	13.7	9.7
pA32721	13.4	49.5

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 3】

pA32723	12.8	53.7
pA32698	11.2	23.8
pA32680	10.5	18.6
pA32601	10.5	44.7
pA32586	8	45.5
pA32682	7.2	50.4
pA32582	7.1	55.4
pA32609	6.7	49.5
pA32600	6.6	23.1
pA32608	6.2	41.2
pA32700	6	47.4
pA32686	5.7	23.3
pA32669	5.5	52.3
pA32606	5.5	33.4
pA32589	4.9	74.3
pA32616	4.6	53.3
pA32678	4	70.8
pA32614	3.9	71
pA32657	3.6	18.5
pA32596	2.8	100.6

10

20

30

【 0 1 1 4 】

40

50

【表 2 4 - 1】

表 2 3 : 上位の S u S y のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA32929	86.6	7.5
pA32891	86.3	8.3
pA32853	86.2	13.7
pA32587	86	26.3
pA32887	85	17
pA32725	81.7	24.1
pA32889	79.2	7.2
pA32599	78.5	16.1
pA32633	78	10.8

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

pA32927	68.1	8.5
pA32691	58.5	17.9
pA32658	49.4	19.7
pA32683	48.3	18.4
pA32931	27.7	11.2
pA32597	24.8	33
pA32579	23.5	20.5
pA32679	21.7	13.3
pA32621	21.7	3.7
pA32581	21.3	19.5
pA32695	17.2	40.2
pA32647	15.8	5.9
pA32637	14.8	18.9
pA32873	11	10.9
pA32585	10.9	13.5
pA32631	10.4	5.4
pA32859	7.7	12.6
pA32619	6.6	5.9
pA32689	6.2	10.9
pA32617	4.9	3.8
pA32613	4.7	25.6
pA32641	4	24
pA32768	3.6	10.9
pA32774	2.9	5.9
pA32778	2.8	4.2
pA32773	2.5	5.4
pA32673	1.9	13.4
pA32843	1.7	3.8
pA32583	1.3	22.1
pA32897	1.1	3.1
pA32610	1	10.2
pA32776	0.7	5.3

10

20

30

40

【表 2 4 - 3】

pA32849	0.6	10.7
pA32685	0.5	37.1
pA32839	0.5	2.2

実施例 18 : P S S M による成功した S u S y 設計物の表現

実施例 17 で成功した S u S y 設計物により、P S S M を作製した (表 2 4) 。 P S S M は、成功した設計と関連配列を表す簡潔な方法である。5 5 6 超の P S S M スコアを有する配列は、実施例 17 に記載のアクティブなコンピュータによる設計物に関連すると考えられる。生成された P S S M によって配列をスコア付けするには、まず代表配列 p A 2 1 8 3 8 (配列番号 8 8 5) とアラインメントする必要がある。例えば、以下の成功した設計物、p A 3 2 8 5 3、p A 3 2 8 9 1、p A 3 2 8 9 2、p A 3 2 9 2 9 の P S S M スコアは、5 5 7 . 2、5 5 8 . 1、5 5 8 . 1、5 5 7 . 8 であるが、野生型 S u S y の p A 2 1 8 3 8 の P S S M スコアはわずか 5 3 6 . 3 である。

【 0 1 1 6 】

【 表 2 5 - 1 】

10

表 2 4 : 成功した S u S y 設計物の位置特異的スコア行列 (P S S M)

配列位置	アミノ酸																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	-
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.7	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0.7	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
14	0	0.7	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0

20

30

40

50

【表 2 5 - 2】

16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	
17	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
18	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
25	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
38	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
41	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
45	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 3】

48	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
49	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0
52	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	1	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
55	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
57	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	1	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
59	0.7	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	1	0	0.7	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
63	0.7	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	1	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0
71	0	0.7	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
75	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	1	0
76	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
78	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 4】

80	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0
82	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1
84	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
87	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7
90	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
92	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
94	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	0.7	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
99	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1
102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0
103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1
104	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
105	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0
107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
111	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 5】

112	0	1	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
115	0	0	1	1	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
116	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	1	0	1	1	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
118	0.7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
119	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121	0	0	1	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
122	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1	1	0	0
125	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0
126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0
127	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0
129	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
132	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
133	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
134	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0.7
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	1
136	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
137	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
138	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
140	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
141	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 6】

144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
145	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
146	0	1	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
147	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1
149	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
152	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
153	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
154	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
155	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
157	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
158	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
161	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
162	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0
164	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
165	0.7	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
166	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
167	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
168	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0
169	0.7	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
172	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0
174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
175	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 7】

176	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
177	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
178	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
179	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
180	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
181	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	0	0	0.7	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
185	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
186	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
187	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
188	0	0	0.7	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
189	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
190	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
191	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
192	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
194	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
195	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
196	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
197	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
198	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
199	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0
200	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0
201	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
203	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
204	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
205	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
206	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
207	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 8】

208	1	0.7	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
209	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
210	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
213	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
214	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1
216	1	0.7	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
217	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
218	1	1	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
220	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
221	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
222	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
223	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
225	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
227	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
228	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
229	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	0	1	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
232	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
233	1	0	0	0	0	1	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
234	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
235	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7
236	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
239	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 9】

240	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
241	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
242	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1
244	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
245	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
246	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
247	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
248	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
249	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
251	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
252	0.7	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
253	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
254	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
255	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0.7	1	0	0	0
257	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
258	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
259	1	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
260	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
261	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
262	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
263	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
264	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
265	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0
266	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
268	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	1
269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 0】

272	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
273	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
274	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0
276	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
277	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
278	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
279	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
280	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
281	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
282	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
283	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
284	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
285	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
286	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
288	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
289	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
291	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
292	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
293	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0
294	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
295	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
296	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
297	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
298	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
299	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
301	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
302	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
303	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 1】

304	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
305	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
306	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
307	0	1	0.7	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
308	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
310	1	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
311	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
312	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
313	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
314	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
315	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
316	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
317	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
318	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
319	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
321	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
322	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
323	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
324	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
325	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
326	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
328	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
329	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
330	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
331	0	0	0	0.7	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
332	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
334	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
335	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 2】

336	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
337	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
338	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
339	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
340	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
341	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
342	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
343	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
344	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
345	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
346	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
347	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
348	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
349	0	1	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
351	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
352	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
354	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
355	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
356	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
357	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
358	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
359	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
360	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
361	0	0.7	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
362	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
363	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
364	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
365	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
366	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
367	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 3】

368	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
369	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
370	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
371	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
373	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
376	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
377	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
378	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
379	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.7	0	0
380	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
381	0	0.7	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
382	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
383	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
384	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
385	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
386	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
388	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
389	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
390	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
391	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
392	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
393	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
394	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
395	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
396	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
397	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
398	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
399	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 4】

400	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
401	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
402	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
403	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
404	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
405	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
406	0	0	0.7	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
407	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
409	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0
411	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
412	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
413	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
414	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
415	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
416	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0
417	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
418	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
419	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
420	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
421	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
422	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
423	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
424	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
425	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
426	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
427	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
428	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0
431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 5】

432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
433	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
434	0	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
435	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
436	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
438	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
439	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
440	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
441	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
442	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0
443	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
444	1	0	0	1	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
445	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
446	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
447	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
449	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
451	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
452	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
454	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
455	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
456	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
458	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
459	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
460	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
461	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
462	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
463	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 6】

464	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
465	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
466	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
467	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
468	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
469	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
470	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
471	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
472	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
473	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
474	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
475	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
476	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
477	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
478	0	0.7	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
479	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
481	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
482	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
483	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
484	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
486	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
487	1	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
488	1	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
489	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0
490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
491	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
492	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
493	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
494	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
495	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 7】

496	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
497	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
498	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
499	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
501	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
502	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
503	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
504	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
505	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
506	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0
507	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
508	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
509	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
510	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
511	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
513	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
514	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
515	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
516	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
517	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
518	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
519	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1
520	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
521	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
522	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0
523	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
524	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
525	0	0.7	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
526	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0
527	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 8】

528	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
529	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
530	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
531	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0
532	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
533	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
534	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
535	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
536	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
537	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
538	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
539	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0
540	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
541	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	1	0	1	0
542	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0
543	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
544	0	0.7	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
545	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
546	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
547	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
548	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
549	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
550	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
551	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
552	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
553	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
554	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
555	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
556	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
557	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
558	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
559	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 9】

560	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	
561	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
563	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
564	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0
565	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
566	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
567	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
568	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
569	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
570	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
573	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
574	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0
576	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
577	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
578	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
579	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
581	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	1	0
582	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
583	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
584	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
585	0.7	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0
586	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
587	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
588	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
589	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
590	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
591	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2 0】

592	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
593	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
594	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
596	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
597	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
598	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
599	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
601	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
602	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.7	0
603	1	0	1	0	0	0.7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
604	0.7	1	0.7	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
605	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
606	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	1	1	0	0	0
607	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
608	0.7	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
609	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
610	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
611	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
612	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
613	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
614	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
615	1	0.7	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
616	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
617	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
618	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
619	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
620	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
621	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
622	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
623	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2 1】

624	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
625	0	0	1	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
626	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
627	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
628	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
629	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
630	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	1
631	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
632	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
633	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
634	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
635	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1
636	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
637	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
638	0	0	1	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
639	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
640	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1
641	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0
642	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
643	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
644	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
645	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
646	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
647	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
648	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.7	0
649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
650	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
651	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
652	0	1	0	0	0	1	0	0.7	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
653	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
654	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
655	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2 2】

656	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	1	0
657	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
658	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
659	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
660	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
661	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
662	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0
663	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
664	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
665	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
666	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
667	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
668	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
669	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
670	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
671	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
672	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
673	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
674	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0
675	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
676	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
677	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
678	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
679	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0
680	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0
681	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
682	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
683	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
684	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
685	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
686	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
687	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2 3】

688	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
689	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
690	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
691	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
692	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
693	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
694	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
695	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
696	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
697	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
698	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
699	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
701	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
702	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
703	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
704	0	0	0	0.7	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
705	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
706	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
707	0.7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
708	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0.7
709	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
710	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
711	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
713	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
714	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
715	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0
716	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0
717	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
718	0.7	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
719	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2 4】

720	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
721	1	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
722	0	0.7	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
723	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
724	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	1	1	0	0	0
725	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
726	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
727	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
728	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
729	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
730	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
731	0	1	0	0.7	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
732	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
733	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
734	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
735	0.7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
736	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
737	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
738	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0
739	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
740	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
741	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
742	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
743	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
744	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
745	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
746	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0
747	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
748	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
749	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	1	0	0
751	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 25 - 26】

784	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
785	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
786	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
787	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
788	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
789	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
790	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
791	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
792	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
793	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

【0117】

実施例 19：コンピュータによる設計によって引き起こされる *Thermosynechococcus elongatus* 由来の SUSA の活性及び発現の改善

20

Thermosynechococcus elongatus 由来のスクロースシンターゼ SUSA の相同性モデルが構築され、pA21841 を改善するためのコンピュータによる設計への入力として使用された。コンピュータによる設計は、SuSy の安定性及び発現を改善するために実施された。47 種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された（配列番号 1181 ~ 1227）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例 4 と同様に構築された。各 SuSy 変異体は実施例 5 と同様に発現、精製された。各 SuSy 変異体は、B12GT、pA29798 とのワンポット反応でアッセイされた。精製した B12GT 及び SuSy を、50 mM のリン酸緩衝液（pH 6）、及び 50 mM の NaCl 中の 100 mg/mL の RA50、250 mM のスクロース、及び 0.5 mM の ADP と 60 で 24 時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例 3 と同様に LCMS によって監視した。いくつかの変異体は、親 pA21841 に比べて、発現及び/または RebD 変換の改善を示した。上位の設計物は、収量で最大 2.2 倍の改善、または発現で 5.4 倍の改善を示した（34.6% の変換率、6.8 uM の精製タンパク質、表 25）。

30

【0118】

【表 26 - 1】

表 25：pA21841 のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA34126	75.2	11.7
pA34103	73	9.5
pA34101	64.3	9.6
pA34127	59.9	9.2
pA34102	57.7	8.8

40

50

【表 2 6 - 2】

pA34112	57.2	4.5
pA34128	56.2	8.6
pA34116	53.4	13.2
pA34118	47.9	17.1
pA34115	47.5	3.6
pA34099	47	20.6
pA34117	46.2	7.2
pA34131	45.8	7.1
pA34125	45.4	18.3
pA34121	45.1	8.3
pA34134	43.7	13.3
pA34086	42.2	14
pA34111	42	2.2
pA34113	40.5	6
pA34135	40.3	13.7
pA34132	39.6	9.8
pA34087	38.2	5.8
pA34106	36.8	14.1
pA34094	34.4	14.6
pA34129	32.4	10.6
pA34119	32.1	23.7
pA34130	31.7	5.8
pA34092	30.7	10.9
pA34107	30.2	15.1
pA34096	29.7	2.6
pA34091	28.5	13.7
pA34110	26.6	25.6
pA34089	23.5	26
pA34088	22.4	28.6
pA34122	22.1	7.8
pA34109	21.9	28.4
pA34120	21.6	12.2

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 3】

pA34097	15.7	4.2
pA34133	15.3	22.9
pA34095	13.5	17.9
pA34105	12.9	7.8
pA34090	12.1	30.7
pA34123	7.8	19
pA34104	7.7	36.3
pA34124	3.3	17.4

10

【0119】

コンピュータによる設計は、更に、埋もれたタンパク質コアを再設計及び再パッキングすることにより、SUS Aの安定性と発現を改善するために実施された。38種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された(配列番号1231~1267)。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例4と同様に構築された。各SUSy変異体は実施例5と同様に発現、精製された。各SUSy変異体は、B12GT、pA29798とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB12GT及びSUSyを、50mMのリン酸緩衝液(pH6)、及び50mMのNaCl中の100mg/mLのRA50、250mMのスクロース、及び0.5mMのADPと60 で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3と同様にLCMSによって監視した。いくつかの設計された酵素は良好に発現し、Reb AからReb Dへの変換に活性であった(表26)。

20

【0120】

30

40

50

【表 2 7 - 1】

表 2 6 : p A 2 1 8 4 1 のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA35407	78.3	10.3
pA35409	67.9	11.7
pA35431	55.3	10.2
pA35417	46.1	7.6
pA35437	37.5	12.3
pA35427	27	5
pA35432	24.8	8.9
pA35422	21.2	7.3
pA35423	17.4	4.6
pA35408	16.8	3.4
pA35426	15.3	4

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 2】

pA35412	15.2	3
pA35425	15.1	5.6
pA35439	14.1	3.5
pA35416	12.9	8.7
pA35428	12.5	4.8
pA35429	10.2	5.2
pA35410	9.3	2.9
pA35424	8.6	5.8
pA35430	8.4	5.8
pA35434	7.5	8.2
pA35435	7.4	5.4
pA35436	5.8	4.3
pA35419	5.5	3
pA35440	5.4	3.1
pA35443	5.3	2.6
pA35444	5.3	2.4
pA35438	5.2	3.4
pA35441	5.1	3.7
pA35413	4.9	2.9
pA35418	4.8	2
pA35420	4.7	1.6
pA35442	4.5	2.4
pA35414	4.4	5
pA35411	4.3	2.4
pA35433	4.3	0
pA35421	0.2	10.8

10

20

30

40

【0121】

コンピュータによる設計は、更に、共進化情報により、S u S y の安定性と発現を改善するために実施された。65種類のコンピュータによる設計物が実験的検証のために選択された（配列番号1268～1332）。コンピュータによる設計物のための発現プラスミドは、実施例4と同様に構築された。各S u S y 変異体は実施例5と同様に発現、精製された。各S u S y 変異体は、B12GT、pA29798とのワンポット反応でアッセイされた。精製したB12GT及びS u S y を、50mMのリン酸緩衝液（pH6）、及び50mMのNaCl中の100mg/mLのRA50、250mMのスクロース、及び0.5mMのADPと60 で24時間反応させた。生成物レバウジオシドは、実施例3

50

と同様にLCMSによって監視した。いくつかの設計された酵素は良好に発現し、Reb AからReb Dへの変換に活性であった(表27)。

【0122】

【表28-1】

表27：pA21841のコンピュータによる設計物

ID	%変換率	精製濃度 (uM)
pA35907	83.5	20.3
pA35928	82.9	8.5
pA35903	71.3	17.1
pA35933	71.2	8.9
pA35901	68.9	21.4
pA35932	68.1	11.3
pA35938	66.5	4.5
pA35882	65.3	11.2
pA35942	64.3	9.7
pA35897	60.2	15.8
pA35943	57	8.3
pA35896	56.8	21.2
pA35936	55.4	5.9
pA35927	55	16.1
pA35926	49.5	8.4
pA35929	49.4	10.1
pA35891	48.8	29.6
pA35898	47.3	6.6
pA35895	47.1	12.9
pA35937	46.3	8
pA35880	44.1	7.8
pA35910	41.1	13.5
pA35941	40.6	8.9
pA35904	40.5	11.9
pA35872	39.4	7.1
pA35930	39.1	6.2
pA35899	38.6	22.1

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 2】

pA35873	38.5	11
pA35935	36.3	5.3
pA35905	34.4	16.5
pA35902	33.4	16.3
pA35911	32.8	18
pA35919	31.4	9.2
pA35912	29.7	6.4
pA35893	28.1	23.5
pA35889	27.7	6.8
pA35890	27.1	20.2
pA35874	26.5	8
pA35886	25.7	23.7
pA35888	24.6	9.2
pA35875	24.4	12.1
pA35908	24.1	13.6
pA35892	23.6	20.4
pA35887	23.4	13.9
pA35879	22.3	9.6
pA35931	19.5	5.9
pA35915	19.4	9.8
pA35940	18.7	8.8
pA35914	18.6	20.9
pA35876	18.4	23
pA35878	18	13.4
pA35921	17.9	11.7
pA35881	16.8	9.1
pA35877	13.9	22.6
pA35923	13	28.2
pA35925	12.1	13.2
pA35917	10.3	12.8
pA35906	9.1	7.2
pA35884	7.8	18.4

10

20

30

40

50

【表 28 - 3】

pA35922	7.6	6.2
pA35913	6.7	3.8
pA35939	6.4	5.9
pA35924	5.7	7.1
pA35909	2.1	10.5

10

【0123】

実施例 20 : PSSMによる成功したSusy設計物の表現

実施例 19で成功したSusy設計物により、PSSMを作製した(表28)。PSSMは、成功した設計物と関連配列を表す簡潔な方法である。569.5超のPSSMスコアを有する配列は、実施例19に記載のアクティブなコンピュータによる設計物に関連すると考えられる。生成されたPSSMによって配列をスコア付けするには、まず代表配列pA21841(配列番号888)とアラインメントする必要がある。例えば、以下の成功したデザイン、pA34103、pA34119、pA34099のPSSMスコアは、576.7、572.5、577.0であるが、野生型SusyのpA21841のPSSMスコアはわずか565.6である。

20

【0124】

【表 29 - 1】

表 28 : 成功したSusy設計物の位置特異的スコア行列 (PSSM)

配列位置	アミノ酸																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	-
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0
11	0	0	1	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0

30

40

50

【表 29 - 2】

13	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0.7	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
17	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0
23	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0
28	0	0	1	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	1	0.7	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
43	0.7	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 3】

45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
46	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	1	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	1	0	1	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
53	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0
57	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
58	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
60	0	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
66	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7
74	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0.7	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 4】

77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
83	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
85	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
92	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
93	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
97	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
102	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
108	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 5】

109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
112	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0
113	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
114	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
118	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
121	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
123	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
124	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
126	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
129	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
131	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0.7
133	0	1	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
136	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
137	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
138	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0
140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 6】

141	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
143	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
145	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
147	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
149	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
151	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
153	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
154	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
155	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
157	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
158	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0
159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
163	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
166	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
168	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
169	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
170	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
171	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
172	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 7】

173	1	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
176	0	0	0.7	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
177	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
179	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
181	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
184	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
185	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
186	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
187	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
188	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
189	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
191	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
192	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
193	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
195	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
196	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
198	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
199	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
201	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0
202	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
203	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 8】

205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
206	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
207	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7
210	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0.7
211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
213	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
214	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
216	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0
217	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
218	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
219	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0
221	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
222	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
223	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
224	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
225	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
226	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
228	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
229	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
231	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
232	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
233	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
234	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
235	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
236	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 9】

237	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
239	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
240	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
241	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
242	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
244	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
245	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
246	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
247	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
248	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
249	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
251	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
252	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
253	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1
254	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
255	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
257	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
258	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
259	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
260	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
261	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
262	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
263	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
264	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
265	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
266	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7
267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
268	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 10】

269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
272	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
274	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
276	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
277	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
279	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
280	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
281	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
282	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
283	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
284	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
285	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
286	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
288	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
289	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
290	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
291	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
292	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
293	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
294	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
295	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
296	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
297	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
298	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
299	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 1 1】

301	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
302	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
303	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
304	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
305	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
306	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
307	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
308	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
310	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
311	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
312	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
313	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
314	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
315	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
316	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
317	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
318	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
319	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
320	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
321	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
322	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
323	0	0	0	1	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
324	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0
325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
326	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
328	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
329	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
331	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
332	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 12】

333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
334	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
335	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
336	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
337	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
338	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
339	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
340	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
341	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
342	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
343	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
344	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
345	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0
346	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
347	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
348	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
349	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
351	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
352	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
354	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
355	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
356	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
357	0	0	0.7	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
358	0	0	1	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
359	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
361	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
362	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
363	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
364	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7

10

20

30

40

50

【表 29 - 13】

365	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
366	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
367	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
368	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
369	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
370	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
371	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
373	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
375	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
376	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
377	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
378	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
379	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0
380	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
381	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
382	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
383	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
384	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
385	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
386	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
388	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
389	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
390	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
391	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
392	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
393	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
394	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
395	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
396	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 14】

397	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
398	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
399	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
401	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
402	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0
403	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
404	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
405	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
407	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
409	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
411	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
412	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
414	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
415	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
416	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
417	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
418	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
419	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
420	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
421	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
422	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
423	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
424	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
425	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
426	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
427	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
428	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 15】

429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
431	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
432	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
433	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
434	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
435	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
436	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
437	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
438	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
439	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
441	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0
442	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
444	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
445	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
446	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
447	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
449	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
451	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
452	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
454	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
455	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
456	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
458	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
459	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 16】

461	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
462	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
463	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
465	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
466	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
467	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
468	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
469	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
470	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
471	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
472	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
473	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
474	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
475	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
477	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
478	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
479	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
481	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
482	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
483	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
484	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
486	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
487	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
488	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
489	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
491	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
492	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 17】

493	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
494	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0				
495	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
496	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0				
497	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0			
498	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0			
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0			
501	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0			
502	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
503	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0			
504	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
505	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
506	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0			
507	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
508	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0		
509	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	
510	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
511	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
513	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
514	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
515	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
516	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	
517	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	
518	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
519	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
520	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
521	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
522	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
523	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
524	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 18】

525	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
526	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
527	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
528	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
529	0	0	1	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
530	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
531	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
532	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
533	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
534	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
535	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0
536	0	1	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
537	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0.7	0
538	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
539	0	1	1	1	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
540	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
541	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1
542	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
543	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
544	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
545	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
546	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
547	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
548	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
549	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
551	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
552	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
553	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
554	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
555	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
556	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 19】

557	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
558	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
559	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
560	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
561	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0
563	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
564	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
565	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
566	0	0	0	1	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
567	0.7	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
568	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
569	0	0	1	0	0	1	0.7	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
570	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
571	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
573	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
574	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
576	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
577	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
578	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
579	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
580	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
581	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
582	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
583	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
584	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
585	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
586	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
587	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
588	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 20】

589	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
590	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
591	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
592	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0
593	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
594	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
595	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
596	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0
597	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
598	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
599	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
601	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
602	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
603	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
604	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
605	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
606	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1
607	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
608	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
609	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
610	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0
611	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1
612	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
613	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0
614	0.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
615	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
616	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
617	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0
618	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
619	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
620	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 2 1】

621	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
622	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
623	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
624	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
626	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
627	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
628	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
629	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
630	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
631	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
632	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
633	0	0	0	1	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
634	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
635	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
636	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
637	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
638	0	0	1	0	0	1	0	0	0.7	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
639	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
640	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
641	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
642	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
643	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
644	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
645	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
646	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
647	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
648	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
651	0.7	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
652	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 2 2】

653	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
654	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
655	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
656	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
657	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
658	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
659	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
661	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
662	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
663	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
664	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
665	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
666	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
667	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
668	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
669	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
670	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
671	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
672	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
673	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
674	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
675	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
676	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
677	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
678	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
679	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
680	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
681	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
682	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
683	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
684	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 23】

685	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
686	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0
687	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
688	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
689	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
690	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
691	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
692	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
693	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
694	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
695	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
696	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
697	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
698	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
699	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
701	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
702	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
703	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
704	0	0	1	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
705	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
706	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7
707	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
708	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
709	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
710	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
711	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
712	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
713	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
714	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
715	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
716	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 2 4】

717	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
718	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
719	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	1	0	0	0
720	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
721	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
722	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0
723	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
724	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0.7
725	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
726	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
727	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
728	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
729	0.7	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
730	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
731	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
732	0	0.7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
733	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
734	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
735	0	0	1	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
736	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
737	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
738	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
739	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
740	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
741	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
742	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
743	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
744	1	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
745	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
746	0	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
747	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
748	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 2 5】

749	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
750	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
751	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
752	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
753	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0
754	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
755	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
756	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
757	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
758	1	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
759	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0
760	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
761	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
763	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	1	0	0	0	0
764	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
765	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
766	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
767	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
768	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	0	0
769	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
770	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
771	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0
772	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
773	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0
774	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0.7	1	0	0	1	0
775	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
776	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
777	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
778	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
779	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
780	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

50

【表 29 - 26】

781	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
782	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
783	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.7	0	0	0	0	1	0	0
784	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
785	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0
786	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
787	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
788	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
789	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	0
790	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	1	0
791	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
792	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
793	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
794	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.7	0
795	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
796	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0
797	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
798	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
799	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	0.7	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
801	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
802	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
803	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
804	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
805	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
806	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
807	0	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
808	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

【0125】

実施例 21 : pA21841 及び pA29798 の大規模なワンポット反応

SuSy (pA21841) または B12GT (pA29798) を含む *E. coli* 微生物は、1 L 及び 10 L 発酵槽で発現された。細胞を収集し、フレンチプレスによって溶解した。発現したタンパク質は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によって精製され、脱塩緩衝液 (20 mM の KPO₄ (pH 6)、50 mM の NaCl) 中で透析された。ワンポット反応は、Reb A とステビオシドをそれぞれ Reb D と Reb E に変換するために使用された。pA21841 及び pA29798 を、50 mM の KPO₄ (pH 6) 及び 50 mM の NaCl 中の 100 mg/ml の RA50、

50

250 mMのスクロース、及び0.5 mMのADPと反応させた。合計10回の20 mLのワンポット反応が実施された。反応物を凍結乾燥し、組み合わせた反応生成物を、Agilent 6545 QTOF質量分析計(カラム: 150 x 2.1 mm Phenomenex C18-PS)を使用する液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)によってレバウジオシド含有量について分析した。Reb AからReb Dへの完全な変換、及びステビオシドからReb Eへの完全な変換を観察した(図7、表29)。

【0126】

【表30】

表29: pA21841及びpA29798のワンポット反応生成物のレバウジオシド含有量

レバウジオシド	保持時間(分間)	面積	% (SGのみ)
不明(質量: 1127)	4.6	28703	0.3
Reb E	5.2	3768926	37.5
Reb D	5.4	6011185	59.8
Reb A	8.1	164560	1.6
ステビオシド	8.2	86265	0.9

10

20

【0127】

実施例22: pA21841及びpA29646の大規模なワンポット反応

Susy(pA21841)またはB12GT(pA29646)を含むE.coli微生物は、10L発酵槽で発現される。細胞を収集し、フレンチプレスによって溶解した。発現したタンパク質は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)によって精製し、脱塩緩衝液(20 mMのKPO₄(pH6)、50 mMのNaCl)中で透析された。ワンポット反応は、Reb AとステビオシドをそれぞれReb DとReb Eに変換するために使用された。pA21841及びpA29646を、50 mMのKPO₄(pH6)及び50 mMのNaCl中の100 mg/mlのRA50、250 mMのスクロース、及び0.5 mMのADPと反応させた。合計10回の20 mLのワンポット反応が実施された。反応物を凍結乾燥し、組み合わせた反応生成物を、Agilent 6545 QTOF質量分析計(カラム: 150 x 2.1 mm phenomenex C18-PS)を使用する液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)によってレバウジオシド含有量について分析した。Reb AからReb Dへの完全な変換、及びステビオシドからReb Eへの完全な変換を観察した(図8-HMM、表30)。

30

40

【0128】

50

【表 3 1】

表 3 0 : p A 2 1 8 4 1 及び p A 2 9 6 4 6 のワンポット反応生成物のレバウジオシド含有量

	保持時間 (分間)	面積	% (SGの み)
不明 (質量 : 1 1 2 7)	5	2 0 7 5	0
R e b E	5 . 4	9 5 4 5 1 6	3 2
R e b D	5 . 6	1 6 5 8 2 3 6	6 5
R e b A	8 . 7	4 9 2 2 3	2
ステビオシド	8 . 8	2 2 0 5 7	1

10

【 0 1 2 9 】

実施例 23 : 設計された B 1 2 G T 及び S u S y の *P i c h i a p a s t o r i s* 発現
 上位の設計された B 1 2 G T (実施例 1 2 、 1 3 及び 1 5 から) 及び S u S y (実施例
 1 7 及び 1 9 から) の *P i c h i a p a s t o r i s* 発現のために最適化されたポリヌ
 クレオチドを合成し (T w i s t B i o s c i e n c e) 、 *P i c h i a* シャトルベク
 ターに挿入した。ベクターは、市販の *P i c h i a p a s t o r i s* 株 (A T C C) に
 形質転換された。形質転換された微生物を B M G Y (緩衝グリセロール複合体) 培地で増
 殖させ、メタノールの供給によってタンパク質発現を誘導した。 *P i c h i a* 細胞を Y -
 P E R (酵母タンパク質抽出試薬、 T h e r m o S c i e n t i f i c) で溶解し、発
 現したタンパク質を固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) で精製し
 、脱塩緩衝液 (2 0 m M の K P O 4 (p H 6) 、 5 0 m M の N a C l) で脱塩した。設計
 された B 1 2 G T 及び S u S y は可溶性発現し、触媒活性を示した。図 9 は、 *P i c h i a*
p a s t o r i s の発現から精製された、設計された B 1 2 G T の S D S - P A G E
 ゲルを示す。

20

30

【 0 1 3 0 】

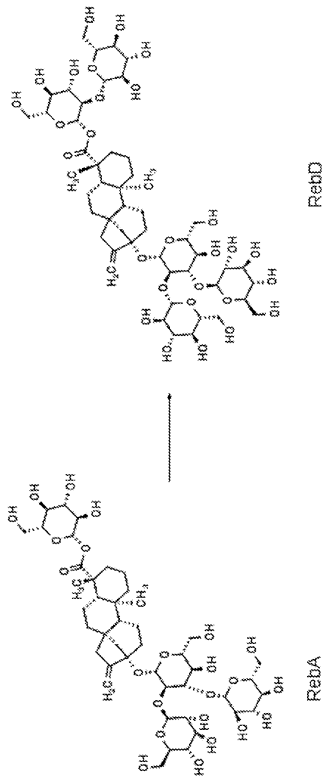
2 つの設計された B 1 2 G T と 2 つの設計された S u S y も 1 L の発酵で発現された。
P i c h i a 微生物は、グリセロールを主な炭素源として使用して約 2 4 時間増殖し、そ
 の後、メタノールを約 7 2 時間供給し、所望の B 1 2 G T または S U S Y を発現させた。
 細胞を収集し、フレンチプレスによって溶解した。発現したタンパク質は、固定化金属ア
 フィニティークロマトグラフィー (I M A C) によって精製され、脱塩緩衝液 (2 0 m M
 の K P O 4 (p H 6) 、 5 0 m M の N a C l) 中で透析された。図 1 0 A は、1 L の *P i c h i a*
p a s t o r i s 発酵から精製された 2 つの設計された B 1 2 G T 、 p A 2 9
 7 9 8 (左、 B 1 2 G T - 1) 及び p A 3 2 9 4 6 (右、 B 1 2 G T - 2) の S D S - P
 A G E ゲルを示す。図 1 0 B は、1 L の *P i c h i a p a s t o r i s* 発酵から精製さ
 れた 2 つの設計された S u S y 、 p A 3 4 1 0 3 (左、 S u S y - 1) 及び p A 3 2 6 9
 1 (右、 S u S y - 2) の S D S - P A G E ゲルを示す。4 つの酵素は全て発酵において
 首尾よく発現され、所望の活性を示した。

40

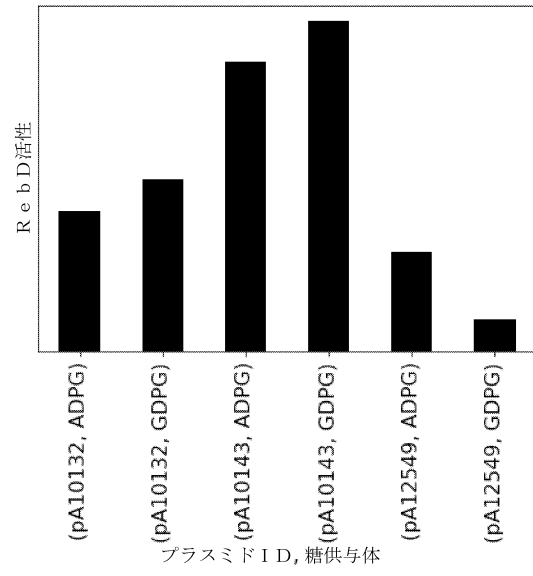
50

【 図 面 】

【 図 1 】



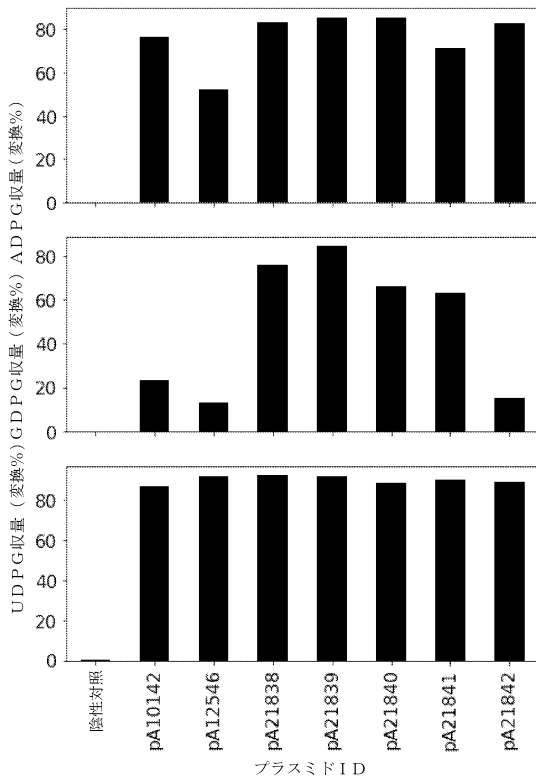
【 図 2 】



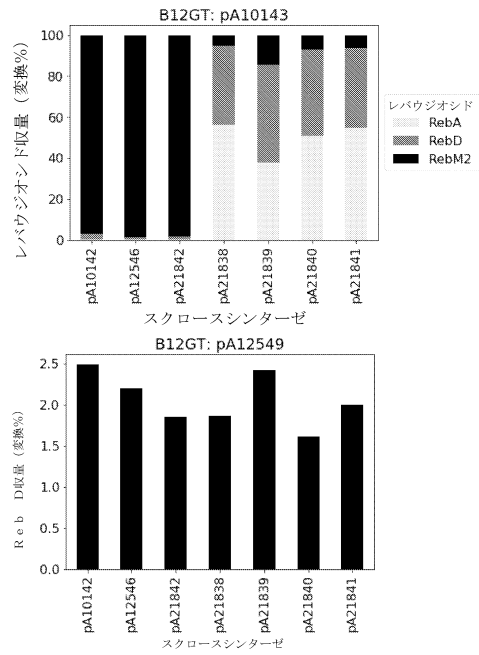
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

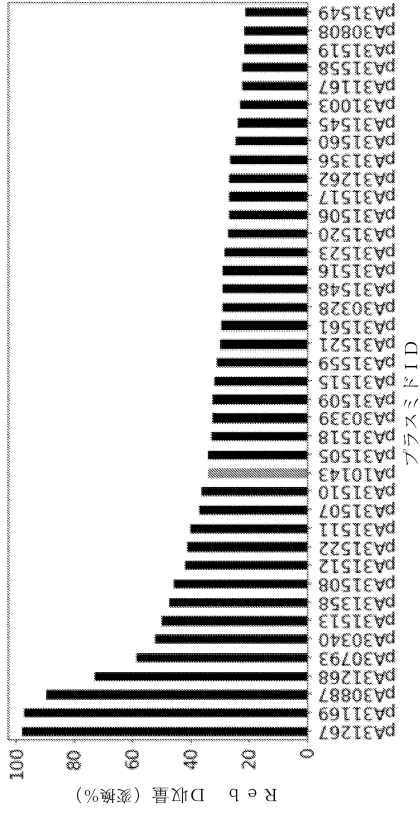


30

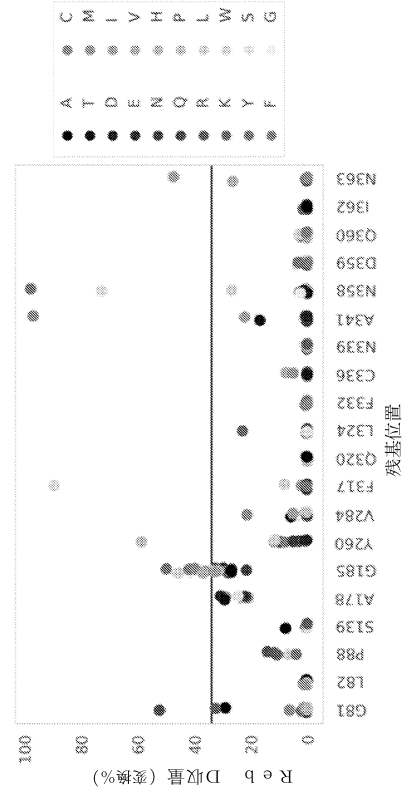
40

50

【 図 5 】



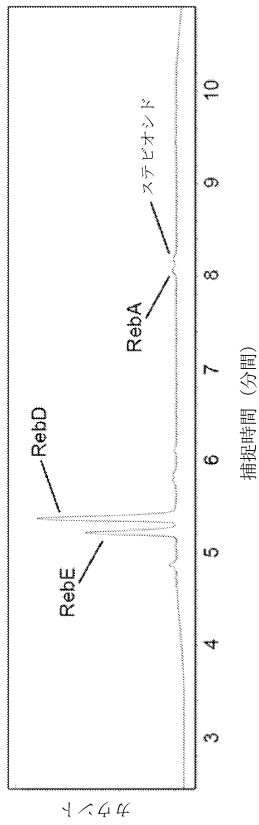
【 図 6 】



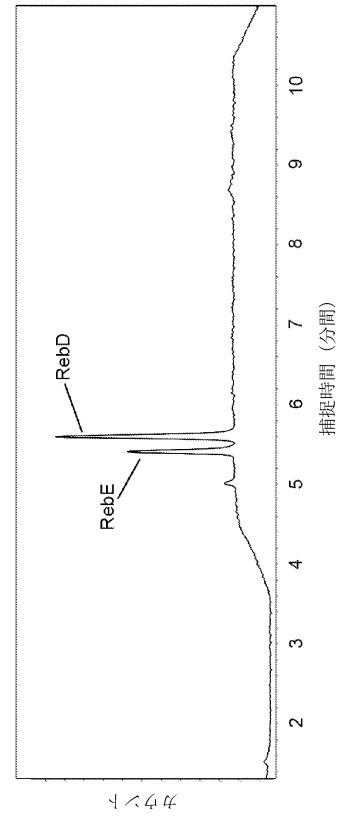
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

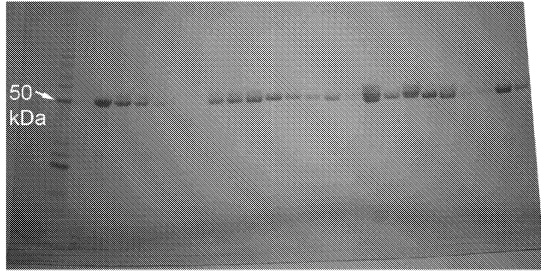


30

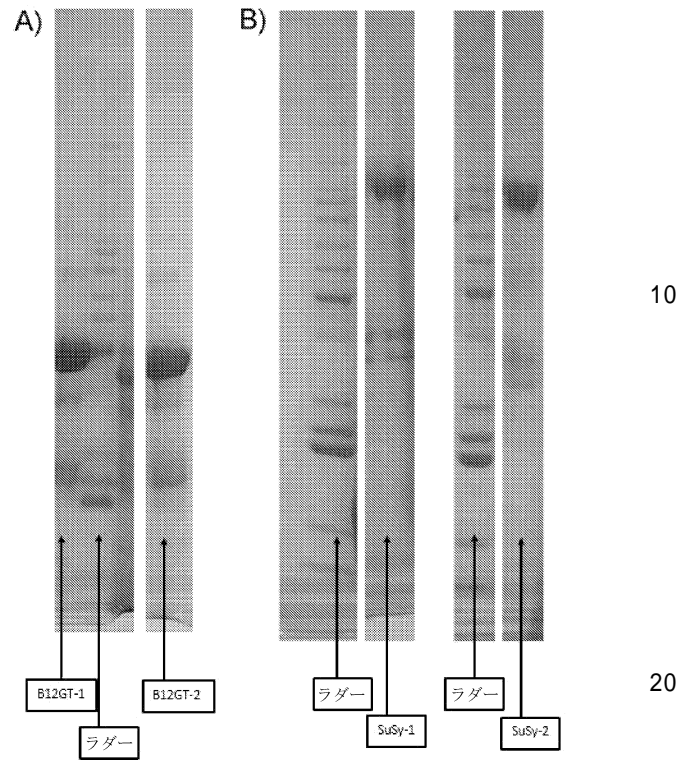
40

50

【 図 9 】



【 図 10 】



【 配列表 】

[2024507361000001.app](#)

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/16820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C12P 19/56, C12P 19/18, C12N 9/14 (2022.01)
CPC - C12N 9/1048, A23L 27/33, C12N 9/1062, A23V 2002/00, C12N 9/1051
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/237226 A1 (ARZEDA CORP.) 26 November 2020 (26.11.2020) para [0006], [0011], [00110], [00173]	1-2, 39/(1-2)
Y	US 2019/0040434 A1 (THE COCA-COLA COMPANY et al.) 07 February 2019 (07.02.2019) abstract, [0191], [0192], SEQ ID NO: 9	1-2, 39/(1-2)

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"D" document cited by the applicant in the international application	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

40

Date of the actual completion of the international search 22 May 2022	Date of mailing of the international search report JUL 13 2022
--	--

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Karl Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300
---	--

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/16820

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

10

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

20

3. Additional comments:

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/16820

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 10

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.: 33-38, 40
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

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

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

----- see extra sheet -----

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 30
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-2 and 39/(1-2), limited to SEQ ID NO: 6 40

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/16820

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-6, 8-16, 18-19, 21 and 39(in part), directed to a composition comprising an engineered beta-1,2-glycosyltransferase (B12GT) polypeptide. The engineered B12GT polypeptide composition will be searched to the extent that the B12GT comprises an amino acid sequence that is at least 60% identical to SEQ ID NO: 6. It is believed that claims 1-2 and 39(in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass said engineered B12GT polypeptide. Additional engineered B12GT polypeptides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected engineered B12GT polypeptides. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an engineered B12GT polypeptide comprises an amino acid sequence that is at least 60% identical to SEQ ID NO: 1333 (1, 6 and 39(in part)).

10

Group II+: Claims 7, 17, 20, and 39(in part), directed to a composition comprising an engineered polypeptide that has a PSSM (position-specific scoring matrix) score greater than a set threshold, using a table of values created to calculate said score. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The engineered polypeptide may be searched, for example, to the extent that the polypeptide is a beta-1,2-glycosyltransferase (B12GT), and the score is greater 266.7 when scored by the PSSM shown in applicant Table 17. It is believed that claims 7 and 39(in part) limited to said engineered polypeptide, read on this exemplary invention. Additional engineered polypeptides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected engineered polypeptides. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an engineered sucrose synthase polypeptide that has a score greater than 556 when scored by the PSSM shown in applicant Table 24 (Claims 17 and 39(in part)).

20

Group III+: Claims 22-32, directed to a method for transferring a sugar moiety to a substrate steviol glycoside, the method comprising contacting an engineered B12GT polypeptide and an engineered sucrose synthase (SuSy) polypeptide with one or more steviol glycosides, a non-LDP nucleotide diphosphate, and sucrose. Group III+ will be searched upon payment of additional fees. The sugar transfer method may be searched, for example, to the extent that the B12GT comprises an amino acid sequence that is at least 60% identical to an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 1, and the SuSy comprises an amino acid sequence that is at least 60% identical to an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 883. It is believed that claims 22-25, and 31-32 (in part) limited to said sugar transfer method, read on this exemplary invention. Additional sugar transfer methods will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sugar transfer methods. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a method for transferring a sugar moiety to a substrate steviol glycoside wherein the B12GT polypeptide is an engineered B12GT that has a score greater than 266.7 when scored by the PSSM shown in Table 17, the SuSy polypeptide is an engineered sucrose synthase that has a score greater than 556 when scored by the PSSM shown in Table 24 (Claims 22, 27-28, 30 and 31-32 (in part)).

The inventions listed as Groups I+, II+ and III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

No technical features are shared between the amino acid sequences of the of Group I+, Group II+ and Group III+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

30

Additionally, even if the inventions listed as Group I+, Group II+ and Group III+ were considered to share technical features, these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

Group I+ requires an isolated composition comprising an engineered B12GT polypeptide, not required by group II+ and III+.

Group II+ requires an isolated composition comprising a polypeptide an engineered polypeptide that has a PSSM score greater than a set threshold using a table of values used to calculate said score, not required by groups I+ and III+.

Group III+ requires a method for transferring a sugar moiety to a substrate steviol glycoside, not required by groups I+ and II+.

***** See Next Extra Sheet to continue *****

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/16820

continuation of previous extra sheet:

Common Technical Features

The inventions of Groups I+, II+ and III+ share the technical feature of engineered B12GT polypeptide

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by WO 2020/237226 A1 to Arzeda Corp. (hereinafter 'Arzeda'). Arzeda teaches recombinant (engineered) glycosyltransferase polypeptides (para [00170] "provided herein is a recombinant glycosyltransferase polypeptide", para [00173] "the recombinant glycosyltransferase polypeptide is capable of transferring a sugar moiety to a substrate steviol glycoside.", para [0006] "the disclosed methods provide novel glycosyltransferases and methods for transferring a glucose moiety from non-UDP-sugar sugar donors to steviol glycosides" para [0011] "In further embodiments, the non-UDP-sugar sugar donor is ... (e.g., ADP-glucose ...", para [00110] "the glycosyltransferase polypeptide is any glycosyltransferase capable of adding at least one glucose unit to rebD or a rebD isomer using a non-UDP-sugar sugar donor", para [00111] "In one embodiment, a starting composition comprising reb A is contacted with a glu cosytransferase capable of catalyzing the reaction of a sugar donor ... and reb A to produce reb D") [see applicant instant specification; para [0007] "enzymes, particularly non-natural enzymes, and methods to use those enzymes to transfer a sugar moiety to a substrate steviol glycoside ... Specifically, a beta-1,2-glycosyltransferase (also referred to herein as a "B12GT")", para [0008] in contrast to native glycosyltransferases, the disclosure provides glycosyltransferase polypeptides that can utilize ADP-glucose as the sugar donor to convert Reb A to Reb D"]. Although Arzeda does not expressly recite that the recombinant glycosyltransferase polypeptide is a B12GT polypeptide, it would have been obvious to an artisan of ordinary skill in the art that to experiment with Arzeda's glycosyltransferase as a recombinant glycosyltransferase polypeptide is capable of transferring a sugar moiety to a substrate steviol glycoside, and that Arzeda's glycosyltransferase shares the same characteristics, substrates, and products (e.g. Reb D) as the claimed beta-1,2-glycosyltransferase,

10

The inventions of Groups II+ and III+ share the technical feature of the use of an engineered beta-1,2-glycosyltransferase polypeptide and an engineered sucrose synthase polypeptide.

20

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2018/0080055 A1 to Conagen Inc. (hereinafter 'Conagen') In view of Arzeda. Conagen teaches cells expressing and expression vectors comprising nucleic acids coding for glycosyltransferase polypeptide and an engineered sucrose synthase polypeptide (para [0088] "at least one whole-cell catalyst is provided ... a transformed host cell that expresses ... a uridine diphospho glycosyltransferase (UDP-glycosyltransferase or UGT) and a sucrose synthase (SUS).", para [0095] "expression cassettes may be introduced into the host cell to thereby produce the recombinant polypeptide enzymes including, but not limited to a uridine diphospho glycosyltransferase ... and a sucrose synthase"). Although Conagen does not expressly teach that the glycosyltransferase is a beta-1,2-glycosyltransferase, Arzeda teaches equivalent glycosyltransferases (as above, para [0006], [0007], [0011], [00110], [00173]). Thus, it would have been obvious to an artisan of ordinary skill in the art that an engineered beta-1,2-glycosyltransferase polypeptide and an engineered sucrose synthase polypeptide could be combined, such as to promote transfer of sugar groups to convert Reb A to Reb D, as discussed above.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+, II+ and III+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 19/52 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 K 31/704 (2006.01)
 C 0 7 H 15/256 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 19/52
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 K 31/704
 C 0 7 H 15/256

テーマコード (参考)

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,N
 E,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,IT,JM,JO,J
 P,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,N
 A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,
 TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

2 0 6 9 サン マルコス ウッズ ドライブ 5 7 0

(72)発明者

ザンヘリーニ, アレクサンドル

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 4 8 5 0 イサカ ケイユーガ ハイツ ロード 5 4 3

(72)発明者

グラブス, ダニエラ

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 0 7 シアトル エヌダブリュー 5 0 番 ストリート 1 0 5

(72)発明者

クリスチャンセン, ニクラス ダルガス

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 0 5 2 レドモンド 1 5 9 番 ピーエル エヌイー 7 5 0 8
 ナンバー 2 5 2

(72)発明者

ハヴラーネク, ジェームズ ジェイ .

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 1 5 シアトル 2 3 番 アベニュー エヌイー 6 8 4 5

(72)発明者

バン, イー - エン アンドリュー

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 3 3 ショアライン エヌ 1 9 8 番 ストリート 1 1 6 6

(72)発明者

デブコタ, アスウィニ

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 7 7 ショアライン エヌダブリュー リッチモンド ビーチ
 ロード 3 1 9 アpartment 2 6 6

(72)発明者

ナンス, マーク

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 0 2 9 サマミッシュ エスイー 4 1 番 レーン 2 4 3 4 0

F ターム (参考)

4B064 AF48 CA21 CB30 CC24 CD09 DA10

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y

AB01 AC14 CA29 CA41

4C057 BB04 DD03 JJ53

4C086 AA04 EA10 MA01 MA04 NA20 ZC35