

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506449

(P2004-506449A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 B O 3 O
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00	A 2 G O 4 2
C O 7 H 3/04	C O 7 H 3/04	4 B O 2 4
C O 7 K 16/40	C O 7 K 16/40	4 B O 5 O
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/90	4 B O 6 3
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 236 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-522510 (P2002-522510)	(71) 出願人	500020760 ザ・ユニバーシティ・オブ・クイーンズランド
(86) (22) 出願日	平成13年8月29日 (2001.8.29)		
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月26日 (2003.2.26)		
(86) 国際出願番号	PCT/AU2001/001084		
(87) 国際公開番号	W02002/018603	(74) 代理人	100107685 弁理士 高橋 健
(87) 国際公開日	平成14年3月7日 (2002.3.7)		
(31) 優先権主張番号	PQ 9768	(72) 発明者	バーチ, ロバート, ジョージ オーストラリア国、クイーンズランド 4 074、ジュンダリー、ヤリンバー スト リート 24番地
(32) 優先日	平成12年8月29日 (2000.8.29)	(72) 発明者	ウー, ルグアング オーストラリア国、クイーンズランド 4 069、ケンモア、アクーナ ストリート 123番地
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イソマルチュロース・シンターゼ

(57) 【要約】

イソマルチュロース・シンターゼ (スクロース, EC 5.4.99.11) はスクロースをイソマルチュロース (6-O-D-グルコピラノシル-D-フルクトフラノース) に変換する。この酵素をエルウィニア・ラポンティキ及び単離細菌 68 J から単離した。スクロースをイソマルチュロースに変換する方法、スクロースを変換するように植物や細菌を形質転換する方法、試料からイソマルチュロース・シンターゼを検出する方法、及び環境試料からイソマルチュロースを有する細菌を同定する方法も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードする新規なポリヌクレオチドを単離する方法であって、

(a) スクロースをイソマルチュロースに変換できる生物が選択的に有利性を持つ場所から環境試料を採取する工程、

(b) スクロースからイソマルチュロースを生産する生物をスクリーニングする工程、及び

(c) イソマルチュロースを生産する生物からイソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドを単離する工程、を含む方法。

10

【請求項 2】

増殖のための炭素源としてスクロースとイソマルチュロースの両方を利用できるスクロース代謝及びイソマルチュロース代謝の二重代謝性の生物を選択し又はそれ以外の方法で濃縮する工程をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

該選択又は濃縮の工程が、イソマルチュロースを代謝する生物を選択し又は濃縮するのに十分な時間及び条件の下で該環境試料の生物をイソマルチュロース含有培地上で成長させる工程、及びスクロース代謝及びイソマルチュロース代謝の二重代謝性の生物を選択し又は濃縮するのに十分な時間及び条件の下で該イソマルチュロースを代謝する生物をスクロース含有培地上で成長させる工程を含むものである、請求項 2 記載の方法。

20

【請求項 4】

該選択又は濃縮工程が、スクロースを代謝する生物を選択し又は濃縮するのに十分な時間及び条件の下で該環境試料の生物をスクロース含有培地上で成長させる工程、及びスクロース代謝及びイソマルチュロース代謝の二重代謝性の生物を選択し又は濃縮するのに十分な時間及び条件の下で該スクロースを代謝する生物をイソマルチュロース含有培地上で成長させる工程を含むものである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

該スクリーニング工程が生物によるイソマルチュロース生産を定量する検定法を利用するものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

該検定法がアニリン/ジフェニルアミン検定である、請求項 5 記載の方法。

30

【請求項 7】

該環境試料が土壌又は植物物質を含むものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

該環境試料がかなりのスクロース濃度の周期的又は定常的利用可能性を有する場所から得られるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

該場所が糖含有植物又は植物部分の処理又は貯蔵を必要とする工場又は収穫された糖含有植物の遺物を含む畑から選択されるものである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

該糖含有植物が砂糖大根又はサトウキビである、請求項 9 記載の方法。

40

【請求項 11】

該糖含有植物がサトウキビである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】

該ポリヌクレオチドがスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドに特異的なプローブを用いて単離されるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

該ポリヌクレオチドが、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 及び配列番号：24 のいずれか一つに記載されたスクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列又はその変異型にハイブリダ

50

イズできるプローブを用いて単離されるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 4】

該変異型が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 及び配列番号：24 に記載されたアミノ酸配列のいずれか一つに少なくとも 80% の配列同一性を有するものである、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

該ヌクレオチド配列が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35 及び配列番号：36 のいずれか一つに記載された配列、又はそのヌクレオチド配列変異型を含むものである、請求項 1 3 記載の方法。

10

【請求項 1 6】

該ヌクレオチド配列変異型が配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35 及び配列番号：36 に記載された配列のいずれか一つに少なくとも 60% の配列同一性を有するものである、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

該ヌクレオチド配列変異型が配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35 及び配列番号：36 により同定された配列のいずれか一つと少なくとも低度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項 1 5 記載の方法。

20

【請求項 1 8】

配列番号：2 又は配列番号：4 の該生物活性断片が配列番号：26 内に含まれるアミノ酸の連続した配列又はその変異型を含むことを条件として、ポリペプチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8 及び配列番号：10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである、単離された該ポリペプチド、又はその生物活性断片、又はこれらの変異型若しくは誘導体。

【請求項 1 9】

該生物活性断片が少なくとも 6 アミノ酸長である、請求項 1 8 記載のポリペプチド。

【請求項 2 0】

該生物活性断片が配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 又は配列番号：24 から選択される少なくとも一つのコンセンサス配列を含むものである、請求項 1 8 記載のポリペプチド。

30

【請求項 2 1】

該変異型が配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8、配列番号：10 及び配列番号：26 に記載された配列のいずれか一つに少なくとも 75% の配列同一性を有するものである、請求項 1 8 記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

該変異型が配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 又は配列番号：24 のいずれか一つ以上に記載されたコンセンサス配列又はその変異型を含むものである、請求項 1 8 記載のポリペプチド。

40

【請求項 2 3】

該コンセンサス配列変異型が配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 又は配列番号：24 に記載された配列のいずれか一つに少なくとも 80% の配列同一性を有するものである、請求項 2 2 記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

請求項 1 8 記載のポリペプチド、断片、変異型又は誘導体をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 5】

配列番号：1 又は 3 の該生物活性断片が配列番号：25 内に含まれるヌクレオチドの連続した配列又はそのポリヌクレオチド変異型を含むことを条件として、配列番号：1、配列

50

番号：3、配列番号：7及び配列番号：9のいずれか一つに記載された配列、又は生物活性のあるその断片、又はこれらのポリヌクレオチド変異型を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項26】

該生物活性断片が少なくとも18のヌクレオチドを含むものである、請求項25記載のポリヌクレオチド。

【請求項27】

該ポリヌクレオチド変異型が、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9に記載されたポリヌクレオチドのいずれか一つに少なくとも60%の配列同一性を有するものである、請求項25記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項28】

該ポリヌクレオチド変異型が、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9により同定されたポリヌクレオチドのいずれか一つと少なくとも低度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項25記載のポリヌクレオチド。

【請求項29】

該ポリヌクレオチド変異型が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24のいずれか一つ以上に記載されたコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列又はその変異型を含むものである、請求項25記載のポリヌクレオチド。

【請求項30】

該ヌクレオチド配列が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35又は配列番号：36、又はそのヌクレオチド配列変異型から選択されるものである、請求項29記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項31】

該ヌクレオチド配列変異型が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35又は配列番号：36から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも60%の配列同一性を有するものである、請求項30記載のポリヌクレオチド。

【請求項32】

該ヌクレオチド配列変異型が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35又は配列番号：36から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも低度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項30記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項33】

調節ポリヌクレオチドに機能しうるように連結した請求項24記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項34】

配列番号：1又は3の該生物活性断片が配列番号：25内に含まれる連続したヌクレオチド配列又はそのポリヌクレオチド変異型を含むものであり且つ該ポリヌクレオチドが調節ポリヌクレオチドに機能しうるように連結していることを条件として、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9のいずれか一つに記載された配列、又はその生物活性断片、又はこれらのポリヌクレオチド変異型を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

40

【請求項35】

請求項33又は請求項34の該発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項36】

細菌又は他の原核細胞である、請求項35記載の宿主細胞。

【請求項37】

植物細胞又は他の真核細胞である請求項35記載の宿主細胞。

50

【請求項 38】

請求項 33 又は請求項 34 の発現ベクターを含む植物細胞であって、該植物がスクロースを合成及び/又は蓄積できるスピーシーズである細胞。

【請求項 39】

該植物がサトウキビ又は砂糖大根から選択されるものである、請求項 38 記載の植物細胞。

【請求項 40】

該植物がサトウキビである、請求項 38 記載の植物細胞。

【請求項 41】

組換え型の、ポリペプチド、又は生物活性のあるその断片、又はこれらの変異型又は誘導体を生産する方法であって、配列番号：2 又は配列番号：4 の該生物活性断片が配列番号：26 内に含まれる連続したアミノ酸配列又はその変異型を含むことを条件として、該ポリペプチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8 及び配列番号：10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものであり、該方法が

- 該組換え型のポリペプチド、断片、変異型又は誘導体が該ポリヌクレオチドから発現されるように請求項 33 記載の発現ベクターを含む宿主細胞を培養する工程、及び

- 該組換えポリペプチド、断片、変異型又は誘導体を単離する工程、

を含むものである方法。

【請求項 42】

ポリペプチド又はその変異型若しくは誘導体の生物活性断片を生産する方法であって、配列番号：2 又は 4 の該生物活性断片が配列番号：26 内に含まれる連続したアミノ酸配列又はその変異型を含むことを条件として、該ポリペプチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8 及び配列番号：10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものであり、該方法が

- 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8 及び配列番号：10 のいずれか一つに記載のポリペプチド又はその変異型又は誘導体の断片と関連するスクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該断片が該生物活性断片であることを示す工程、

を含むものである方法。

【請求項 43】

ポリペプチド又はその変異型若しくは誘導体の生物活性断片を生産する方法であって、配列番号：2 又は 4 の該生物活性断片が配列番号：26 内に含まれる連続したアミノ酸配列又はその変異型を含むことを条件として、該ポリペプチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8 及び配列番号：10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものであり、該方法が

- 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8 及び配列番号：10 のいずれか一つに記載のポリペプチド又はその変異型若しくは誘導体の断片がそれから生じ得るポリヌクレオチドを細胞に導入する工程、及び

- スクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該断片が該生物活性断片であることを示す工程

を含むものである方法。

【請求項 44】

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8 及び配列番号：10 のいずれか一つに記載された配列を含む親ポリペプチドのポリペプチド変異型、又はその生物活性断片を生産する方法であって、

- その配列が少なくとも一つのアミノ酸の置換、欠失又は付加により親ポリペプチドから識別される改変ポリペプチドを作成する工程、及び

- 該改変ポリペプチドと関連するスクロース・イソメラーゼ活性を検出して、該改変ポリペプチドが該ポリペプチド変異型であることを示す工程、

を含む方法。

【請求項 45】

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10のいずれか一つに記載された配列を含む親ポリペプチドのポリペプチド変異型、又はその生物活性断片を生産する方法であって、

- 変更されたポリペプチドがそれから生産され得るポリヌクレオチドを作成する工程であって、該変更されたポリペプチドが少なくとも一つのアミノ酸の置換、欠失又は付加によりその親ポリペプチドから識別される配列を持つものである工程、

- 該ポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程、及び
- スクロース・イソメラーゼ活性を検出して、該変更ポリペプチドが該ポリペプチド変異型であることを示す工程、

を含む方法。

10

【請求項46】

スクロースからイソマルチュロースを生産する方法であって、スクロース又はスクロース含有基質を、イソマルチュロースを生産するのに十分な時間及び条件の下で、請求項18記載のポリペプチド、断片、変異型又は誘導體、又は請求項33又は請求項34記載の宿主細胞と接触させる工程を含む方法。

【請求項47】

請求項18記載のポリペプチド、断片、変異型又は誘導體と免疫相互作用を行なう抗原結合分子。

【請求項48】

配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23又は配列番号：24から選択されるアミノ酸配列又はそれらと少なくとも80%の配列同一性を有する該配列の変異型と免疫相互作用を行なう、請求項47記載の抗原結合分子。

20

【請求項49】

下記の配列

(c) 配列番号：2又は配列番号：4の該生物活性断片が配列番号：26内に含まれる連続したアミノ酸配列又はその変異型を含むことを条件として、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10、又は少なくとも6アミノ酸長のそれらの生物活性断片、又はこれらの変異型、又は

(d) (a)をコードするポリヌクレオチド、
を検出する工程を含む、特定のポリペプチド又はポリヌクレオチドを検出する方法。

30

【請求項50】

配列番号：1又は配列番号：3の該生物活性断片が配列番号：25内に含まれるヌクレオチドの連続した配列又はそのポリヌクレオチド変異型を含むことを条件として、(b)の配列が配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9、又は少なくとも18ヌクレオチド長のそれらの生物活性断片、又はこれらのポリヌクレオチド変異型から選択されるものである、請求項49記載の方法。

【請求項51】

試料中のスクロース・イソメラーゼを検出する方法であって、

- 該試料を請求項47記載の抗原結合分子と接触させる工程、
- 該接触試料中で、ポリペプチド又はその生物活性断片又はこれらの変異型若しくは誘導體と該抗原結合分子からなる複合体の存在を検出する工程、

40

を含み、該ポリペプチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである方法。

【請求項52】

ポリペプチド又はその生物活性断片又はこれらの変異型若しくは誘導體をコードするポリヌクレオチドの細胞内発現を検出する工程を含む試料中のスクロース・イソメラーゼを検出する方法であって、配列番号：2又は配列番号：4の該生物活性断片が配列番号：26内に含まれる連続したアミノ酸配列又はその変異型を含むことを条件として、該ポリペプチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである方法。

50

【請求項 5 3】

発現が、スクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドに特異的なプローブを用いて検出されるものである、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

発現が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 及び配列番号：24 のいずれか一つに記載されたスクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列又はその変異型とハイブリダイズできるプローブを用いて検出されるものである、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 5】

該変異型が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 及び配列番号：24 に記載されたアミノ酸配列のいずれか一つに少なくとも 80% の配列同一性を有するものである、請求項 5 4 記載の方法。 10

【請求項 5 6】

該ヌクレオチド配列が配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35 又は配列番号：36 のいずれか一つに記載された配列又はそのヌクレオチド配列変異型を含むものである、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 7】

該ヌクレオチド配列変異型が配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35 又は配列番号：36 に記載された配列のいずれか一つに少なくとも 60% の配列同一性を有するものである、請求項 5 6 記載の方法。 20

【請求項 5 8】

該ヌクレオチド配列変異型が配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35 又は配列番号：36 により同定される配列のいずれか一つに少なくとも低度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 9】

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8 及び配列番号：10 をコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部に少なくとも低度の厳格性条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含むプローブ。 30

【請求項 6 0】

配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7 及び配列番号：9 の少なくとも一部に少なくとも低度の厳格性条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含むプローブ。

【請求項 6 1】

下記の工程

- 請求項 4 7 記載の抗原結合分子と試料を接触させてスクロース・イソメラーゼと該抗原結合分子とからなる複合体を形成させる工程、及び

- 該複合体からスクロース・イソメラーゼを分離する工程

を含む、試料からスクロース・イソメラーゼを単離する方法。 40

【請求項 6 2】

請求項 3 3 又は請求項 3 4 記載の発現ベクターを含む形質転換された植物細胞。

【請求項 6 3】

該植物がスクロースを合成及び / 又は蓄積できるスピーシーズである、請求項 6 2 記載の植物細胞。

【請求項 6 4】

該植物がサトウキビ又は砂糖大根から選択されるものである、請求項 6 2 記載の植物細胞。

【請求項 6 5】

該植物がサトウキビである、請求項 6 2 記載の植物細胞。 50

【請求項 6 6】

請求項 3 3 又は請求項 3 4 に記載された発現ベクターを含む植物細胞を含む分化した植物。

【請求項 6 7】

- 請求項 3 3 又は請求項 3 4 に記載された発現ベクターを含む植物細胞を含む分化した植物を栽培する工程、及び
- 該栽培した植物からイソマルチュロースを収穫する工程、
を含む、イソマルチュロースを生産する方法。

【請求項 6 8】

請求項 3 3 又は請求項 3 4 に記載された発現ベクターを含む植物細胞を含む分化した植物から収穫したイソマルチュロース。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は一般的にスクロースをイソマルチュロースに変換する酵素に関する。より具体的には、本発明は、新規なスクロース・イソメラーゼ、これらのスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドを単離する方法、及びこれらのポリヌクレオチドを発現する核酸構築物に関する。本発明は、細胞、具体的には形質転換された細菌又は植物の細胞、及びこれらの核酸構築物を含有する細胞を含む分化した植物にも関する。本発明はさらにイソマルチュロースを生産するための本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、細胞及び植物の使用に関する。 20

【0002】

発明の背景

アカリオゲニック (acar i o g e n i c) な糖置換体であるイソマルチュロース (パラチノース) は、- 1, 6 - グルコシド結合を介して相互に結合するグルコース及びフルクトースから構成されるヘテロ二糖である。イソマルチュロースは細菌酵素のスクロース・イソメラーゼを用いたスクロースの酵素転位により大規模に生産できる。

【0003】

当初、イソマルチュロースの大規模な生産は、天然でスクロース・イソメラーゼ酵素を生産する細菌の細胞 (例えば、プロタミノバクター・ルブルム (Protaminobacter rubrum)、エルヴィニア・ラポンティキ (Erwinia rhapontici) 及びセラッティア・プリムティカ (Serratia plymuthica) の種) の固定化物を用いて促進された。イソマルチュロースのより高い収率は組換え技術を用いて最近達成された。この点において、マッテスら (米国特許出願番号 5, 786, 140) はプロタミノバクター・ルブルム (CBS 547, 77)、エルヴィニア・ラポンティキ (NCP PB 1578)、微生物の SZ 62 (エンテロバクター (Enterobacter) の種) 及び微生物の MX - 45 (FERM 11808 又は FERM BP 3619) から得られるスクロース・イソメラーゼ酵素の一部又は全長をコードする単離されたポリヌクレオチドを開示している。 30

【0004】

マッテスらは保存アミノ酸配列も開示している。この配列から、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドをクローニングするための縮重オリゴヌクレオチドを設計できるであろう。 40

【0005】

発明の概要

本発明に至る研究において、エルヴィニア・ラポンティキ (登録番号 WAC 2928) から並びに 30 個の独立した且つスクロース・イソメラーゼに陰性の単離細菌から、マッテスらにより開示された保存アミノ酸配列に基づく縮重オリゴヌクレオチドを用いて、PCR によりスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドを増幅した。PCR の増幅によりほとんどの試験細菌から複数の DNA 産物が得られた。しかしながら、これら 50

の産物はスクロース・イソメラーゼをコードすることが見出されなかった。エルウィニア・ラボンティキから増幅された6個の産物を含む12個のそれぞれのPCR産物についての核酸配列分析は、いずれのDNA産物もスクロース・イソメラーゼ遺伝子に明確な配列相同性を示さないことを明らかにした。その代わりに、大半のこれらの産物は既知のグルコシダーゼ遺伝子に高い配列相同性を示した。従って、マッテスらの保存配列はスクロース・イソメラーゼに特異的なものではないが、グルコシダーゼを含む他のクラスの酵素に共通していると結論した。

【0006】

上記にもかかわらず、本発明者らはイソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードする新規なポリヌクレオチドの単離及び特性決定のための新規な機能的スクリーニング検定を開発した。このような幾つかの新規なポリヌクレオチドはこの検定を用いてクローニングされ、これらの幾つかはマッテスらにより開示されたものと比べてより優れたスクロース・イソメラーゼ活性をもつポリペプチドをコードすることが見出された。既知のスクロース・イソメラーゼ又はグルコシダーゼのポリペプチド配列と推定ポリペプチド配列との比較から、幾つかの保存モチーフが明らかにされた。これらのモチーフは、スクロース・イソメラーゼに特有であるため、とりわけスクロース・イソメラーゼに特異的なオリゴヌクレオチドを設計するために使用できるであろう。このようなオリゴヌクレオチドは、それらが核酸増幅技術を用いてスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドの容易な単離を初めて提供する点で有利である。

10

【0007】

本発明者らは上記の発見を下記の明細書に記載されるようにイソマルチュロースを生産するための新規な単離分子、組換え細胞及び組換え植物を用いて実施に移した。

20

【0008】

従って、本発明の一側面において、イソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードする新規なポリヌクレオチドを単離する方法であって、

(a) スクロースをイソマルチュロースに変換できる生物を有利に選択できる場所から環境試料を得る工程；

(b) スクロースからイソマルチュロースを生産する生物についてスクリーニングする工程；及び

(c) イソマルチュロースを生産する生物からイソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドを単離する工程

30

を含む方法を提供する。

【0009】

この方法は、増殖のための炭素源としてスクロースとイソマルチュロースの両方を用いることのできるスクロース及びイソマルチュロースを二重に代謝する生物を選択する又は他の方法で濃縮する工程をさらに含むことが好ましい。

【0010】

該スクリーニングは生物によるイソマルチュロース生産を定量する検定法を利用することが好ましい。

【0011】

本発明の他の側面において、単離されたポリペプチド、又はその生物活性のある断片、又はこれらの変異型若しくは誘導体が提供される。該ポリペプチドは、配列番号：2又は配列番号：4の生物活性のある断片が配列番号：26内又はその変異型内に含まれる連続したアミノ酸配列を含むことを条件として、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【0012】

該変異型は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8、配列番号：10及び配列番号：26に示されるアミノ酸配列のいずれか一つに対して少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%並びにさらにより好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有することが好ましい。

50

生物活性のある該断片は少なくとも6アミノ酸長であることが好ましい。

【0013】

該変異型は、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24又はそれらの変異型のいずれか一つ以上に示される共通配列を含むことが好ましい。

【0014】

該共通配列の変異型は、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24に示されるアミノ酸配列のいずれか一つに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%及びさらにより好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有することが好ましい。

10

【0015】

他の側面において、本発明は上記で大まかに記載したポリペプチド、断片、変異型又は誘導体をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。該ポリヌクレオチドは、配列番号：1又は配列番号：3の生物活性のある断片が配列番号：25内又はそのポリヌクレオチド変異型内に含まれるヌクレオチドの連続配列を含むという条件の下で、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9又はそれらの生物活性のある断片、又はこれらのポリヌクレオチド変異型のいずれか一つに示される配列を含むことが好ましい。

【0016】

一実施態様において、該ポリヌクレオチド変異型は、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9に示されるポリヌクレオチドのいずれか一つに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%及びさらにより好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する。

20

【0017】

他の実施態様において、該ポリヌクレオチド変異型は、少なくとも低度の厳格性の条件下で、好ましくは少なくとも中程度の厳格性の条件下で、より好ましくは高度の厳格性の条件下で、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9により同定されるいずれか一つのポリヌクレオチドにハイブリダイズできる。

生物活性のある該断片は少なくとも18ヌクレオチドの長さであることが好ましい。

【0018】

該ポリヌクレオチド変異型は、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24又はそれらの変異型のいずれか一つ以上に示される共通配列をコードするヌクレオチド配列を含むことが好ましい。

30

【0019】

該共通配列は、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36又はそれらのヌクレオチド配列変異型のいずれか一つに示されるヌクレオチド配列によりコードされることが好ましい。

【0020】

一実施態様において、該ヌクレオチド配列の変異型は、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36に示される配列のいずれか一つに対して少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%及びさらにより好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する。

40

【0021】

他の実施態様において、該ヌクレオチド配列の変異型は、少なくとも低度の厳格性の条件下、好ましくは少なくとも中程度の厳格性の条件下、より好ましくは高度の厳格性の条件下で、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36により同定されるいずれか一つの配列にハイブリダイズできる。

50

【0022】

他の側面において、本発明は上で大まかに記載したポリヌクレオチドを含む発現ベクターを特徴とする。この発現ベクトル内で該ポリヌクレオチドは調節ポリヌクレオチドと機能的に連結される。

【0023】

さらなる側面において、本発明は該発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0024】

該宿主細胞は細菌若しくは他の原核生物又は植物細胞若しくは他の真核生物であることが好ましい。

【0025】

該植物はサトウキビ（サッカラム（*Saccharum*）の種）又はスクロースを合成及び／又は蓄積できる他の種（例えば、砂糖大根）であることが好ましい。

【0026】

本発明は上で大まかに記載した組換えのポリペプチド、断片、変異型又は誘導体を生産する方法であって、

- 該組換えのポリペプチド、断片、変異型又は誘導体が該ポリヌクレオチドから発現されるように、上に大まかに記載した発現ベクターを含む宿主細胞を培養する工程、及び
 - 該組換えのポリペプチド、断片、変異型又は誘導体を単離する工程
- を含む方法をも特徴とする。

【0027】

他の側面において、本発明は上で大まかに記載したポリペプチドの生物活性のある断片を生産する方法であって、

- 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10のいずれか一つに記載のポリペプチドの断片と関連したスクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該断片が該生物活性のある断片であることを示す工程、
- を含む方法を提供する。

【0028】

さらなる側面において、本発明は上で大まかに記載した生物活性のある断片を生産する方法であって、

- 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10のいずれか一つに記載のポリペプチドの断片がそれから生産され得るポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程、及び
 - スクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該断片が該生物活性のある断片であることを示す工程、
- を含む方法を提供する。

【0029】

更なる側面において、本発明は配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10いずれか一つに記載される配列又はそれらの生物活性断片を含む親ポリペプチドのポリペプチド変異型を生産する方法であって、

- 少なくとも一アミノ酸の置換、欠失又は付加によりその配列が該親ポリペプチドから識別される改変されたポリペプチドを生産する工程、及び
 - 該改変されたポリペプチドと関連するスクロース・イソメラーゼ活性を検出し、改変された該ポリペプチドが該ポリペプチド変異型であることを示す工程、
- を含む方法を提供する。

【0030】

さらなる側面において、本発明は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10のいずれか一つに記載された配列、又はそれらの生物活性断片を含む親ポリペプチドのポリペプチド変異型を生産する方法であって、

- 上述の改変されたポリペプチドがそれから生産され得るポリヌクレオチドを生産する工程、

10

20

30

40

50

- 該ポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程、及び
 - スクロース・イソメラーゼ活性を検出し、改変された該ポリペプチドが該ポリペプチド変異型であることを示す工程、
- を含む方法を意図する。

【0031】

本発明の他の側面にしたがって、スクロースからイソマルチュロースを生産する方法であって、イソマルチュロースを生産するのに十分な時間及び条件の下で、スクロース又はスクロースを含有する基質を上で大まかに記載したポリペプチド、断片、変異型若しくは誘導体と又は上で大まかに記載した宿主細胞と接触させる工程を含む方法が提供される。

【0032】

他の側面において、本発明は、本発明のポリペプチド、断片、変異型又は誘導体と免疫相互作用する抗原結合分子に関する。

【0033】

該抗原結合分子は、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24に記載のアミノ酸配列又はそれらの変異型のいずれか一つと免疫相互作用するものであることが好ましい。

【0034】

本発明の他の側面は特異的なポリペプチド又はポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) 配列番号：2若しくは配列番号：4の生物活性断片が配列番号：26内若しくはその変異型内に含まれる連続したアミノ酸配列を含むという条件の下で、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10、若しくは長さが少なくとも6アミノ酸のそれらの生物活性断片、若しくはこれらの変異型、又は

(b) (a)をコードするポリヌクレオチドの配列を検出する工程を含む方法を提供する。

【0035】

好ましい実施態様においては、配列番号：1又は配列番号：3の生物活性のある断片が配列番号：25内又はそのポリヌクレオチド変異型内に含まれるヌクレオチドの連続配列を含むという条件の下で、(b)の配列は、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9、又は長さが少なくとも18ヌクレオチドのそれらの生物活性断片、又はこれらのポリヌクレオチド変異型から選択される。

【0036】

本発明の他の側面によれば、試料中のスクロース・イソメラーゼを検出する方法であって、

- 上記で大まかに記載した抗原結合分子と該試料とを接触させる工程、及び
 - 該接触した試料中における該抗原結合分子と該ポリペプチド、断片、変異型又は誘導体から成る複合体の存在を検出する工程
- を含む方法が提供される。

【0037】

さらなる他の側面において、上で大まかに記載したポリペプチド、断片、変異型又は誘導体を検出する方法であって、

- 上で大まかに記載したポリペプチド、断片、変異型又は誘導体をコードするポリヌクレオチドの細胞における発現を検出する工程
- を含む方法が提供される。

【0038】

本発明の更なる側面は、少なくとも低度の厳格性の条件下で配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10をコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部にハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含むプローブを提供する。

【0039】

10

20

30

40

50

好ましい実施態様において、該プローブは少なくとも低度の厳格性の条件下で配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9の少なくとも一部にハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含む。

【0040】

本発明の他の側面にしたがって、上で大まかに記載した発現ベクターを含む形質転換された植物細胞が提供される。

好ましい実施態様において、該植物はサトウキビ（サツカラムの種）である。

【0041】

更なる側面において、本発明は上で大まかに記載した発現ベクターを含有する植物細胞を含む分化した植物を提供する。

【0042】

更なる他の側面において、本発明は上で大まかに記載した分化した植物から得られるイソマルチュロースを提供する。

【0043】

【表A】

配列の簡単な説明：概要表

配列番号	配列	長さ
配列番号：1	エルウィニア・ラポンティキ（受託番号 WAC2928）由来の全長スクロース・イソメラーゼをコードする配列	1899 塩基
配列番号：2	エルウィニア・ラポンティキ（受託番号 WAC2928）由来のスクロース・イソメラーゼの全長ポリペプチド配列	632 残基
配列番号：3	エルウィニア・ラポンティキ（受託番号 WAC2928）由来の成熟スクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列	1791 塩基
配列番号：4	エルウィニア・ラポンティキ（受託番号 WAC2928）由来の成熟スクロース・イソメラーゼのポリペプチド配列	596 残基
配列番号：5	エルウィニア・ラポンティキ（受託番号 WAC2928）由来のスクロース・イソメラーゼに関するシグナルペプチドをコードする配列	108 塩基
配列番号：6	エルウィニア・ラポンティキ（受託番号 WAC2928）由来のスクロース・イソメラーゼに関するシグナルペプチド	36 残基
配列番号：7	単離細菌 6 8 J 由来の全長スクロース・イソメラーゼをコードする配列	1797 塩基
配列番号：8	単離細菌 6 8 J 由来の全長スクロース・イソメラーゼポリペプチド配列	598 残基
配列番号：9	単離細菌 6 8 J 由来の成熟スクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列	1698 塩基
配列番号：10	単離細菌 6 8 J 由来の成熟スクロース・イソメラーゼポリペプチド配列	565 残基
配列番号：11	単離細菌 6 8 J 由来のスクロース・イソメラーゼに関するシグナルペプチドをコードする配列	99 塩基
配列番号：12	単離細菌 6 8 J 由来のスクロース・イソメラーゼに関するシグナルペプチド	33 残基

10

20

30

【 0 0 4 4 】

【 表 A - 1 】

配列番号	配列	長さ
配列番号 : 13	6 8 J 単離物を増幅するための 5' オリゴヌクレオチドプライマー	34 塩基
配列番号 : 14	6 8 J 単離物を増幅するための 3' オリゴヌクレオチドプライマー	30 塩基
配列番号 : 15	エルウィニア・ラポンティキ (受託番号 WAC2928) の増幅 のための 5' オリゴヌクレオチドプライマー	35 塩基
配列番号 : 16	エルウィニア・ラポンティキ (受託番号 WAC2928) の増幅 のための 3' オリゴヌクレオチドプライマー	28 塩基
配列番号 : 17	1 4 S 単離物を増幅するための 5' オリゴヌクレオチドプライマー	35 塩基
配列番号 : 18	1 4 S 単離物を増幅するための 3' オリゴヌクレオチドプライマー	30 塩基
配列番号 : 19	スクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列	7 残基
配列番号 : 20	スクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列	10 残基
配列番号 : 21	スクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列	6 残基
配列番号 : 22	スクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列	6 残基
配列番号 : 23	スクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列	13 残基
配列番号 : 24	スクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列	16 残基
配列番号 : 25	エルウィニア・ラポンティキ (受託番号 WAC2928) 由来の スクロース・イソメラーゼの新規なカルボキシル末端部分 をコードするポリヌクレオチド配列	594 塩基
配列番号 : 26	エルウィニア・ラポンティキ (受託番号 WAC2928) 由来の スクロース・イソメラーゼの新規なカルボキシル末端部分 のポリペプチド配列	197 残基
配列番号 : 27	配列番号 : 1 9 に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号 : 1 の部分配列	21 塩基
配列番号 : 28	配列番号 : 2 0 に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号 : 1 の部分配列	30 塩基

10

20

30

40

【 0 0 4 5 】

【 表 A - 2 】

配列番号	配列	長さ
配列番号：29	配列番号：21に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号：1の部分配列	18塩基
配列番号：30	配列番号：23に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号：1の部分配列	39塩基
配列番号：31	配列番号：24に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号：1の部分配列	48塩基
配列番号：32	配列番号：19に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号：7の部分配列	21塩基
配列番号：33	配列番号：20に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号：7の部分配列	30塩基
配列番号：34	配列番号：21に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号：7の部分配列	18塩基
配列番号：35	配列番号：23に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号：7の部分配列	39塩基
配列番号：36	配列番号：24に記載のコンセンサス配列をコードする 配列番号：7の部分配列	48塩基
配列番号：37	ゲイセンライブラリーペプチド	8残基
配列番号：38	マッテスに基づく前向きプライマー	17塩基
配列番号：39	マッテスに基づく逆向きプライマー	19塩基

10

20

30

40

50

【0046】

発明の詳細な説明

1. 定義

他に定義しない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語及び科学用語は本発明が属する分野の当業者により一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様な又は等価なあらゆる方法及び材料は本発明の実施又は試験に用いられ得るものの、好ましい方法及び材料を記載する。本発明の目的上、次の用語を以下に定義する。

【0047】

冠詞の「a」及び「an」は該冠詞の一つ又は二つ以上（即ち少なくとも一つ）の文法上の目的語を指すために本明細書で用いられる。例として、「要素(an element)」は一つの要素又は二つ以上の要素を意味する。

【0048】

「約」という用語は、参照する量、レベル、値、寸法、長さ、位置、大きさ、又は量の範囲に対して30%まで、好ましくは20%まで、より好ましくは10%まで変化する配列を指すために本明細書で用いられる。

【0049】

「増幅産物」は核酸増幅技術により形成される核酸産物を指す。

【0050】

「抗原結合分子」は標的抗原に対して結合親和性を有する分子を意味する。この用語は、免疫グロブリン、免疫グロブリン断片及び抗原結合活性を示すタンパク質枠組みに由来する非免疫グロブリンに及ぶことが理解されよう。

【0051】

本明細書で用いられるとき、「特異的に結合する」等という用語は、本発明のポリペプチド又はポリペプチド断片に結合するが相同な先行技術のポリペプチドに有意に結合しない抗原結合分子を指す。

【0052】

「生物活性のある断片」又は「生物活性断片」は全長の親ポリペプチドの断片であって、親ポリペプチドの活性を保持するものを意味する。従って、生物活性のある断片はスクロースをイソマルチュロースに変換するスクロース・イソメラーゼ活性を含む。本明細書で用いられるとき、「生物活性のある断片」という用語は、例えば、上記の活性を含む、少なくとも8、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも20、更により好ましくは少なくとも30の連続アミノ酸の欠失変異型及び小ペプチドを含む。この型のペプチドは標準的な組換え核酸技術の適用を通して得られうる又は従来液相若しくは固相の合成技術を用いて合成されうる。例えば、ニコルソンにより編集されブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズにより出版された「合成ワクチン」という表題の刊行物に含まれるアゼルトンとシェパードによる「ペプチド合成」という表題の9章に記載される溶液合成又は固相合成が参照されうる。または、ペプチドは、エンドLys-C、エンドArg-C、エンドGlu-C及びスタフィロコッカスのV8-プロテアーゼなどのプロテイナーゼなどのプロテイナーゼを用いた本発明のポリペプチドの消化により生じ得る。該消化断片は例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)技術により精製され得る。

10

20

【0053】

本明細書を通して、文脈が他の意味を要しない限り、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」及び「含む(comprising)」という単語は、明記した工程若しくは要素又は工程若しくは要素の群の包含を意味するが、任意の他の工程若しくは要素又は工程若しくは要素の群の排除を意味するわけではないと理解されるであろう。

【0054】

「~に対応する(corresponds to)」又は「~に対応する(corresponding to)」とは、(a)参照ポリヌクレオチド配列の全て若しくは一部に対して実質的に同一な若しくは相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド又は(b)ペプチド若しくはタンパク質のアミノ酸配列に対して同一なアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを意味する。この語句は参照のペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列に対して実質的に同一なアミノ酸配列を有するペプチド又はポリペプチドもその語句の範囲内に含む。

30

40

【0055】

「誘導体」とは、修飾により、例えば当分野で理解されるように他の化学部分と結合する若しくは錯体形成することにより又は翻訳後修飾技術により、該基本の配列から誘導されたポリペプチドを意味する。「誘導体」という用語は、機能的に等価な分子を生ずる付加又は欠失などの親配列に対して為された改変もその語句の範囲内に含む。従って、誘導体という用語はスクロース・イソメラーゼ活性を有する分子を包含する。

「相同性」とは、以下の表Bに定義される同一な又は同類置換を構成するアミノ酸の百分率数を指す。相同性はGAPなどの配列比較プログラムを用いて決定されうる(デベラウクスら、1984、Nucleic Acids Research 12、387-395)。この方法において、本明細書で引用されるものと類似の長さの又は実質的に異なる長さの配列が該整列内への空所の挿入により比較されうる。このような空所は、例えば、GAPにより用いられる比較アルゴリズムにより決定される。

【0056】

50

「ハイブリダイゼーション」は、DNA - DNAハイブリッド又はDNA - RNAハイブリッドを生じる相補的なヌクレオチド配列の対合を示すために本明細書で用いられる。相補的な塩基配列とは塩基対合の規則により関係付けられる配列である。DNAでは、AはTと対合し、CはGと対合する。RNAでは、UはAと対合し、CはGと対合する。この点において、本明細書で用いられる「適合」及び「不適合」という用語は相補的な核酸鎖における対になった2本のヌクレオチドのハイブリダイズする能力を指す。上述したように古典的なA - T塩基対及びG - C塩基対などの適合したヌクレオチドは効率的にハイブリダイズする。不適合は効率的にハイブリダイズしないヌクレオチドの他の組み合わせである。

【0057】

「免疫相互作用する」についての本明細書での言及は、とりわけ分子又は擬似体の一つが免疫系の構成要素である場合、分子間のあらゆる相互作用、反応、又は他の形態の会合についての言及を含む。

【0058】

「免疫相互作用する断片」は配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10のいずれか一つに記載されたポリペプチドの断片であって、該ポリペプチド又はその変異型若しくは誘導体に特異的に結合する要素の生産を含む免疫応答を誘発するものを意味する。本明細書で用いられるとき、「免疫相互作用する断片」という用語は、抗原決定基又はエピトープを含む、例えば、少なくとも6、好ましくは少なくとも8、より好ましくは少なくとも20の連続アミノ酸の欠失変異型及び小ペプチドを含む。このような幾つかの断片は互いに連結しうる。

【0059】

「単離された」とは、その天然状態において通常付随する成分を実質的に又は本質的に含まない物質を意味する。例えば、本明細書で用いられるとき、「単離されたポリヌクレオチド」は、天然で生じる状態において隣接する配列から精製されたポリヌクレオチド、例えば、通常その断片に隣接する配列から切り離されたDNA断片を指す。

【0060】

「マーカー遺伝子」とは、そのマーカー遺伝子を発現する細胞に異なる表現型を与え、それによりこのマーカーを有さない細胞からこのような形質転換細胞を識別させる遺伝子を意味する。選択可能なマーカー遺伝子は、選択物質（例えば、除草剤、抗生物質、照射、加熱、又は非形質転換細胞を損なう他の処理）に対する耐性に基いて「選択」できる特性を与える。スクリーニング可能なマーカー遺伝子（又はレポーター遺伝子）は観察又は試験を通して、即ち「スクリーニング」により同定できる特性（例えば、 α -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、又は形質転換されていない細胞に存在しない他の酵素活性）を与える。

【0061】

「～から得られる」とは、例えば核酸抽出物又はポリペプチド抽出物などの試料が特定の起源から単離され又は由来することを意味する。例えば、該抽出物は、スクロースを代謝するあらゆる生物から、好ましくはスクロースを代謝する微生物から、より好ましくはアグロバクテリウム (*Agrobacterium*)、エンテロバクター (*Enterobacter*)、エルウィニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、ロイコノストック (*Leuconostoc*)、プロタミノバクター (*Protaminobacter*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 及びセラチア (*Serratia*) の属の微生物から、又はスクロースをイソマルチュロースに変換できる生物が例えば本明細書に記載される選択上の利点を有する場所から得られる微生物から、直接単離されうる。

【0062】

本明細書で用いられる「オリゴヌクレオチド」という用語はホスホジエステル結合（又は同類の構造上の変異型又はその合成類似体）を介して連結した多数のヌクレオチド単位（デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド、又は構造の関連する変異型、又はその

10

20

30

40

50

合成類似体)から構成される重合体を指す。従って、「オリゴヌクレオチド」という用語は通常該ヌクレオチド及び該ヌクレオチド間の連結が自然に生じるヌクレオチド重合体を指す一方で、該用語はペプチド核酸(PNA)、ホスホルアミデート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、2-O-メチルリボ核酸等(これらに限定されない)を含む種々の類似体もその用語の範囲内に含むことが理解されよう。該分子の正確な大きさは具体的な適用に応じて変化しうる。オリゴヌクレオチドは通常長さがかかなり短く一般的に約10から30のヌクレオチドであるが、該用語は任意の長さの分子を指し得る。しかし、「ポリヌクレオチド」又は「核酸」という用語は通常大きなオリゴヌクレオチドのために用いられる。

【0063】

「機能的に連結される」とは、転写及び翻訳の調節核酸が、該ポリヌクレオチドが転写されそして任意選択的に該ポリペプチドが翻訳されるような様式で、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関して正しく配置されることを意味する。

10

【0064】

本明細書で用いられるとき、「植物」及び「分化した植物」とは、分化した植物細胞型、組織及び/又は器官の系を含む全植物体又は植物の一部を指す。苗木及び種子もこの用語の意味内に含まれる。本発明に含まれる植物は形質転換技術で扱いやすい任意の植物であり、被子植物、裸子植物、単子葉植物、及び双子葉植物を含む。

【0065】

本明細書で用いられる「植物細胞」という用語は、植物に由来するプロトプラスト又は他の細胞、配偶子を生産する細胞、及び全植物体に再生する細胞を指す。植物細胞は植物の細胞並びにプロトプラスト又は他の培養細胞を含む。

20

【0066】

「植物組織」は、根、苗条、花粉、種子、クラウンゴールなどの腫瘍組織、並びに胚及びカルスなどの培養植物細胞の集合体の種々の形態に由来する分化及び未分化の組織を意味する。

【0067】

「構成的プロモーター」は多くの又は全ての植物組織における機能しうるように連結した転写可能な配列の発現を指令するプロモーターを指す。

【0068】

「幹に特異的なプロモーター」は、植物の葉、根又は他の組織における発現と比較して、植物の茎又は幹の組織で機能しうるように連結した転写可能な配列の発現を優先的に指令するプロモーターを意味する。

30

【0069】

本明細書で用いられる「ポリヌクレオチド」又は「核酸」という用語はmRNA、RNA、cRNA、cDNA又はDNAを意味する。該用語は通常30ヌクレオチドより長いオリゴヌクレオチドを指す。

【0070】

「ポリヌクレオチド変異型」及び「変異型」という用語は、参照ポリヌクレオチド配列又は以下の明細書で定義される厳格性条件下で参照配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドと実質的な配列同一性を示すポリヌクレオチドを指す。これらの用語は、一つ以上のヌクレオチドが付加した又は欠失した又は異なるヌクレオチドと置換したポリヌクレオチドも包含する。この点において、参照ポリヌクレオチドに突然変異、付加、欠失及び置換を含むある種の改変を行なうことができ、それにより改変されたポリヌクレオチドが参照ポリヌクレオチドの生物学的機能又は活性を保持することは当分野でよく理解されている。「ポリヌクレオチド変異型」及び「変異型」という用語は天然で生じる対立遺伝子の変異型も含む。

40

【0071】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」はアミノ酸残基の重合体並びにそれの変異型及び合成類似体を指すために本明細書で交換可能に用いられる。従って、これら

50

の用語は、天然で生じるアミノ酸重合体に適用するだけでなく、対応する天然で生じるアミノ酸の化学類似体などの一つ以上のアミノ酸残基が天然には生じない合成アミノ酸であるアミノ酸重合体にも適用する。

【0072】

「ポリペプチド変異型」という用語は、一つ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換されたポリペプチドを指す。幾つかのアミノ酸が以下の明細書に記載するようにポリペプチドの活性の性質を変えなくほぼ同様の性質をもつ他のアミノ酸に変えられうること（同類置換）は当分野でよく理解されている。これらの用語は一つ以上のアミノ酸が付加され又は欠失され又は異なるアミノ酸と置換されたポリペプチドも包含する。従って、本明細書で用いられるポリペプチド変異型はスクロース・イソメラーゼ活性を有するポリペプチドを包含する。

10

【0073】

「プライマー」は、一本鎖DNAと対合すると、適切な重合剤の存在下でプライマー伸長産物の合成を開始できるオリゴヌクレオチドを意味する。このプライマーは増幅の最大効率には一本鎖であることが好ましいが代わりに二本鎖であってもよい。プライマーは重合剤の存在下で伸長産物の合成を始めるのに十分な長さを持たねばならない。該プライマーの長さは、適用、使用温度、鋳型反応条件、他の試薬、及びプライマーの起源を含む多数の因子に依存する。例えば、標的配列の複雑性に応じて、オリゴヌクレオチドのプライマーは通常15から35又はそれ以上のヌクレオチドを含むが、より少ないヌクレオチドをも含むうる。プライマーは約200ヌクレオチドから数千塩基又はそれ以上の大きなポリヌクレオチドであり得る。プライマーは、ハイブリダイズするよう設計され且つ合成開始のための部位として役立つ鋳型上の配列に対して「実質的に相補的」であるよう選択されうる。「実質的に相補的」とは、該プライマーが標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズする程に十分相補的であることを意味する。該プライマーはハイブリダイズするよう設計された鋳型との不適合を含まないことが好ましいが、これは必須ではない。例えば、非相補的ヌクレオチドがプライマーの5'末端に付着し、そのプライマー配列の残りが該鋳型に相補的でありうる。または、該プライマー配列が鋳型の配列とハイブリダイズする程に鋳型の配列と十分な相補性を有しそれによりプライマーの伸長産物の合成用の鋳型を形成するという条件の下では、非相補的ヌクレオチド又は一続きの非相補的ヌクレオチドをプライマー内に散在させることができる。

20

30

【0074】

「プローブ」は別の分子の特異的な配列又は部分配列又は他部分に結合する分子を指す。特に断らない限り、通常、「プローブ」という用語は、相補的な塩基対合を介してしばしば「標的核酸」と呼ばれる別の核酸に結合するポリヌクレオチドのプローブを指す。プローブは、ハイブリダイゼーション条件の厳格性に応じて、該プローブとの完全な配列相補性を欠く標的核酸と結合しうる。プローブは直接的に又は間接的に標識できる。

【0075】

本明細書で用いられる「組換えポリヌクレオチド」という用語は、核酸の操作によりインビトロで、通常自然界に見出されない形に形成されたポリヌクレオチドを指す。例えば、該組換えポリヌクレオチドは発現ベクターの形で存在しうる。一般的に、このような発現ベクターは該ヌクレオチド配列と機能しうるように連結された転写及び翻訳の調節核酸を含む。

40

【0076】

「組換えポリペプチド」は、組換え技術を用いて、即ち組換えポリヌクレオチドの発現を通して作製されたポリペプチドを意味する。

【0077】

植物材料に関して本明細書で用いられる「再生」という用語は、植物細胞、植物細胞の群、植物の一部（種子を含む）、又は植物片から（例えば、プロトプラスト、カルス、若しくは組織部分から）分化した全植物体を生長させることを意味する。

【0078】

50

本明細書で用いられる「レポーター分子」は、その化学性性質により、抗原結合分子及びその標的抗原から成る複合体を検出させる分析により同定可能なシグナルを提供する分子を意味する。「レポーター分子」という用語は、細胞凝集又はラテックスビーズ上の赤血球細胞等などの凝集阻害の使用にも及ぶ。

【0079】

二つ以上のポリヌクレオチド又はポリペプチドの間の配列関係を記載するために用いられる用語には、「参照配列」、「比較窓」、「配列同一性」、「配列同一性の百分率」及び「実質的な同一性」が含まれる。「参照配列」はその長さが少なくとも12であるが、度々15から18であり、しばしば少なくとも25のヌクレオチド及びアミノ酸残基を含む単量体単位である。二つのポリヌクレオチドはそれぞれ(1)二つのポリヌクレオチド間で同類の配列(即ち、完全なポリヌクレオチド配列の一部のみ)及び(2)二つのポリヌクレオチド間で相違する配列を含みうるので、二つ(又はそれ以上)のポリヌクレオチドの間の配列比較は通常「比較窓」の上の二つのポリヌクレオチドの配列を比較し、局部領域の配列類似性を同定し比較することにより実施する。「比較窓」は、二つの配列が最適に整列された後に配列が連続する位置の同数の参照配列と比較される少なくとも6つの連続する位置、一般的に約50から約100、より一般的には約100から約150の概念上の分節を指す。該比較窓は二つの配列の最適な整列について参照配列(付加又は欠失を含まない)と比較して約20%未満の付加又は欠失(即ち空白)を含みうる。比較窓を整列させるための配列の最適整列は、アルゴリズム(米国ウィスコンシン州サイエンス・ドライブ・マディソン575のジェネティクス・コンピュータ・グループ社のウィスコンシン・ジェネティクス・ソフトウェア・パッケージ・リリース7.0におけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)のコンピュータによる実行により又は調査及び選択される任意の種々の方法により作成される最良の整列(即ち、該比較窓にわたる最高百分率の相同性をもたらす)により行われうる。例えば、アルチュルら、1997、Nucl. Acids Res. 25:3389により開示されるプログラムのBLASTファミリーも参照されうる。配列分析の詳細な論議は、オーズベルらの19.3単元、「分子生物学の最新プロトコル」、ジョン・ウイレイ&ソنز社、1994~1998、15章に見出され得る。

10

20

【0080】

本明細書で用いられる「配列同一性」という用語は、配列がヌクレオチドごとに又はアミノ酸ごとに比較窓の上で同一である程度を指す。従って、「配列同一性の百分率」は、比較窓の上で二つの最適に整列した配列を比較し、適合位置の数を得るために同一な核酸塩基(例えば、A、T、C、G、I)又は同一なアミノ酸残基(例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys及びMet)が両配列に存在する位置の数を決定し、この適合位置の数を比較窓の位置の総数(即ち、窓の大きさ)で割り、その結果に100を乗じて配列同一性の百分率を得ることにより計算される。本発明の目的上、「配列同一性」は、該ソフトウェアに添付される参照マニュアルで用いられる標準的なデフォルトを用いたDNASISコンピュータプログラム(ウィンドウズ(登録商標)用2.5版、米国カリフォルニア州南サンフランシスコのヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング社から入手できる)により計算された「適合百分率」を意味すると理解される。

30

40

【0081】

本明細書で用いられる「厳格性(stringency)」は、ハイブリダイゼーション及び洗浄の手順中の温度及びイオン強度の条件、並びにある種の有機溶媒の存在又は不存在を指す。厳格性が高くなるほど、固定化された標的ヌクレオチド配列と洗浄後に該標的に依然ハイブリダイズしている標識化プローブポリヌクレオチド配列との相補性の程度がより高くなる。

【0082】

「厳格性条件(stringent conditions)」は温度及びイオンの条件

50

を指し、その条件下では高頻度の相補的塩基を有するヌクレオチド配列のみがハイブリダイズする。要求される厳格性は、ヌクレオチド配列依存性であり、ハイブリダイゼーション及びその後の洗浄の間に存在する種々の構成要素並びにこれらの工程にかかる時間に依存する。一般的に、ハイブリダイゼーション速度を最大限にするため、厳格性の緩いハイブリダイゼーション条件が選択され、熱融解点 (T_m) より約 20 から 25 低い。該 T_m は特定の標的配列の 50% が定められたイオン強度及び pH の溶液中において完全に相補的なプローブとハイブリダイズする温度である。一般的に、ハイブリダイズした配列が少なくとも約 85% のヌクレオチド相補性を持つことを要求するためには、極めて厳格な洗浄条件が該 T_m より約 5 から 15 低いように選択される。ハイブリダイズした配列が少なくとも約 70% のヌクレオチド相補性を持つことを要求するためには、中程度に厳格な洗浄条件が該 T_m より約 15 から 30 低いように選択される。極めて寛容な (低度の厳格性) 洗浄条件は該 T_m を 50 も下回り、ハイブリダイズする配列間で高レベルの不適合を容認しうる。当業者は、ハイブリダイゼーション及び洗浄の段階における他の物理的及び化学的なパラメータも、標的とプローブ配列との特定レベルの相同性から検出可能なハイブリダイゼーションシグナルの結果に影響を及ぼすよう変更され得ることを認識している。厳格性条件の他の例は 3.3 節に記載する。

10

【0083】

「形質転換」という用語は、外来の又は内因性の核酸の導入により、例えば細菌又は植物などの生物の遺伝子型の改変を意味する。

【0084】

「トランスジェノト (transgenote)」とは形質転換プロセスの直接の産物を意味する。

20

【0085】

「ベクター」は、例えば、プラスミド、バクテリオファージ又は植物ウイルスに由来する核酸分子、好ましくは DNA 分子を意味し、その中に核酸配列が挿入又はクローニングされうる。ベクターは、一つ以上の固有の制限部位を含むことが好ましく、標的の細胞若しくは組織若しくは先駆細胞若しくはその組織を含む確定した宿主細胞において自律複製できうる又はクローニングされた配列が複製できるよう確定した宿主のゲノムに組込まれうる。従って、ベクターは自律的に複製するベクター、即ち染色体外の実体として存在するベクターであり、その複製は染色体の複製から独立しており、例えば、直鎖状又は閉環したプラスミド、染色体外要素、ミニ染色体、又は人工染色体でありうる。ベクターは自己複製を確実にするためのあらゆる手段を含みうる。または、ベクターは、細胞内に導入される場合、受容細胞のゲノム内に組込まれ、組込まれた染色体とともに複製されるものでありうる。ベクター系は、宿主細胞のゲノム内に導入されるべき全 DNA をともに含む単独のベクター又はプラスミド、二つ以上のベクター又はプラスミド、又はトランスポゾンを含む。ベクターの選択は通常ベクターとベクターが導入されるべき細胞との適合性に依存する。ベクターは適切な形質転換体の選別に用いられ得る抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーも含みうる。このような耐性遺伝子の例は当業者に周知である。

30

【0086】

2 単離されたポリペプチド、生物活性のある断片、ポリペプチドの変異型及び誘導体
2.1 本発明のポリペプチド

40

本発明はエルウィニア・ラポンティキ (登録番号 W A C 2 9 2 8) から得られたスクロース・イソメラーゼの全長配列及び 6 8 J と呼ばれる単離細菌から得られた新規なスクロース・イソメラーゼの全長配列の決定に一部基づいている。

【0087】

エルウィニア・ラポンティキのスクロース・イソメラーゼの全長アミノ酸配列は、632 残基に及び、マッテスら (前出) により開示された配列と比べカルボキシル末端配列 (配列番号: 26 に示される) の 197 個の余分の残基を含む。E. ラポンティキのポリペプチドは、配列番号: 2 の残基 1 から約 36 までに及ぶ配列番号: 6 に示されるリーダーペプチド又はシグナルペプチドを含む。該シグナルペプチドは特定の細胞区画における (例

50

例えば、外膜における、内膜における、又は外膜と内膜の間の周辺腔における)成熟ポリペプチドの正確な局在化にのみ必要である。配列番号：4で示される成熟ポリペプチドは約残基37から残基632までに及ぶ。従って、一実施態様において、本発明は配列番号：2の単離された前駆ポリペプチドを提供する。配列番号：2は配列番号：4のポリペプチドと枠を揃えて融合した配列番号：6のリーダーペプチドを含む。別の一実施態様において、本発明は配列番号：4に示される配列を含む単離された成熟ポリペプチドを提供する。

【0088】

68Jのスクロース・イソメラーゼの全長アミノ酸配列は、配列番号：8に示される598残基に及び、配列番号：12に示され且つ配列番号：8の残基1から約33に及びシグナルペプチドを含む。配列番号：10に示される成熟ポリペプチドは配列番号：8の約残基34から残基598までに及ぶ。従って、一実施態様において、本発明は配列番号：8の単離された前駆ポリペプチドを特徴とする。配列番号：8は配列番号：10のポリペプチドと枠を揃えて融合した配列番号：12のリーダーペプチドを含む。他の実施態様において、本発明は配列番号：10に示される配列を含む単離された成熟ポリペプチドを意図する。

【0089】

2.2 生物活性のある断片

生物活性のある断片は当分野で知られる任意の適切な手順に従って生産されうる。例えば、一つの適切な方法はまず該ポリペプチドの断片を生産した後適切な生物活性について該断片を試験する工程を含みうる。一実施態様において、該断片はスクロース・イソメラーゼ活性について試験されうる。スクロース・イソメラーゼ活性を検出し又は好ましくは測定する任意の検定法が本発明により意図される。スクロース・イソメラーゼ活性は本明細書に記載するアニリン/ジフェニルアミン検定及びキャピラリー電気泳動により測定されることが好ましい。

【0090】

別の一実施態様において、該断片の生物活性は、ポリペプチドの断片がそれから翻訳され得るポリヌクレオチドを細胞内に導入し、該断片が生物活性のある断片であることを示すスクロース・イソメラーゼ活性を検出することにより試験される。

【0091】

本発明は、少なくとも6、好ましくは少なくとも8のアミノ酸長の上記ポリペプチドの生物断片も意図する。これは本発明のスクロース・イソメラーゼ酵素と免疫相互作用する抗体を生産するため動物で免疫応答を誘発できる。例えば、長さが8残基の免疫応答を誘発しうる典型的なポリペプチド断片には、配列番号：2の1~8、9~16、17~24、25~32、33~40、41~48、49~56、57~64、65~72、73~80、81~88、89~96、97~104、105~112、113~120、121~128、129~136、137~144、145~152、153~160、161~168、169~176、177~184、185~192、193~200、201~208、209~216、217~224、225~232、233~240、241~248、249~256、257~264、265~272、273~280、281~288、289~296、297~304、305~312、313~320、321~328、329~336、337~344、345~352、353~360、361~368、369~376、377~384、385~392、393~400、401~408、409~416、417~424、425~432、433~440、441~448、449~456、457~464、465~472、473~480、481~488、489~496、497~504、505~512、513~520、521~528、529~536、537~544、545~552、553~560、561~568、569~576、577~584、585~592及び589~596の残基、又は配列番号：4の1~8、9~16、17~24、25~32、33~40、41~48、49~56、57~64、65~72、73~80、81~88、89~96、9

10

20

30

40

50

7 ~ 104、105 ~ 112、113 ~ 120、121 ~ 128、129 ~ 136、137 ~ 144、145 ~ 152、153 ~ 160、161 ~ 168、169 ~ 176、177 ~ 184、185 ~ 192、193 ~ 200、201 ~ 208、209 ~ 216、217 ~ 224、225 ~ 232、233 ~ 240、241 ~ 248、249 ~ 256、257 ~ 264、265 ~ 272、273 ~ 280、281 ~ 288、289 ~ 296、297 ~ 304、305 ~ 312、313 ~ 320、321 ~ 328、329 ~ 336、337 ~ 344、345 ~ 352、353 ~ 360、361 ~ 368、369 ~ 376、377 ~ 384、385 ~ 392、393 ~ 400、401 ~ 408、409 ~ 416、417 ~ 424、425 ~ 432、433 ~ 440、441 ~ 448、449 ~ 456、457 ~ 464、465 ~ 472、473 ~ 480、481 ~ 488、489 ~ 496、497 ~ 504、505 ~ 512、513 ~ 520、521 ~ 528、529 ~ 536、537 ~ 544、545 ~ 552、553 ~ 560、及び559 ~ 566の残基が含まれるが、これらに限定されない。この型の好ましい実施態様において、生物活性のある断片は配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23又は配列番号：24から選択される少なくとも一つのスクロース・イソメラーゼ共通配列を含む。

10

【0092】

2.3 ポリペプチド変異型

本発明は本発明のポリペプチドのスクロース・イソメラーゼ活性を有するポリペプチド変異型も意図する。ポリペプチド変異型を生産する適切な方法は、例えば、その配列が少なくとも一アミノ酸の置換、欠失及び/又は付加により親ポリペプチドから識別される改変されたポリペプチドを生産する工程であって、該親ポリペプチドが、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10又はそれらの生物活性のある断片のいずれか一つに記載される配列を含むものである工程を含む。次いで、該改変されたポリペプチドをスクロース・イソメラーゼ活性について試験し、該活性の存在が該改変されたポリペプチドが該変異型であることを示す。

20

【0093】

別の実施態様では、ポリペプチド変異型は、改変されたポリペプチドがそれから翻訳され得るポリヌクレオチドを細胞に導入する工程、及びその細胞と関連するスクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該改変されたポリペプチドが該変異型であることを示す工程により生産される。

30

【0094】

一般的に、変異型は、例えば、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10に示されるポリペプチド又はそれらの生物活性のある断片に対して少なくとも60%、より適切には少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の相同性を有するものである。変異型は、例えば、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10に示されるポリペプチド又はそれらの生物活性のある断片と、少なくとも60%、より適切には少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、更により好ましくは少なくとも95%の配列同一性を示すことが好ましい。この点において、比較の窓は該ポリペプチド又は該生物活性のある断片のおよそ全長にわたることが好ましい。

40

【0095】

適切な変異型は任意の適切なスクロースを代謝する生物から得られ得る。該変異型は例えば以下の3.3節に記載するスクロースを代謝する細菌から得られることが好ましい。

【0096】

2.4 ポリペプチド変異型を生産する方法

2.4.1 突然変異誘発

本発明のポリペプチド変異型は合理的に又は確立された突然変異誘発方法によってのいずれかで同定され得る(例えば、ワトソン、ジェイ・ディ・ら、「遺伝子の分子生物学」、

50

第四編、ベンジャミンノクミングス社、メンロ・パーク、カリフォルニア州、1987年を参照)。意味深いことに、無作為突然変異誘発の研究法は突然変異されるべき遺伝子配列についての先天的情報を必要としない。この研究法は特定の突然変異体の望ましさをその機能に基づいて評価するという利点を有するので、どのように又はなぜ得られた突然変異タンパク質が特定のコンフォメーションを採っているのかについての理解を必要としない。実際に、標的遺伝子配列の無作為突然変異は所望する特徴を有する突然変異タンパク質を得るために用いられる一つの研究法となっている(リーザーバロウ, アール., 1986, J. Prot. Eng. 1: 7-16; クノウルズ, ジェイ. アール., 1987, Science 236: 1252-1258; シャウ, ダブリュ. ブイ., 1987, Biochem. J. 246: 1-17; ゲリット, ジェイ. エイ., 1987, Chem. Rev. 87: 1079-1105)。または、特定の配列改変が望まれる場合、部位特異的突然変異誘発の方法が用いられ得る。従って、このような方法は重要であると考えられるタンパク質のアミノ酸のみを選択的に改変するために用いられうる(クライック, シイ. エス., 1985, Science 228: 291-297; クロニンら, 1988, Biochem. 27: 4572-4579; ウィルクスら, 1988, Science 242: 1541-1544)。

【0097】

突然変異誘発の合理的な若しくは確立された方法から得られる又は以下の明細書に記載するコンビナトリアル化学から得られる変異型のペプチド又はポリペプチドは、アミノ酸の同類置換を含みうる。本発明のポリペプチド又はポリペプチド断片における典型的な同類置換は下記の表にしたがって為されうる。

【0098】

【表B】

元の残基	典型的な置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser

【0099】

【表B-1】

元の残基	典型的な置換
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile,
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

10

20

30

40

50

【0100】

機能の実質的な変化は表Bに示されたものよりも保存的でない置換を選択することによりなされる。他の置換は非同類置換でありこれらの比較的少数が許容されうる。一般的に、ポリペプチドの性質に最大の変化を生じさせる可能性のある置換は、(a)親水性残基(例えば、Ser若しくはThr)が疎水性残基(例えば、Ala、Leu、Ile、Phe若しくはVal)と置換し、又は疎水性残基により置換される、(b)システイン若しくはプロリンが任意の他の残基と置換し、又は他の残基により置換される、(c)正に帯電した側鎖を有する残基(例えば、Arg、His若しくはLys)が負に帯電した残基(例えば、Glu若しくはAsp)と置換し、又は負に帯電した残基により置換される、又は(d)大きな側鎖を有する残基(例えば、Phe若しくはTrp)がより小さな側鎖を有するもの(例えば、Ala、Ser)若しくは側鎖がないもの(例えばGly)と置換し、又は置換されるというものである。

【0101】

適切な変異型を構成するものは従来技術により決定されうる。例えば、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10のポリペプチドをコードする核酸は、例えばトランスポゾン突然変異誘発を用いた無作為突然変異誘発、又は例えば以下の3.3節に記載する部位特異的突然変異誘発のいずれかを用いて突然変異させることができる。

【0102】

2.4.2 コンビナトリアル化学により作製されるペプチドライブラリー

幾つかの容易なコンビナトリアル技術は免疫多様性の分子ライブラリーを合成するために利用され得る。この場合では、ポリペプチドの変異型、又は好ましくは本発明のポリペプチド断片は、このような技術を用いて合成され得る。変異型は2.3節に記載する方法を用いて実質的にスクリーニングされ得る。

【0103】

好ましくは、溶液中の遊離ペプチドと作用する利点を与える可溶性の合成ペプチド・コンビナトリアル・ライブラリー (SPCL) が作製されるため、ペプチド濃度の調整により具体的な検定系に適應できる。SPCLは六量体として適切に調製される。この点において、大半の結合部位は4から6の残基を含むことが知られている。システインは該混合位置から排除されジスルフィド及びより定義しにくい重合体の形成を回避することが好ましい。SPCLを作製する典型的な方法はホフテンら (1991、Nature 354: 84-86; 1992、BioTechniques 13: 412-421)、アッペルら (1992、Immunomethods 1: 17-23)、及びピニラら (1992、BioTechniques 13: 901-905; 1993、Gene 128: 71-76) により開示される。 10

【0104】

コンビナトリアル合成ペプチドライブラリーの作製は、好ましくは二つの異なる研究法の一つを用いて (しかしこれに限らない)、t-ブチロキシカルボニル (t-Boc) 又は 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 化学 (コリガンら、前出の9.1章; ステヴァルトとヤング、1984、固相ペプチド合成、第二編、ピアス・ケミカル社、ロックフォード、III; 及びアゼルトンとシェパード、1989、固相ペプチド合成: 実践アプローチ、IRLプレス、オックスフォードを参照) のいずれかを利用しうる。相応しくも「分割-処理-再混合」又は「分割合成」の方法と呼ばれるこれらの研究法の第一は、まずフルカら (1988、14th Int. Congr. Biochem.、プラハ、チェコスロバキア 5: 47; 1991、Int. J. Pept. Protein Res. 37: 487-493) 及びラムら (1991、Nature 354: 82-84) により記載され、そしてアイチラーら (1995、Medicinal Research Reviews 15(6): 481-496) 及びバルケンホッフら (1996、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 2288-2337) により後に概説された。簡単に述べれば、該分割合成方法は重合体ビーズなどの複数の固体支持体を合成の各段階で利用できるアミノ酸数 (例えば20個のL-アミノ酸) を表すn個の等画分に分割する工程、単独のそれぞれのアミノ酸を対応する画分の個々の重合体ビーズに連結する工程、そしてその後全画分の重合体ビーズを一緒にして完全に混合する工程を含む。この工程は合計xサイクル反復しN^x個までの異なる化合物の確率論的集合を生じる。このように作製されたペプチドライブラリーはスクロース・イソメラーゼ活性についてスクリーニングされうる。検出時に、陽性ビーズの一部を配列決定のために選択し、活性なペプチドを同定する。このようなペプチドは続いて該ビーズから切断され上記のように検定されうる。 20 30

【0105】

第二の研究法である化学比方法は、各カップリング工程で個々のアミノ酸の等モルが組み込まれると実験により確定された特定のアミノ酸比を用いて、混合したペプチド樹脂を調製する。それぞれの樹脂ビーズはペプチドの混合物を含む。ほぼ等モルの表示はアミノ酸分析により確認され得る (ドーレイとホフテン、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10811-10815、アイチラーとホフテン、1993、Biochemistry 32: 11035-11041)。合成ペプチドライブラリーは、例えばゲイセンら (1986、Mol. Immunol. 23: 709-715) により開示されたように、固体支持体としてのポリエチレンの棒又はピン上で作製されることが好ましい。この型の典型的なペプチドライブラリーは、第三番目及び第四番目の位置が天然及び非天然のアミノ酸から選択された確定したアミノ酸を表し且つ残る六つの位置が任意抽出されたアミノ酸の混合物を表すオクタペプチドから構成されうる。このペプチドライブラリーは式 $Ac - XXO_1O_2XXX - S_s$ [配列番号: 37] により表され得る。該式中、 S_s は固体支持体である。ペプチド混合物は検定目的のために該ピン上に残存させる。例えば、ペプチドライブラリーはまずスクロースをイソマルチュロースに変換する能力についてスクリーニングされ得る。次に、最も活性なペプチド 40 50

を選択し、開始ペプチドに付加残基を連結する（又は本来の開始ペプチドの構成要素を内部修飾することによる）工程、及び次いでスクロース・イソメラーゼ活性についてのこの一式の候補をスクリーニングする工程を含むさらなる一巡の試験を行なう。この工程は所望のスクロース・イソメラーゼ活性をもつペプチドが同定されるまで繰り返される。一度同定されると、該固相支持体に付着したペプチドの同定がペプチド配列決定により決定されう。

【0106】

2.4.3 アラニン走査突然変異誘発

一実施態様において、本発明は、本発明のポリペプチド又はポリペプチド断片の系統的解析を利用してスクロースからイソマルチュロースへの触媒作用に関わるポリペプチド又は断片の残基を決定する。このような解析は便宜的に組換えDNA技術を用いて実施される。一般的に、該ポリペプチド又は断片をコードするDNA配列は、便利のよい宿主で発現されうるようにクローニングされ操作されう。該ポリペプチド又は断片をコードするDNAは、該ポリペプチド若しくは断片を発現する細胞の、ゲノムライブラリーから、mRNA由来のcDNAから、又は該DNA配列を合成で構築することにより得られ得る（サムブルックら、前出、オズベルら、前出）。

【0107】

該ポリペプチド又は断片をコードする野生型DNAを次に本明細書に記載する適切なプラスミド又はベクターに挿入する。具体的には、DNA配列をクローニングし発現させて該ポリペプチド又は断片の変異型を作製するためには、原核生物が好ましい。例えば、大腸菌K12株294（ATCC番号31446）、及び大腸菌B、大腸菌X1776（ATCC番号31537）、及び大腸菌のc600及びc600hf1、及び大腸菌W3110（F⁻、⁻、原栄養体、ATCC番号27325）、パチルス・ズブチリスなどのパチルス菌、及びサルモネラ・チフィウム又はセラチア・マルセセンスなどの他の腸内細菌科、及び種々のシュードモナスの種が用いられう。好ましい原核生物は大腸菌W3110（ATCC番号27325）である。

【0108】

該ポリペプチド又は断片が一度クローニングされると、例えばカーターら（1986、Nucleic Acids Res.、13:4331）又はゾレルら（1987、Nucleic Acids Res.、10:6487）により記載される部位特異的突然変異誘発、例えばウェルズら（1985、Gene、34:315）により記載されるカセット突然変異誘発、例えばウェルズら（1986、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A、317:415）により記載される制限選択（restriction selection）突然変異誘発、又は他の既知の技術が、クローニングされた該DNAに実施され、置換された残基により確定するアミノ酸配列の変化をコードする変異型DNAを生じう。適切な発現ベクターの調節ポリヌクレオチドに機能しうるように連結される場合、変異型のポリヌクレオチドが得られる。ある場合には、該変異型の回収は、該変異型をコードするDNA配列に機能しうるように連結された適切なシグナル配列の使用によって、発現宿主からこのような分子を発現させ、分泌させることにより促進されう。このような方法は当業者にはよく知られている。無論、所望するポリペプチド変異型のインビトロ化学合成（バラニーら、In The Peptides、イー・グロスとジェイ・マイエンホフター編（アカディミック・プレス：ニューヨーク、1979）、第二巻、3~254頁）などの他の方法がこのようなポリペプチド又は断片を作製するために利用されう。

【0109】

一度異なる変異型が作製されると、それらをスクロース又はスクロースを含有する基質と接触させ、あるとすればイソマルチュロースへの変換が、各変異型について測定される。これらのスクロース・イソメラーゼ活性を親ポリペプチド又は断片の活性と比較し、活性部位のアミノ酸残基のいずれがスクロース・イソメラーゼに關与するかを決定する。

。

10

20

30

40

50

【0110】

親及び変異型のスクロース・イソメラーゼ活性はそれぞれ例えば本明細書に記載する任意の簡便な検定により測定され得る。活性を比較するために幾つもの分析測定が用いられる一方で、酵素活性についての簡便なものは親ポリペプチド又は断片のミカエリス定数 K_m と比較した該変異型の K_m である。一般的に、その置換により置換された類似残基あたりの K_m の2倍の増加又は減少が、置換された残基(単数又は複数)が親ポリペプチド又は断片の該基質との相互作用において活性であることを示している。

【0111】

活性である可能性のある又は活性であることが既知のアミノ酸残基が走査アミノ酸 (s c a n n i n g a m i n o a c i d) 分析にかけられる場合、それらに隣接するアミノ酸残基は走査されるべきである。このような分析に用いられる走査アミノ酸は、置換されるものと異なる任意のアミノ酸、即ち、19個の他の天然に生じるアミノ酸のいずれかでありうる。残基が置換された3つのポリペプチドが作製され得る。一つは、可能性のある又は既知の活性なアミノ酸であるNの位置に走査アミノ酸、好ましくはアラニンを含む。他の二つはN+1及びN-1の位置に走査アミノ酸を含む。それぞれ置換されたポリペプチド又は断片が該基質の K_m に約2倍以上の効果をもたらす場合、走査アミノ酸はN+2及びN-2の位置で置換される。これは、それぞれの方向で K_m に約2倍未満の効果および少なくとも一つ、好ましくは四つの残基が同定されるまで、又は親ポリペプチド又は断片のいずれかの末端に到達するまで反復される。このようにして、連続するアミノ酸配列に沿って、スクロースからイソマルチュロースへの触媒に關与する一つ以上のアミノ酸が同定され得る。

【0112】

アミノ酸の走査により同定される活性なアミノ酸残基は通常スクロースに直接接触するものである。しかしながら、活性なアミノ酸は、他の残基又は H_2O などの小分子又は Na^+ 、 Ca^{+2} 、 Mg^{+2} 、又は Zn^{+2} などのイオン種と共に形成される塩橋を通して間接的にスクロースと接触することもありうる。

【0113】

ある場合には、一つ以上の残基における走査アミノ酸の置換が、そのスクロース・イソメラーゼ活性の分析を実施するために十分な量の単離をさせるレベルで発現しない残基置換ポリペプチドを生ずる。このような場合、異なる走査アミノ酸、好ましくは等配電子 (i s o s t e r i c) アミノ酸が用いられ得る。

【0114】

中でも好ましい走査アミノ酸は比較的小さい中性アミノ酸である。このようなアミノ酸にはアラニン、グリシン、セリン及びシステインが含まれる。アラニンは、ベータ-炭素を超える側鎖を持たず、この変異型の主鎖のコンフォメーションを変える可能性が小さいので、この群の中でも好ましい走査アミノ酸である。アラニンは、最も一般的なアミノ酸でもあるので、好ましい。さらに、アラニンは埋没位置及び露出位置の両方で頻繁に見出される (クレイトン, *The Proteins*, ダブリュ・エイチ・フリーマン&社, ニューヨーク、コチア, 1976, *J. Mol. Biol.*, 150:1)。アラニンの置換が適切な量の変異型を生じない場合、等配電子アミノ酸が用いられ得る。代わりに、下記のアミノ酸が優先順位の大きい方から順に用いられうる。即ち、Ser、Asn、及びLeuである。

【0115】

一度活性なアミノ酸残基が同定されると、等配電子アミノ酸を置換しうる。このような等配電子置換は、全事例で行なう必要はなく、活性なアミノ酸が同定される前に実施されうる。このような等配電子アミノ酸の置換は、一部の置換が惹起し得るコンフォメーションへの潜在的な破壊的効果を最小限にするために実施される。等配電子アミノ酸は下記の表に示される。

【0116】

【表C】

10

20

30

40

50

ポリペプチドアミノ酸	等配電子走査アミノ酸
Ala (A)	Ser, Gly
Glu (E)	Gln, Asp
Gln (Q)	Asn, Glu
Asp (D)	Asn, Glu
Asn (N)	Ala, Asp
Leu (L)	Met, Ile
Gly (G)	Pro, Ala
Lys (K)	Met, Arg
Ser (S)	Thr, Ala
Val (V)	Ile, Thr
Arg (R)	Lys, Met, Asn
Thr (T)	Ser, Val
Pro (P)	Gly
Ile (I)	Met, Leu, Val
Met (M)	Ile, Leu
Phe (F)	Tyr
Tyr (Y)	Phe
Cys (C)	Ser, Ala
Trp (W)	Phe

10

20

30

【 0 1 1 7 】

【 表 C - 1 】

ポリペプチドアミノ酸	等配電子走査アミノ酸
His (H)	Asn, Gln

40

【 0 1 1 8 】

本明細書の方法は本発明のポリペプチド又は断片の異なるドメイン内の活性化アミノ酸残基を検出するために使用できる。一度この同定がなされれば、親ポリペプチド又は断片とその基質の間の相互作用を改変するために親ポリペプチド又は断片への種々の修飾がなされうる。

【 0 1 1 9 】

50

2.4.4 ファージ・ディスプレイにより作製されたポリペプチド又はペプチドのライブラリー

変異型の同定は、例えばロウマンら (1991, *Biochem.* 30: 10832-10838)、マークランドら (1991, *Gene* 109: 13-19)、ロバーツら (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89: 2429-2433)、スミス, ジイ. ピイ. (1985, *Science* 228: 1315-1317)、スミスら (1990, *Science* 248: 1126-1128) 及びロードナーら (米国特許第5, 223, 409号) により記載されたファージ (又はファージミド) ディスプレイ・タンパク質リガンドスクリーニング系の使用により促進できる。一般的に、この方法は所望のタンパク質リガンドがウイルスコートタンパク質 (M13 遺伝子 I I I コートタンパク質、又はラムダコートタンパク質など) の N 末端と融合した融合タンパク質を発現させる工程を含む。

10

【0120】

一実施態様において、ファージのライブラリーはファージコートタンパク質配列内で新規なペプチドを示すよう設計される。新規なペプチド配列は、変異性 (*error-prone*) PCR を用いて又は大腸菌の突然変異誘発細胞によるインビボ突然変異により本発明のポリペプチド又は生物活性のある断片をコードする遺伝子断片の無作為突然変異誘発により形成される。ファージの表面上に示される新規なペプチドはスクロース又はスクロースを含む基質と接触する。スクロースをイソマルチュロースに異性化できるペプチドを有するコートタンパク質を示すファージが次に選択される。選択されたファージは増幅でき、それらのコートタンパク質をコードする DNA を配列決定できる。このようにして、組込まれたペプチド又はポリペプチドのアミノ酸配列が推定され得る。

20

【0121】

より詳細には、この方法は、(a) 本発明のポリペプチド又は断片をコードする第一遺伝子、天然又は野生型のファージのコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第二遺伝子 (第一遺伝子及び第二遺伝子は異種である)、及び第一遺伝子及び第二遺伝子と機能しうるように連結した転写調節要素を含む複製可能な発現ベクターを構築し、それにより融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を形成する工程、(b) 第一遺伝子内にある一つ以上の選択された位置でベクターを突然変異させ、それにより関連プラスミドのファミリーを形成する工程、(c) 適切な宿主細胞を該プラスミドで形質転換する工程、(d) 形質転換した宿主細胞を該ファージコートタンパク質をコードする遺伝子を有するヘルパーファージで感染させる工程、(e) 該プラスミドの少なくとも一部を含み且つ該宿主を形質転換できる組換えファージミド粒子を形成するのに適した条件下で、且つ少量に過ぎないファージミド粒子が該粒子の表面上に二つ以上の融合タンパク質のコピーを示すように調節された条件下で、形質転換され感染された宿主細胞を培養する工程、(f) 該ファージミド粒子をスクロース又はスクロースを含む基質と接触させる工程、並びに (g) スクロースをイソマルチュロースに異性化するファージミド粒子を異性化しないものから分離する工程を含む。この方法は、スクロースをイソマルチュロースに異性化する組換えファージミド粒子で適切な宿主細胞を形質転換する工程及び工程 (d) から (g) までを一回以上反復する工程をさらに含むことが好ましい。

30

40

【0122】

この方法において、該プラスミドは転写調節要素の厳しい制御下にあり、培養条件は該粒子の表面上に二つ以上の融合タンパク質のコピーを示すファージミド粒子の量又は数が約 20% 未満となるよう調節されることが好ましい。該融合タンパク質の二つ以上のコピーを示すファージミド粒子の数は、融合タンパク質の 1 個のコピーを示すファージミド粒子数の 10% 未満であることがより好ましい。該数が 1% 未満であることが最も好ましい。

【0123】

通常この方法において、該発現ベクターは該ポリペプチドの各サブユニットをコードする DNA と融合した分泌シグナル配列をさらに含み、転写調節要素はプロモーター系である。好ましいプロモーター系は、*lacZ*、*p_L*、*tac*、T7 ポリメラーゼ、トリプト

50

ファン、及びアルカリ性ホスファターゼのプロモーター並びにそれらの組み合わせから選択される。通常、該方法は、M13K07、M13R408、M13-VCS、及びファイX174から選択されるヘルパーファージも用いる。好ましいヘルパーファージはM13K07であり、好ましいコートタンパク質はM13ファージ遺伝子IIIコートタンパク質である。好ましい宿主は大腸菌及び大腸菌のプロテアーゼ欠損株である。

【0124】

変異型選択の反復サイクルは、複数回の選択反復によって選択される複数のアミノ酸変化のファージミド選択によるより高い親和性結合について選択するために用いられる。該リガンド・ポリペプチドにおけるアミノ酸の第一領域又は第一選択を含む第一ラウンドのファージミド選択の後、該リガンド・ポリペプチドの他の領域又はアミノ酸のファージミド選択のさらなるラウンドが行われる。ファージミド選択のこのサイクルはポリペプチドの所望する親和性に到達するまで繰り返される。

10

【0125】

該ポリペプチド又は断片の活性部位を形成するアミノ酸残基は連続的に連結されているわけではなく、該ポリペプチド又は断片の異なるサブユニット上に存在することもあることが理解されよう。即ち、該結合ドメインは一次構造ではなく該活性部位で特定の二次構造と一致する。従って、一般的に、突然変異は、活性部位がスクロース又はスクロースを含有する基質と相互作用する能力を持つように、該ポリペプチドの内部から離れて特定された該活性部位における特定の二次構造内のアミノ酸をコードするコドン内に導入される。

【0126】

本明細書のファージミド・ディスプレイ方法は、融合タンパク質が転写中に形成されるように該ポリペプチド又は断片をコードするポリヌクレオチド（ポリヌクレオチド1）を第二ポリヌクレオチド（ポリヌクレオチド2）に融合することを意図する。ポリヌクレオチド2は通常ファージのコートタンパク質遺伝子であり、好ましくはファージM13遺伝子IIIコートタンパク質又はその断片である。ポリヌクレオチド1及びポリヌクレオチド2の融合は、ポリヌクレオチド1を含むプラスミド上の特定部位にポリヌクレオチド2を挿入することにより、又はポリヌクレオチド2を含むプラスミド上の特定部位にポリヌクレオチド1を挿入することにより達成されうる。

20

【0127】

ポリヌクレオチド1及びポリヌクレオチド2の間に終結コドン（アンバー）、UAG（オークル）、及びUGA（オペル）である（例えば、ディビスら、*Microbiology*（ハルパーとロウ：ニューヨーク、1980）、237、245～247、及び274頁を参照）。野生型の宿主細胞で発現する終結コドンはポリヌクレオチド2タンパク質が付着していないポリヌクレオチド1タンパク質産物の合成をもたらす。しかしながら、抑制宿主細胞中での増殖は検出可能な量の融合タンパク質の合成をもたらす。このような抑制宿主細胞は該mRNAの終結コドン位置に一つのアミノ酸を挿入するよう改変されたtRNAを含み、それにより、検出可能な量の融合タンパク質の生産を生ずる。JM101又はXL1-Blue等の大腸菌の抑制株など、この型の抑制宿主細胞は周知であり記載されている（ブルロックら、1987、*BioTechniques*、5：376-379）。融合ポリペプチドをコードするmRNA中にこのような終結コドンを配置するためには、許容される任意の方法が用いられうる。

30

40

【0128】

該ポリペプチド又は断片をコードするポリヌクレオチドとファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第二ポリヌクレオチドとの間に抑制可能なコドンが挿入されうる。または、該抑制可能な終結コドンは、該ポリペプチド/断片の最後のアミノ酸トリプレットを置換するか又は該ファージコートタンパク質の最初のアミノ酸を置換することにより、該融合部位に隣接して挿入されうる。抑制可能なコドンを含むファージミドを抑制宿主細胞中で増殖させると、該ポリペプチド又は断片及びコートタンパク質を含む融合ポリペプチドが検出可能な程に生産される。該ファージミドを非抑制宿主細胞中で増殖させ

50

ると、該ポリペプチド又は断片はUAG、UAA又はUGAをコードする挿入された抑制可能なトリプレットで終結することにより実質的に該ファージコートタンパク質と融合することなく合成される。非抑制細胞においては、該ポリペプチドは合成されそして他の方法で該宿主細胞に固定させる融合ファージコートタンパク質が存在しないため、該宿主細胞から分泌される。

【0129】

該ポリペプチド又は断片は一つ以上の選択されたコドンで改変されうる。改変は、該ポリペプチド又は断片の未改変又は天然の配列と比較してアミノ酸配列の変化をもたらす、該ポリペプチド又は断片をコードする遺伝子における一つ以上のコドンの置換、欠失、又は挿入と定義される。該改変は該分子の一以上の領域における、任意の他のアミノ酸で少なくとも一つのアミノ酸を置換することによるものであることが好ましい。このような改変は、例えば2.3節及び2.4.1節に記載されるような当分野で知られる種々の方法により作製されうる。これらの方法は、オリゴヌクレオチドにより媒介される突然変異誘発及び例えば本明細書に記載するカセット突然変異誘発を含むが、これらに限定されない。

10

【0130】

ファージミド粒子のライブラリーは、次いで適切な条件下でスクロース又はスクロースを含む基質と接触させる。通常、pH、イオン強度、温度などを含む条件は生理条件に似せる。高いスクロース・イソメラーゼ活性を有するファージミド粒子を次に低い活性を有するものから選別する。

【0131】

適切な宿主細胞を選択されたファージミド粒子及びヘルパーファージで感染させ、この宿主細胞を該ファージミド粒子の増幅に適した条件下で培養する。次に該ファージミド粒子を回収し、該標的分子に対して所望の親和性を有する結合剤が選択されるまで該選択工程を一回以上繰り返す。

20

【0132】

2.4.5 合理的な薬物設計

本発明の単離されたポリペプチドの変異型又はその生物活性断片は、従来の原理、即ち例えばアンドリュース（「アルフレッド・ベンゾン・シンポジウムの議事録」, 28巻, 145~165頁, ムクスガード, コペンハーゲン, 1990）、マックフェルソン, エイ. (1990, Eur. J. Biochem. 189: 1-24)、ホルら（「分子認識：化学的及び生化学的な問題」、ロバーツ, エス.エム. (編); Royal Society of Chemistry; 84~93頁, 1989）、ホル, ダブリュ. ジェイ. (1989, Arzneim-Forsch. 39: 1016-1018)、ホル, ダブリュ. ジェイ. (1986, Agnew Chem. Int. Ed. Engl. 25: 767-778)により記載された合理的な薬物設計の原理を用いても得られうる。

30

【0133】

従来の薬物設計方法に従えば、所望の変異型分子は、本発明の親ポリペプチド又は生物活性のある断片の構造と共通した特性を有する構造の分子を無作為に試験することにより得られる。結合分子の特定基の変化に起因する量的な貢献は、親ポリペプチド又はポリペプチド断片と候補のポリペプチド変異型との競合又は協同性の能力を測定することにより決定され得る。

40

【0134】

合理的な薬物設計の一実施態様においては、該ポリペプチド変異型は本発明のポリペプチド又はポリペプチド断片の最も安定な三次元コンフォメーションの特性を共有するように設計される。従って、該変異型は、本発明のポリペプチド又はポリペプチド断片により示されるものと類似したイオン性、疎水性、又はファン・デル・ワールスの相互作用を惹起するのに十分な方法で方向付けられた化学基群を所有するように設計されうる。合理的な設計の第二の方法においては、特定のポリペプチド又はポリペプチド断片がコンフォメーション上の「呼吸」に耐える能力が開発される。このような「呼吸」（異なる分子コンフ

50

オメーションを一時的且つ可逆的に採ること)はよく理解されている現象であり、温度、熱力学的な因子、及び該分子の触媒活性から生ずる。ポリペプチド又はポリペプチド断片の3次元構造の知識はこのような評価を容易にする。ポリペプチド又はポリペプチド断片の天然のコンフォメーション変化の評価は、潜在的なヒンジ部位、水素結合、イオン結合若しくはファン・デル・ワールス結合が形成するかも知れない潜在的な部位、又は分子の呼吸などにより消失するかも知れない潜在的な部位の認識を促進する。このような認識は、該ポリペプチド又はポリペプチド断片が採りうるであろう更なるコンフォメーションの同定を可能とし、このようなコンフォメーションを共有する擬似ポリペプチド変異型の合理的な設計及び作製を可能にする。

【0135】

合理的な模倣設計を行う好ましい方法は、ポリペプチド又はポリペプチド断片の三次元構造の表示を形成できるコンピュータ・システム(RIBBON(プリエスツル, ジェイ・1988, J. Mol. Graphics 21: 572)、QUANTA(ポリゲン)、Insite(バイオシン)又はナノビジョン(アメリカン・ケミカル・ソサイエティ)を用いて得られるものなど)を用いる。このような分析はホルら(「分子認識: 化学的及び生化学的な問題」, 前出)、ホル, ダブリュ・ジイ・ジェイ・(1989, 前出)、及びホル, ダブリュ・ジイ・ジェイ・(1986, 前出)により例示される。

【0136】

候補ポリペプチド変異型のこのような直接的比較評価の代わりに、スクリーニング検定法を用いてこのような分子を同定してもよい。このような検定法はスクロースのイソマルチュロースへの変換を触媒する変異型の能力を利用することが好ましい。

【0137】

2.5 ポリペプチド誘導体

本発明の適切な誘導体に関して言えば、このようなスクロースからイソマルチュロースへの変換を触媒する誘導体には、本発明のポリペプチド、断片又は変異型におけるアミノ酸の欠失及び/又はそれへの付加が含まれる。アミノ酸の「付加」は本発明のポリペプチド、断片及びポリペプチド変異型と他のポリペプチド又はタンパク質との融合を含みうる。例えば、該ポリペプチド、断片又は変異型はより大きいポリペプチド内へ組込まれうること、並びにこのようなより大きいポリペプチドは上記のようにスクロースからイソマルチュロースへの変換を触媒することも期待しうるということが理解されよう。

【0138】

本発明のポリペプチド、断片又は変異型は、例えば起源の宿主に由来しない更なるタンパク質と融合されうる。更なるタンパク質は融合タンパク質の精製に役立つものである。例えば、ポリヒスチジン・タグ又はマルトース結合タンパク質はこの点で下記により詳細に述べるように用いられうる。他の可能な融合タンパク質は免疫調節応答を生じるものである。このようなタンパク質の具体的な例としては、プロテインA又はグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)が含まれる。

【0139】

本発明により意図される他の誘導体は、側鎖への修飾、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の合成中における非天然アミノ酸及び/又はそれらの誘導体の組み込み、並びに架橋剤の使用及び本発明のポリペプチド、断片、及び変異型にコンフォメーション上の制約を課する他の方法の使用を含むが、これらに限定されない。

【0140】

本発明により意図される側鎖修飾の例には、無水酢酸を用いたアシル化などによるアミノ基の修飾、無水コハク酸及び無水テトラヒドロフタル酸を用いたアミノ基のアシル化、メチルアセチミデートによるアミジン化、シアネートによるアミノ基のカルバモイル化、ピリドキサル-5-ホスフェートによるリシンのピリドキシル化の後NaBH₄による還元、アルデヒドとの反応の後NaBH₄による還元による還元性アルキル化、並びに2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)によるアミノ基のトリニトロベンジル化が含まれる。

10

20

30

40

50

【0141】

カルボキシル基はO-アシルイソウレア形成を介したカルボジイミド活性化後、続いて、一例として対応するアミドへの誘導化により修飾されうる。

【0142】

アルギニン残基のguanidino基は2,3-ブタンジオン、フェニルグリオキサール及びグリオキサールなどの試薬による複素環縮合産物の形成により修飾されうる。

【0143】

スルフィド基は、システイン酸への過ギ酸の酸化、4-クロロメルクリフェニルスルホン酸、4-クロロメルクリ安息香酸、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、フェニルメルクリクロライド、及び他の水銀剤を用いた水銀誘導体の形成、他のチオール化合物と混合ジスルフィドの形成、マレインイミド、無水マレイン酸又は他の置換されたマレインイミドを用いた反応、ヨード酢酸又はヨードアセタミドを用いたカルボキシメチル化、並びにアルカリ性pHでのシアネートを用いたカルバモイル化などの方法により修飾されうる。

10

【0144】

トリプトファン残基は、例えば、2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルプロマイド若しくはハロゲン化スルホニルを用いたインドール環のアルキル化又はN-ブロモスクシンイミドを用いた酸化により修飾されうる。

【0145】

チロシン残基はテトラニトロメタンを用いたニトロ化により修飾され、3-ニトロチロシン誘導体を形成しうる。

20

【0146】

ヒスチジン残基のイミダゾール環はジエチルピロカルボネートを用いたN-カルベトキシル化又はヨード酢酸誘導体を用いたアルキル化により修飾されうる。

【0147】

ペプチド合成中に非天然アミノ酸及び誘導体を組み込む例には、4-アミノ酪酸、6-アミノヘキサ酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸、t-ブチルグリシン、ノルロイシン、ノルバリン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、2-チエニルアラニン及び/又はアミノ酸のD-異性体の使用が含まれるが、これらに限定されない。本発明により意図される非天然アミノ酸の列挙は表Dに示される。

30

【0148】

【表D】

非通常アミノ酸	非通常アミノ酸
α -アミノ酪酸	L-N-メチルアラニン
α -アミノ- α -メチル酪酸	L-N-メチルアルギニン
アミノシクロプロパン-カルボン酸	L-N-メチルアスパラギン
アミノイソ酪酸	L-N-メチルアスパラギン酸
アミノノルボニル-カルボン酸	L-N-メチルシステイン
シクロヘキシルアラニン	L-N-メチルグルタミン
シクロペンチルアラニン	L-N-メチルグルタミン酸
L-N-メチルイソロイシン	L-N-メチルヒスチジン
D-アラニン	L-N-メチルロイシン
D-アルギニン	L-N-メチルリシン
D-アスパラギン酸	L-N-メチルメチオニン
D-システイン	L-N-メチルノルロイシン
D-グルタミン	L-N-メチルノルバリン
D-グルタミン酸	L-N-メチルオルニチン

10

20

【 0 1 4 9 】

【 表 D - 1 】

非通常アミノ酸	非通常アミノ酸
D-ヒスチジン	L-N-メチルフェニルアラニン
D-イソロイシン	L-N-メチルプロリン
D-ロイシン	L-N-メチルセリン
D-リシン	L-N-メチルトレオニン
D-メチオニン	L-N-メチルトリプトファン
D-オルニチン	L-N-メチルチロシン
D-フェニルアラニン	L-N-メチルバリン
D-プロリン	L-N-メチルエチルグリシン
D-セリン	L-N-メチル- ϵ -ブチルグリシン
D-トレオニン	L-ノルロイシン
D-トリプトファン	L-ノルバリン
D-チロシン	α -メチル- β -アミノ酪酸
D-バリン	α -メチル- γ -アミノ酪酸
D- α -メチルアラニン	α -メチルシクロヘキシルアラニン
D- α -メチルアルギニン	α -メチルシクロペンチルアラニン
D- α -メチルアスパラギン	α -メチル- α -ナフチルアラニン
D- α -メチルアスパラギン酸	α -メチルペニシラミン
D- α -メチルシステイン	N-(4-アミノブチル)グリシン
D- α -メチルグルタミン	N-(2-アミノエチル)グリシン
D- α -メチルヒスチジン	N-(3-アミノプロピル)グリシン
D- α -メチルイソロイシン	N-アミノ- α -メチル酪酸
D- α -メチルロイシン	α -ナフチルアラニン
D- α -メチルリシン	N-ベンジルグリシン
D- α -メチルメチオニン	N-(2-カルバミルエチル)グリシン
D- α -メチルオルニチン	N-(カルバミルメチル)グリシン

10

20

30

【 0 1 5 0 】

【 表 D - 2 】

非通常アミノ酸	非通常アミノ酸
D- α -メチルフェニルアラニン	N-(2-カルボキシエチル)グリシン
D- α -メチルプロリン	N-(カルボキシメチル)グリシン
D- α -メチルセリン	N-シクロブチルグリシン
D- α -メチルトレオニン	N-シクロヘプチルグリシン
D- α -メチルトリプトファン	N-シクロヘキシルグリシン
D- α -メチルチロシン	N-シクロデシルグリシン
L- α -メチルロイシン	L- α -メチルリシン
L- α -メチルメチオニン	L- α -メチルノルロイシン
L- α -メチルノルバリン	L- α -メチルオルニチン
L- α -メチルフェニルアラニン	L- α -メチルプロリン
L- α -メチルセリン	L- α -メチルトレオニン
L- α -メチルトリプトファン	L- α -メチルチロシン
L- α -メチルバリン	L-N-メチルホモフェニルアラニン
N-(N-(2,2-ジフェニルエチル)カルバミルメチル)グリシン	N-(N-(3,3-ジフェニルプロピル)カルバミルメチル)グリシン
1-カルボキシ-1-(2,2-ジフェニル-エチルアミノ)シクロプロパン	

10

20

30

40

50

【0151】

例えば、 $(CH_2)_n$ ($n = 1$ から $n = 6$) のスペーサー基を有する二官能性イミドエステル、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのホモ二官能性架橋剤、及び通常N-ヒドロキシスクシンイミドなどのアミノ反応性部分及びマレイミド若しくはジチオ部分若しくはカルボジイミドなどの別の基に特異的な反応性部分とを含むヘテロ二官能性試薬を用いた本発明のポリペプチド、断片又は変異型の3Dコンフォメーションを安定化させるための架橋剤の使用も意図される。その上、ペプチドは、例えば、アミノ酸のCとCの原子間への二重結合の導入により、C-及びN-メチルアミノ酸の組み込みにより、並びに該ペプチド若しくは類似体のN末端とC末端との間、二つの側鎖の間、又は側鎖とN末端若しくはC末端との間にアミド結合を形成するなど、共有結合を導入することによる環状ペプチド若しくは類似体の形成により、コンフォメーション的に制約できる。例えば、直交する保護基としてのトリメチルシリルエステル(TMS E)を用いたTFA樹脂上のペプチド環化を記載するマルロヴェ(1993, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 3: 437-44)、オキシム形成による水溶液中の非保護ペプチドの環化を記載するパリンとタム(1995, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 2021-2022)、リシン側鎖の固定を介した頭-尾環状ペプチドの固相合成を開示するアリギンら(1994, *Tetrahedron Letters* 35: 9633-9636)、3次元固相戦術による頭-尾環状ペプチドの生産を記載するケイトら(1993, *Tetrahedron Letters* 34: 1549-1552)、固定され活性化された中間体からの環状ペプチドの合成を記載するツメルティら(1994, *J. Chem. Soc.*

Chem. Comm. 1067-1068) (固定されたペプチドの活性化は原型を保ったN-保護基を用いて実施され、該N-保護基は続いて除去され環状化に至る)、アスパラギン酸及びグルタミン酸の側鎖により不溶性支持体に付着したペプチドの頭-尾環状化を開示するマックムレイら(1994, Peptide Research 7: 195-206)、固体支持体を介してペプチドを環状化する代替方法を教示するルビーら(1994, Reactive Polymers 22: 231-241)、並びにシクロテトラペプチド及びシクロペンタペプチドを合成する方法を開示するシュミッツとランゲル(1997, J. Peptide Res. 49: 67-73)が参照されうる。前方法はスクロースからイソマルチュロースへの転位を触媒するコンフォメーション上制約されたポリペプチドを生産するために用いられうる。

10

【0152】

本発明は、タンパク質分解に対する耐性を改良するよう又は可溶性を最適化するよう又は免疫原物質としてより適切にならしめるよう通常の分子生物学技術を用いて改変された本発明のポリペプチド、断片又は変異型をも意図する。

【0153】

2.6 本発明のポリペプチドを調製する方法

本発明のポリペプチドは当業者に知られる任意の適切な手法により調製されうる。例えば、該ポリペプチドは、(a)配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 8及び配列番号: 10のいずれか一つに示される配列、又はこれらの変異型若しくは誘導体を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって転写及び翻訳の調節核酸に機能しうるように連結されている配列を含む組換えポリヌクレオチドを調製する工程、(b)該組換えポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入する工程、(c)該宿主細胞を培養し該組換えポリヌクレオチドから組換えポリペプチドを発現させる工程、並びに(d)該組換えポリペプチドを単離する工程、を含む手順により調製されうる。該ヌクレオチド配列は配列番号: 1、配列番号: 3、配列番号: 7及び配列番号: 9のいずれか一つに示される配列を含むことが好ましい。

20

【0154】

該組換えポリヌクレオチドは、プラスミドなどの自己複製する染色体外ベクターでありうる発現ベクター又は宿主ゲノムに組込まれるベクターの形態であることが好ましい。

【0155】

該転写及び翻訳の調節核酸は一般的に発現に用いられる宿主細胞に適することが必要である。適切な発現ベクター及び適切な調節配列の多数の型が種々の宿主細胞について当分野で知られている。

30

【0156】

典型的には、転写及び翻訳の調節核酸は、プロモーター配列、リーダー配列又はシグナル配列、リボソーム結合部位、転写の開始配列及び停止配列、翻訳の開始配列及び停止配列、並びにエンハンサー配列又はアクチベーター配列を含みうるが、これらに限定されない。

【0157】

当分野で知られる構成性又は誘導性のプロモーターが本発明により意図される。該プロモーターは天然に生じるプロモーター又は二つ以上のプロモーターの要素を結合したハイブリッドプロモーターのいずれかでありうる。

40

【0158】

好ましい実施態様において、該発現ベクターは形質転換した宿主細胞の選択を可能とする選択可能マーカー遺伝子を含む。選択可能マーカー遺伝子は当分野で周知であり用いられる宿主細胞によって変化する。

【0159】

該発現ベクターは、本発明の組換えポリペプチドが該融合相手との融合ポリペプチドとして発現するように融合相手も含みうる(通常、発現ベクターにより与えられる)。融合相手の主な利点は、それらが該融合ポリペプチドの同定及び/又は精製の助けとなることで

50

ある。

【0160】

該融合ポリペプチドを発現させるために、融合相手及びポリヌクレオチドの翻訳の読み取り枠が一致するように本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに連結することが必要である。

【0161】

良く知られている融合相手の例には、アフィニティー・クロマトグラフィーによる融合ポリペプチドの単離にとりわけ有用な、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、ヒト IgG のFc部分、マルトース結合タンパク質 (MBP)、及びヘキサヒスチジン (HIS₆) が含まれるが、これらに限定されない。アフィニティー・クロマトグラフィーによる融合ポリペプチドの精製の目的上、アフィニティー・クロマトグラフィーの関連する媒体には、グルタチオン-、アミロース-、及びニッケル-又はコバルト-と結合した樹脂が含まれるが、これらに限定されない。多くのこのような媒体は、(HIS₆)融合相手に有用な QIAexpress (商標) システム (キアーゲン社) 及びファルマシア GST 精製システムなどの「キット」形態で入手できる。好ましい実施態様において、該組換えポリヌクレオチドは以下により詳しく記載する市販の pFLAG ベクターで発現する。

10

【0162】

当分野でよく知られている他の融合相手は緑蛍光タンパク質 (GFP) である。この融合相手は蛍光性「タグ」として役立ち、本発明の融合ポリペプチドは蛍光顕微鏡又はフローサイトメトリーによる同定を可能とする。この GFP のタグは、本発明の融合ポリペプチドの細胞内の局在化を判断する際に、又は本発明の融合ポリペプチドを発現する細胞を単離するために、有用である。蛍光標示式細胞分取法 (FACS) などのフローサイトメトリー法はこの後者の適用においてとりわけ有用である。

20

【0163】

該融合相手は X₂ 因子又はトロンピンなどのプロテアーゼ切断部位も有することが好ましい。該部位は関連するプロテアーゼが本発明の融合ポリペプチドを部分的に消化することを可能にし、それにより本発明の組換えポリペプチドをそこから遊離させる。次に、遊離したポリペプチドはその後のクロマトグラフィー分離により該融合相手から分離できる。

【0164】

本発明の融合相手はそれらの範囲内で「エピトープ・タグ」も含み、それらは通常それに対する特異的抗体が入手できる短いペプチド配列である。それに対する特異的モノクローナル抗体が容易に入手できるエピトープ・タグのよく知られている例には、c-Myc、インフルエンザウイルス、ヘマグルチニン及び FLAG のタグが含まれる。

30

【0165】

宿主細胞に組換えポリヌクレオチドを導入する工程は、トランスフェクション及び形質転換を含む任意の適切な方法により達成されうる。その選択は用いる宿主細胞に応じて変化する。このような方法は当業者には周知である。

【0166】

本発明の組換えポリペプチドは、本発明のポリペプチド、生物活性のある断片、変異型又は誘導体をコードする核酸を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することにより生産されうる。タンパク質の発現に適切な条件は発現ベクター及び宿主細胞の選択によって変化する。これは機械的実験により当業者により容易に確認される。

40

【0167】

発現に適切な宿主細胞は原核性であっても、真核性であってもよい。本発明のポリペプチドの発現に好ましい一つの宿主細胞は細菌である。用いられる細菌は大腸菌でありうる。または、該宿主細胞は、例えばバキュロウイルスの発現系とともに利用されうる SF9 細胞などの昆虫細胞であってもよい。

【0168】

該組換えタンパク質は、例えばサムブルックら、分子クローニング、実験マニュアル (コ

50

ールド・スプリング・ハーバー・プレス、1989)、特に16節及び17節、オーズベルら、分子生物学の最新プロトコル(ジョン・ウィレイ&ソンス社、1994~1998)、特に10章及び16章、並びにコリガンら、タンパク質科学の最新プロトコル(ジョン・ウィレイ&ソンス社、1995~1997)、特に1章、5章及び6章に記載されている標準的なプロトコルを用いて当業者により簡便に調製されうる。

【0169】

または、本発明のポリペプチド、断片、変異型又は誘導体は、例えばアゼルトンとシェパード(前出)の9章及びロベルゲら(1995, Science 269: 202)に記載されている溶液合成又は固相合成を用いて合成されうる。

【0170】

10

3. 本発明のポリヌクレオチド

3.1 イソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドを単離する方法

本発明はイソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードする新規なポリヌクレオチドを単離する方法を特徴とする。この方法は、スクロースをイソマルチュロースに変換できる生物が有利に選択できる場所から環境試料を得る工程を含む。該環境試料は、例えば土又は植物の表面若しくは組織(例えば花)を含む植物材料を含みうる。該環境試料は、定期的に又は一定して実質的なスクロース濃度を利用可能な場所から得られることが好ましい。これらの場所には、糖を含む植物又は植物の一部の加工又は貯蔵に關与する工場及び収穫された糖を含む植物の残余物を含む畑などが含まれるが、これらに限定されない。糖を含む植物は砂糖大根又はサトウキビであることが好ましいが、これらに限らない。

20

【0171】

該方法は、増殖用の炭素源としてスクロース及びイソマルチュロースの両方を用いることができるスクロース及びイソマルチュロースの二重代謝性生物を選択するかさもなければ濃縮する工程をさらに含むことが好ましい。例えば、該生物はイソマルチュロースを代謝する生物を選択又は濃縮するために十分な時間及び条件の下でイソマルチュロースを含有する培地上で増殖しうる。こうして選択又は濃縮された生物は続いてイソマルチュロース及びスクロースを二重に代謝する生物を選択又は濃縮するために十分な時間及び条件の下でスクロースを含有する培地で増殖させうる。所望ならば、該生物が上記培地で増殖する順序は逆であってもよい。

30

【0172】

生物は、イソマルチュロースの生産を定量する少なくとも一つの検定法を用いてスクロースからイソマルチュロースを生産するものについてスクリーニングされる。該検定は例えば下記の実施例3及び実施例4に開示するようなアニリン/ジフェニルアミン検定であることが好ましいが、これに限らない。代わりに、又はそれに加えて、スクロースからイソマルチュロースへの変換を定量する検定法が用いられることが好ましい。この型の適切な検定はスクロース及び/又は關連する代謝産物と比較してイソマルチュロース産物を定量しうる。例えば、下記の実施例5及び実施例6に記載するキャピラリー電気泳動検定法はこの点で用いられうる。

40

【0173】

スクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドを、次にイソマルチュロースを生産する生物から単離する。この単離は、イソマルチュロースを生産する生物に由来する核酸ライブラリー及び任意選択的にこのライブラリーのサブクローンをイソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドについてスクリーニングする工程を含むことが好ましい。該スクリーニングは、例えば本明細書に開示されるスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドに特異的なプライマー又はプローブを用いて促進されることが好ましい。該核酸ライブラリーはゲノム核酸又はcDNAから適切に作製される発現ライブラリーであることが好ましい。所望のポリヌクレオチドは、例えば上述したようなイソマルチュロースの生産を定量する検定法を用いて検

50

出されうる。ポリヌクレオチドの機能的なスクリーニングの典型的なプロトコルは実施例 7 から実施例 12 に記載されている。

【0174】

イソマルチュロース生産について陽性を示したクローンは次に既知のスクロース・イソメラーゼと比べ新規な遺伝子及び/又は遺伝子産物であることを同定するために核酸配列分析にかけられうる。次に、望みの産物の酵素活性、収率及び純度を適切な条件下で既知の参照酵素と比較し、優れたスクロース・イソメラーゼ活性をもつポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを同定しうる。

【0175】

3.2 本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明は上で定義したポリペプチド、断片、変異型又は誘導体をコードするポリヌクレオチドをさらに提供する。一つの実施態様において、該ポリヌクレオチドは配列番号：1 に示されたヌクレオチドの全配列を含む。配列番号：1 は全長の E . ラポンティキの 1899 塩基対のスクロース・イソメラーゼをコードする配列に対応する。この配列は、(1) ヌクレオチド 1 から約ヌクレオチド 108 までのシグナルペプチドをコードする第一領域、及び(2) 約ヌクレオチド 109 からヌクレオチド 1899 までの成熟スクロース・イソメラーゼ酵素をコードする第二領域を規定する。該ポリヌクレオチドは配列番号：3 に示された配列を含むことが好ましい。配列番号：3 は該シグナル配列を含まない成熟スクロース・イソメラーゼ・ポリペプチドをコードする領域を定める。本発明のコード配列は、マッテスら(前出)の E . ラポンティキのスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドと比べ 3 末端に余分の 594 塩基対の配列を含む。

【0176】

別の実施態様においては、該ポリヌクレオチドは配列番号：8 に示されたヌクレオチドの全配列を含む。配列番号：8 は単離細菌 68 J の 1791 塩基対のスクロース・イソメラーゼの全長をコードする配列に対応する。配列番号：12 は、(1) ヌクレオチド 1 から約ヌクレオチド 99 までのシグナルペプチドをコードする第一領域、及び(2) 約ヌクレオチド 100 からヌクレオチド 1791 までの成熟したスクロース・イソメラーゼ酵素をコードする第二領域を規定する。該ポリヌクレオチドは配列番号：10 に示された配列を含むことが好ましい。配列番号：10 は該シグナル配列を含まない成熟したスクロース・イソメラーゼ・ポリペプチドをコードする領域を規定する。

【0177】

3.3 ポリヌクレオチド変異型

一般的に、本発明のポリヌクレオチド変異型は、同一サイズ(「比較窓」)の参照ポリヌクレオチド配列と比較して、又は該整列が当分野で知られるコンピュータ相同性プログラムにより実施された整列配列と比較した場合、少なくとも 60%、より適切には少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、並びにより好ましくは少なくとも 90% の配列同一性を示す領域を含む。適切な変異型を構成するものは従来技術により決定されうる。例えば、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7 及び配列番号：9 のいずれか一つのポリヌクレオチドを、本発明の単離された天然プロモーターの先に調製された変異型又は非変異型の無作為突然変異誘発(例えばトランスポゾン突然変異誘発)、オリゴヌクレオチドにより媒介される(若しくは部位特異的)突然変異誘発、PCR 突然変異誘発及びカセット突然変異誘発を用いて突然変異させることができる。

【0178】

オリゴヌクレオチドにより媒介される突然変異誘発は本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド置換変異型を調製する好ましい方法である。この技術は例えばアデルマンら(1983、DNA 2: 183)により記載されたように当分野で周知である。簡単に述べると、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7 又は配列番号：9 のいずれか一つのポリヌクレオチドを、鋳型 DNA への所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることにより改変する。ここで、該鋳型は未改変の即ち親の DNA 配列を含むプラスミド又はバクテリオファージの一本鎖形である。ハイブリダイゼーション後、

10

20

30

40

50

DNAポリメラーゼを用いて、該オリゴヌクレオチド・プライマーが組込まれそして該親DNA配列中の選択された改変をコードする、該鑄型の全長第二相補鎖を合成する。

【0179】

一般的に、長さが少なくとも25ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドが用いられる。最適なオリゴヌクレオチドは、該突然変異をコードするヌクレオチドの片方の鎖で該鑄型と完全に相補的な12から15のヌクレオチドを有するものである。これは該オリゴヌクレオチドが一本鎖DNA鑄型分子と適切にハイブリダイズすることを確実にする。

【0180】

該DNA鑄型はバクテリオファージM13ベクターに由来するベクター又はヴィエラら(1987, Methods Enzymol. 153:3)により記載された一本鎖のファージ複製起点を含むベクターにより作製され得る。こうして、突然変異されるべきDNAは該ベクターの一つに挿入され一本鎖の鑄型を作製しうる。一本鎖鑄型の生産は例えばサンプルックら(1989, 前出)の4.21節~4.41節に記載されている。

10

【0181】

または、該一本鎖鑄型は標準的な技術を用いて二本鎖プラスミド(又は他のDNA)を変性することにより作製されうる。

【0182】

天然のDNA配列の改変のため、該オリゴヌクレオチドを適切なハイブリダイゼーション条件下で一本鎖鑄型にハイブリダイズさせる。次に、DNA重合酵素、通常はDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を添加し、合成用のプライマーとしてオリゴヌクレオチドを用いて鑄型の相補鎖を合成する。こうして、一方のDNA鎖は試験下で該ポリペプチド又は断片の突然変異形態をコードし、他方の鎖(元の鑄型)は試験下で該ポリペプチド又は断片の天然の改変されていない配列をコードするようなヘテロ二本鎖分子が形成される。このヘテロ二本鎖分子は次いで適切な宿主細胞、通常は大腸菌などの原核生物に形質転換される。該細胞を増殖させた後、それらをアガロースプレート上に播種し、検出可能な標識を有するオリゴヌクレオチド・プライマーを用いてスクリーニングし、突然変異したDNAを有する細菌コロニーを同定する。得られた突然変異DNA断片を次に従来技法を用いて大腸菌などの適切な発現宿主にクローニングし、所望のスクロース・イソメラーゼ活性を保持するクローンを検出する。該クローンが無作為突然変異誘発技術を用いて誘導された場合、陽性クローンは該突然変異を検出するために配列決定しなければならないであろう。

20

30

【0183】

または、DNAのリンカー・スキヤニング突然変異誘発を用いて、プラスミドベクターに、クローニングされた目的の配列全体にわたって点突然変異のクラスターを導入しうる。例えば、相補的オリゴヌクレオチドを用い且つ突然変異を誘発されるべき領域に近接した唯一つの制限部位を必要とする最初のプロトコルに記載しているオーズベルら、前出(とりわけ、8.4章)が参照されうる。欠失突然変異の入れ子系列がまず該領域に作製される。欠失終点のリンカーと近くの制限部位との間にある目的の配列中の隙間を埋めるために一對の相補的オリゴヌクレオチドが合成される。該リンカー配列は、欠失突然変異系列の様々な終点にあるその位置までその領域を横切って移動する又は「スキヤンする」ので、実際に所望する点突然変異のクラスターを提供する。代替的プロトコルもオーズベルら(前出)により記載されてる。この方法は部位特異的突然変異誘発手法を利用して該標的領域全体にわたって点突然変異の小クラスターを導入する。簡単に述べると、一つ以上の不適合を含む合成オリゴヌクレオチドを一本鎖M13ベクターにクローニングされた目的の配列とアニーリングすることにより配列に突然変異を導入する。この鑄型は該鑄型鎖にウラシルを組み込める大腸菌の *dut⁻ ung⁻* 株中で増幅される。該オリゴヌクレオチドを精製した該鑄型とアニーリングしT4DNAポリメラーゼを用いて伸長させ二本鎖のヘテロ二本鎖を作成する。最終的に、該ヘテロ二本鎖を野生型の大腸菌株に導入する。該ヘテロ二本鎖は鑄型鎖のウラシルの存在により該鑄型鎖の複製を妨げる。それにより突然変異したDNAのみを含むプラークを生成する。

40

50

【0184】

領域に特異的な突然変異誘発及びPCRを用いる特異的突然変異誘発も本発明のポリヌクレオチド変異型を構築するために用いられうる。この点において、例えば、オーズベルら、前出、とりわけ8.2A章及び8.5章が参照されうる。

【0185】

または、本発明の適切なポリヌクレオチド配列変異型は下記の手法に従って調製されうる。(i)任意選択的に縮重しているプライマーであって、それぞれが本発明の参照ポリペプチド又は断片をコードする、好ましくは配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7又は配列番号：9のいずれか一つに示された配列をコードする参照ポリヌクレオチドの一部を含むものであるプライマーを作製する工程、(ii)スクロースを代謝する生物、好ましくは細菌、より好ましくはスクロースをイソマルチュロースに変換できる生物が本明細書に記載するように有利に選択される場所から入手された種、から核酸抽出物を得る工程、並びに(iii)該プライマーを用いて核酸増幅技術により該核酸抽出物から少なくとも一つの増幅産物を増幅する工程(該増幅産物はポリヌクレオチド変異型に対応する)。

10

【0186】

適切な核酸増幅技術は、当業者に周知であり、例えばオーズベルら(前出)に記載されているポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、例えば米国特許第5,422,252号に記載されている鎖置換増幅(SDA)、例えばリウら(1996, J. Am. Chem. Soc. 118:1587-1594及び国際出願WO92/01813)及びリザルディら(国際出願WO97/19193)に記載されているローリング・サークル複製(RCR)、例えばソクナナンら(1994, Biotechniques 17:1077-1080)に記載されている核酸配列に基づく増幅(NASBA)、並びに例えばティアギら(1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5395-5400)により記載されているQ-レプリカーゼ増幅を含む。

20

【0187】

典型的には、参照ポリヌクレオチドに実質的に相補的なポリヌクレオチド変異型は、核酸が媒体(ニトロセルロースなどの合成膜が好ましい)上に固定される工程、続いてハイブリダイゼーション工程、及び検出工程を含むプロットング技術により同定される。サザン・プロットングは相補的なDNA配列を同定するために用いられ、ノーザン・プロットングは相補的なRNA配列を同定するために用いられる。ドット・プロットング及びスロット・プロットングは相補的なDNA/DNA、DNA/RNA又はRNA/RNAのポリヌクレオチド配列を同定するために用いられ得る。このような技術は当業者には周知であり、オーズベルら(1994~1998、前出)の2.9.1頁から2.9.20頁までに記載されている。

30

【0188】

このような方法によれば、サザン・プロットングは、ゲル電気泳動により大きさに応じてDNA分子を分離する工程、大きさに応じて分離したDNAを合成膜に移転する工程、及び膜に結合したDNAを放射能、酵素又は蛍光色素で標識された相補的なヌクレオチド配列とハイブリダイズさせる工程を含む。ドット・プロットング及びスロット・プロットングでは、DNA試料は上記のハイブリダイゼーション前に合成膜に直接適用する。

40

【0189】

cDNAライブラリー又はゲノムDNAライブラリー中で相補的なポリヌクレオチドを同定する場合、ブランク・ハイブリダイゼーション又はコロニー・ハイブリダイゼーションのプロセスを経るなど、代替的プロットング工程が用いられる。この手法の典型的な例はサムブルックら(「分子クローニング, 実験マニュアル」, コールド・スプリング・ハーバー・プレス, 1989), 8~12章に記載されている。

【0190】

典型的には、下記的一般手法がハイブリダイゼーション条件を決定するために用いられ得る。ポリヌクレオチドを上述したように合成膜にプロットング/転移する。本発明のポリヌクレオチドなどの参照ポリヌクレオチドを上述したように標識し、この標識されたポ

50

リヌクレオチドが固定されたポリヌクレオチドとハイブリダイズする能力が分析される。

【0191】

当業者は幾つかの因子がハイブリダイゼーションに影響を及ぼすことを認識している。放射標識されたポリヌクレオチド配列の比放射能は、検出可能なシグナルを提供するために典型的には約 10^8 dpm/mg 以上であるべきである。 10^8 dpm/mg から 10^9 dpm/mg の比放射能の放射標識ヌクレオチド配列は約 0.5 pg の DNA を検出できる。検出を可能にするためには十分な DNA が該膜上に固定されなければならないことは当業者には周知である。DNA は過剰、通常 $10 \mu\text{g}$ 、に固定させることが望ましい。ハイブリダイゼーション中における 10% (w/v) の硫酸デキストラン (MW 500,000) 又はポリエチレングリコール 6000 などの不活性重合体の添加もハイブリダイゼーションの感度を増大し得る (オズベル、前出、2.10.10 を参照)。

10

【0192】

膜上に固定されたポリヌクレオチドと標識されたポリヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションから意味のある結果を得るためには、十分な量の標識されたポリヌクレオチドが洗浄後の固定されたポリヌクレオチドとハイブリダイズしなければならない。洗浄は、標識されたポリヌクレオチドが該標識されたポリヌクレオチドに対して所望の度合いの相補性を持つ固定化ポリヌクレオチドとのみハイブリダイズすることを保証する。

【0193】

本発明のポリヌクレオチド変異型は少なくとも低度の厳格性条件下で参照ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることが理解されよう。本明細書中での低度の厳格性条件についての言及は、42 のハイブリダイゼーションで少なくとも約 1% v/v から少なくとも約 15% v/v のホルムアミド及び少なくとも約 1M から少なくとも約 2M の塩、並びに 42 の洗浄で少なくとも約 1M から少なくとも約 2M の塩を含み且つ包含する。低度の厳格性条件は、65 のハイブリダイゼーションで 1% の仔牛血清アルブミン (BSA)、1mM EDTA、0.5M NaHPO_4 (pH 7.2)、7% SDS、及び室温の洗浄で (i) $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 又は (ii) 0.5% BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO_4 (pH 7.2)、5% SDS も含むうる。

20

【0194】

該ポリヌクレオチド変異型は少なくとも中程度の厳格性条件下で参照ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることが相応しい。中程度の厳格性条件は、42 のハイブリダイゼーションで少なくとも約 16% v/v から少なくとも約 30% v/v のホルムアミド及び少なくとも約 0.5M から少なくとも約 0.9M の塩、並びに 55 の洗浄で少なくとも約 0.1M から少なくとも約 0.2M の塩を含み且つ包含する。中程度の厳格性条件は、65 のハイブリダイゼーションで 1% の仔牛血清アルブミン (BSA)、1mM EDTA、0.5M NaHPO_4 (pH 7.2)、7% SDS、及び 60~65 の洗浄で (i) $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 又は (ii) 0.5% BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO_4 (pH 7.2)、5% SDS も含むうる。

30

【0195】

該ポリヌクレオチド変異型は高度の厳格性条件下で参照ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることが好ましい。高度の厳格性条件は、42 のハイブリダイゼーションで少なくとも約 31% v/v から少なくとも約 50% v/v のホルムアミド及び約 0.01M から約 0.15M の塩、並びに 55 の洗浄で約 0.01M から約 0.02M の塩を含み且つ包含する。高度の厳格性条件は、65 のハイブリダイゼーションで 1% の BSA、1mM EDTA、0.5M NaHPO_4 (pH 7.2)、7% SDS、及び 65 を上回る温度の洗浄で (i) $0.2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 又は (ii) 0.5% BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO_4 (pH 7.2)、1% SDS も含むうる。

40

【0196】

他の厳格性条件は当分野で周知である。当業者は、種々の因子がハイブリダイゼーションの特異性を最適化するために操作され得ることを認知している。最終洗浄の厳格性の最適化は高度のハイブリダイゼーションを保証するのに役立ち得る。詳細な例については、オ

50

ーズベルら、前出、2.10.1頁から2.10.16頁及びサンプブックら(1989、前出)、1.101節から1.104節を参照せよ。

【0197】

厳格な洗浄は典型的には約42 から68 の温度で実施されるものの、当業者は他の温度が厳格な条件に適うることを理解するであろう。最高ハイブリダイゼーション速度は、DNA-DNAハイブリッドを形成については、典型的には該 T_m よりも約20 から25 低い温度で起こる。該 T_m は融解温度又は二つの相補的ポリヌクレオチド配列が解離する温度であることは当分野では周知である。 T_m を評価する方法は当分野でよく知られている(オズベルら、前出、2.10.8頁を参照)。

【0198】

一般的に、完全に一致する二本鎖DNAの T_m は該式による概算として予測されうる。

【0199】

$T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} M) + 0.41 (\%G + C) - 0.63 (\% \text{ホルムアミド}) - (600 / \text{長さ})$

【0200】

上式中、Mは Na^+ 濃度で、好ましくは0.01モル濃度から0.4モル濃度の範囲にあり、 $\%G + C$ は総塩基数の百分率としてのグアノシン塩基及びシトシン塩基の合計で、30%から75% $G + C$ の範囲内にあり、%ホルムアミドは容積によるパーセントホルムアミド濃度であり、長さはDNA二本鎖の塩基対数である。

【0201】

二本鎖DNAの T_m はランダムに不適合した塩基対数が1%増加するごとに約1 低下する。洗浄は一般的に高度の厳格性では $T_m - 15$ 又は中程度の厳格性では $T_m - 30$ で実施される。

【0202】

好ましいハイブリダイゼーション手法において、固定されたDNAを含む膜(例えばニトロセルロース膜又はナイロン膜)は標識されたプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液(50%脱イオン化ホルムアミド、5xSSC、5xデンハルト溶液(0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン及び0.1%仔牛血清アルブミン)、0.1%SDS及び200mg/mL変性サケ精子DNA)中42 で一晩ハイブリダイズする。該膜は次に二回の連続した中程度の厳格性の洗浄(即ち、45 で15分間2xSSC、0.1%SDS、その後50 で15分間2xSSC、0.1%SDS)後、二回の連続した高度の厳格性の洗浄(即ち、55 で12分間0.2xSSC、0.1%SDS、その後65~68 で12分間0.2xSSC及び0.1%SDS溶液)にかけられる。

【0203】

固定したポリヌクレオチドとハイブリダイズした標識されたポリヌクレオチドを検出する方法は当分野の熟練者にはよく知られている。このような方法には、オートラジオグラフィ、ホスホイメージング(phosphorimaging)、並びに化学発光、蛍光及び比色分析の検出が含まれる。

【0204】

4. 抗原結合分子

本発明は前述のポリペプチド、断片、変異型及び誘導体に特異的に結合する抗原結合分子も意図する。本発明の抗原結合分子は配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24で示されるいずれか一つ以上のアミノ酸配列又はそれらの変異型と免疫相互作用することが好ましい。

【0205】

例えば、該抗原結合分子は全長のポリクローナル抗体を含みうる。このような抗体は、例えば本発明のポリペプチド、断片、変異型又は誘導体を生産種(マウス又はウサギを含みうる)中に注射してポリクローナル抗血清を得ることにより調製されうる。ポリクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体を生産する方法は当業者には周知である。用いられうる典型的なプロトコルは、例えば、コリガンら、免疫学の最新プロトコル（ジョン・ウィレイ&ソنز社，1991）及びオーズベルら（1994～1998、前出）、とりわけ11章のIII節に記載されている。

【0206】

生産種で得られるポリクローナル抗血清の代わりに、例えばコーラーとミルスタイン（1975、Nature 256、495～497）により記載された標準的な方法を用いて、又は、脾臓又は本発明の一つ以上のポリペプチド、断片、変異型若しくは誘導体で接種された生産種に由来する他の抗体生産細胞を不死化することによる例えばコリガンら（1991、前出）に記載されたさらに最近のその改変方法によりモノクローナル抗体が作製されうる。

10

【0207】

本発明は抗原結合分子としてFv、Fab、Fab'、及びF(ab')₂ 免疫グロブリン断片をも意図する。

【0208】

または、抗原結合分子は安定化された合成Fv断片を含みうる。このタイプの断片の例としては、V_H ドメインのN末端又はC末端をV_L ドメインのそれぞれC末端又はN末端と架橋するためにペプチドリinkerが使用されている一本鎖Fv断片（sFv、しばしばscFvと呼ばれる）が含まれる。scFvは全抗体の定常部分を全て欠いており、補体を活性化することはできない。V_H ドメインとV_L ドメインを結合する適当なペプチドリinkerはFv断片がそれから誘導される全抗体の抗原結合部位の三次元構造と類似した三次元構造を持つ抗原結合部位を有する一本鎖ポリペプチドにV_H ドメインとV_L ドメインを折り畳ませるペプチドリinkerである。望ましい性質を持つリinkerは米国特許第4,946,778号に開示された方法によって得られうる。しかしながら、場合によっては、リinkerは存在しない。scFvは、例えば、クレーバーら（クレーバーら，1997，J. Immunol. Methods, 201(1): 35-55）に概述された方法に従って調製されうる。または、scFvは、米国特許第5,091,513号、欧州特許第239,400号、又はウィンター及びミルシュタイン（1991，Nature 349: 293）及びプリュクトウンら（1996，In Antibody engineering: A practical approach, 203-252）による文献に記載された方法により調製しうる。

20

30

【0209】

または、安定化された合成Fv断片には、完全に折り畳まれたFv分子ではシステイン残基がそれらの間にジスルフィド結合を形成するようにこの二つのシステイン残基がV_H ドメインとV_L ドメインに導入されたジスルフィド安定化Fv(dsFv)が含まれる。dsFvを作成する適当な方法は、例えば、（グロックスクーザーら，Biochem. 29: 1363-1367、ライターら，1994，J. Biol. Chem. 269: 18327-18331、ライターら，1994，Biochem. 33: 5451-5459、ライターら，1994，Cancer Res. 54: 2714-2718、ウェバーら，1995，Mol. Immunol. 32: 249-258）に記載されている。

40

【0210】

また、例えば、ワードら（1989，Nature 341: 544-546）、ハマー・カスターマンら（1993，Nature 363: 446-448）、デイビースとリーチマン（1994，FEBS Lett. 339: 285-290）に記載されたような1個の可変領域ドメイン（dAbsと呼ばれる）も抗原結合分子として意図される。

【0211】

または、抗原結合分子は「ミニボディ」を含んでもよい。この点で、ミニボディは全抗体の必須の要素を一本鎖中にコードする全抗体の小さな翻訳である。このミニボディは、例

50

えば、米国特許第 5, 837, 821 号に開示されたような免疫グロブリン分子のヒンジ領域と CH3 ドメインに融合した天然の抗体の V_H ドメインと V_L ドメインから成ることが好ましい。

【0212】

代わりの実施態様では、抗原結合分子は非免疫グロブリンから誘導されたタンパク質枠組みを含んでいてもよい。例えば、抗原結合のために選択された相補性決定領域 (CDR) を作成するように無作為化された二つのループを有する 4 本のヘリックス束のタンパク質チトクローム b562 を開示するクーとシュルツ (1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 652-6556) を参照しうる。

【0213】

抗原結合分子は多価 (即ち、二つ以上の抗原結合部位を有する) でありうる。このような多価分子は一つ以上の抗原に特異的でありうる。この種の多価分子は、例えばアダムスら (1993, Cancer Res. 53: 4026-4034) 及びカンバーら (1992, J. Immunol. 149: 120-126) により開示されたようなシステイン含有ペプチドを介して二つの抗体断片の二量体化により調製しうる。または、二量体化は抗体断片を自然に二量体化する両親媒性のヘリックスに融合する (パック, P. ブリュクナム, 1992, Biochem. 31: 1579-1584) ことにより、又は優先的にヘテロ二量体化する (コステルニールら, 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553) ドメイン (ロイシンジッパー、jun や fos など) の使用により、促進しうる。別の実施態様では、多価分子は一つのペプチドリンカーにより一緒に連結された少なくとも二つの scFv を含む多価一本鎖抗体 (多価-scFv) を含む。この点で、「ダイアボディ (diabodies)」と呼ばれる非共有結合的に又は共有結合的に連結した scFv 二量体を使用されうる。多価 scFv は、異なる抗原結合特異性を有する二特異的又は使用された scFv の数に依存してより多くの特異性を持ちうる。多価 scFv は、例えば、米国特許第 5, 892, 020 号に開示された方法により調製しうる。

【0214】

本発明の抗原結合分子は、本発明の天然の又は組換えのポリペプチド又は生物活性断片を単離する際のアフィニティークロマトグラフィーに使用しうる。例えば、コリガンら (1995-1997, 上掲) の 9.5 章に記述された免疫親和性クロマトグラフィー手順を参照してもよい。

【0215】

抗原結合分子は本明細書に記載された本発明の変異型ポリペプチドの発現ライブラリーをスクリーニングするために使用できる。抗原結合分子は、本発明のポリペプチド、断片、変異型及び誘導体を検出及び/又は単離するためにも使用できる。こうして、本発明は、例えば、適当な任意の免疫アフィニティに基づく方法を用いてスクロース・イソメラーゼ酵素を単離するための抗原結合分子の使用をも意図する。上記の方法には、免疫クロマトグラフィー及び免疫沈降法が含まれるがこれらに限定されない。好ましい方法は、抗スクロース・イソメラーゼ抗原結合分子が適当な樹脂に付着した固相吸着を利用する。この樹脂をスクロース・イソメラーゼを含むと思われる試料と接触させ、若しあれば、そのスクロース・イソメラーゼは続いて該樹脂から溶出される。好ましい樹脂としては、Sepharose (登録商標) (ファルマシア)、Poros (登録商標) (ロッシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ、インディアナポリス)、Actigel Superflow (商標) 樹脂 (ステロジーン・バイオセパレーションズ・インク、カールスバド、カリフォルニア)、及び Dynabeads (商標) (ダイナル・インク、レイクサクセス、N.Y.) が挙げられる。

【0216】

5. 検出方法

5.1 本発明のポリペプチドの検出

本発明は、試料中で、上に広く述べたようなポリペプチド、断片、変異型又は誘導体を検

10

20

30

40

50

出する方法であって、該試料を4部で述べたような抗原結合分子と接触させる工程、及び該抗原結合分子と該接触試料中の該ポリペプチド、断片、変異型又は誘導体を含む複合体の存在を検出する工程を含む方法にも及ぶ。

【0217】

上記複合体の形成を測定するには適当な任意の方法が使用しうる。例えば、レポーター分子と結合した本発明の抗原結合分子が免疫検定に利用しうる。このような免疫検定には、当業者に周知の放射免疫検定(RIA)、酵素連結免疫吸着検定(ELISA)及び免疫クロマトグラフィー技法(ICT)、ウェスタンブロットが含まれるが、これらに限定されない。例えば、本発明に使用されうる種々の免疫検定を開示する「CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (免疫学の最新のプロトコル)」(1994、上掲)を参照しうる。免疫検定には、当分野で知られているような、又は例えば以下に述べるような競争的検定が含まれうる。本発明が定性的及び定量的免疫検定法を包含することは理解されるはずである。

10

【0218】

適当な免疫検定法は、例えば、米国特許第4,016,043号、第4,424,279号及び第4,018,653号に記載されている。これらは、伝統的な競争結合検定ばかりでなく、非競争型の一部位検定及び二部位検定の両方を含む。これらの検定は標的抗原への標識化抗原結合分子の直接結合をも含む。

【0219】

二部位検定は本発明の使用にはとりわけ有利である。これらの検定の幾つかの変法が存在し、それらの全てが本発明により包含されることが意図される。簡単に述べれば、代表的な前向き検定では、無標識抗体などの無標識抗原結合分子が固体基板に固定され、テストすべき試料をその結合した分子と接触させる。適当なインキュベーション期間、即ち、抗体-抗原複合体を形成させるのに十分な時間の後、検出可能なシグナルを発することができレポーター分子で標識した別の抗原結合分子、好ましくは該抗原に特異的な第二の抗体を次に添加し、抗体-抗原-標識化抗体という別の複合体を形成させるのに十分な時間インキュベートする。未反応物質を全て洗い流し、抗原の存在をレポーター分子が発するシグナルを観察することにより決定する。その結果は可視的シグナルの単なる観察による定性的なものでも、既知の量の抗原を含む対照試料と比較することによる定量的なものであってもよい。前向き検定の変法には、試料と標識化抗体の両方が結合した抗体へ同時に添加される同時検定が含まれる。これらの技法は容易に明らかになるような僅かな変法を含め、当業者には周知である。本発明によれば、試料は、スクロース代謝性生物から得られるものなどのスクロース・イソメラーゼを含むかも知れない試料である。スクロース代謝性生物は細菌であり、スクロースをイソマルチュロースに変換できる生物が有利に選択される場所から得られることが好ましい。

20

30

【0220】

典型的な前向き検定では、抗原又はその抗原性部分に特異性を有する第一の抗体を固体表面に共有結合により又は受動的に結合させる。この固体表面は通常ガラス又はポリマーであり、最も普通に使用されるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンである。固定支持体は管、ビーズ、マイクロプレートの円盤、又は免疫検定を行なうのに適した他の任意の表面でありうる。結合方法は当分野でよく知られており、一般に架橋、共有結合又は物理的吸着からなる。ポリマー抗体複合体をテスト試料について調製し洗浄する。試験すべき試料の部分標本を次に固相複合体に添加し、存在する如何なる抗原も該抗体に結合できるような十分な時間及び適当な条件の下でインキュベートする。このインキュベーション期間の後に、該抗原抗体複合体を洗浄し、乾燥し、そして該抗原の一部に特異的な第二の抗体とインキュベートさせる。この第二の抗体は一般に該抗原と第二の抗体との結合を示すために使用されるレポーター分子と結合している。この結合レポーター分子により測定される、結合している標識化抗体の量は、固定化された第一抗体に結合した抗原の量に比例する。

40

【0221】

50

代わりの方法は、生体試料中の抗原を固定化する工程、次いでこの固定化抗原をレポーター分子で標識化された又は標識化されていない特異的抗体と接触させる工程を含む。標的の量及びレポーター分子のシグナルの強度に応じて、結合した抗原は抗体での直接標識化により検出する。または、第一の抗体に特異的な第二の標識化抗体を標的 - 第一抗体複合体と接触させて標的 - 第一抗体 - 第二抗体という三重複合体を形成させる。この複合体はレポーター分子により発せられるシグナルにより検出される。

【0222】

前述のことから、抗原結合分子と結合したレポーター分子は次のものを含んでもよいことが認められる。

- (a) 抗原結合分子へのレポーター分子の直接付着、
- (b) 抗原結合分子へのレポーター分子の間接付着、即ち、別の検定試薬にレポーター分子を付着させ、続いて別の検定試薬を抗原結合分子に結合させる、
- (c) 抗原結合分子の次の反応生成物への付着。

10

【0223】

レポーター分子は、発色団、触媒、酵素、蛍光色素、化学発光分子、ユーロピウム (Eu^{3+}) などのランタンイオン、放射性同位元素、及び直接可視標識を含む基から選択しうる。

【0224】

直接可視標識の場合には、コロイド状の金属粒子又は非金属粒子、色素粒子、酵素又は基質、有機ポリマー、ラテックス粒子、リポソーム、又はシグナル発生物質を含む他のビークル、などが利用できる。

20

【0225】

米国特許第4,366,241号、第4,843,000号、及び第4,849,338号の各明細書に、レポーター分子として使用するのに相応しい酵素が大量に開示されている。本発明に有用な適当な酵素には、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、リゾチーム、マレートデヒドロゲナーゼなどが含まれる。これらの酵素は単独でも溶液状の第二の酵素との組み合わせでも使用しうる。

【0226】

適当な蛍光色素には、フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC)、テトラメチルロ-ダミン・イソチオシアネート (TRITC)、R-フィコエリスリン (RPE) 及びテキサス・レッドが含まれるが、これらに限定されない。他の典型的な蛍光色素にはダウワ-ら (国際公開番号 WO 93/06121) により論じられているものがある。米国特許第5,573,909号 (シンガー-ら)、第5,326,692号 (プリンクラー-ら) に記載された蛍光色素をも参照しうる。または、米国特許第5,227,487号、第5,274,113号、第5,405,975号、第5,433,896号、第5,442,045号、第5,451,663号、第5,453,517号、第5,459,276号、第5,516,864号、第5,648,270号及び第5,723,218号に記載された蛍光色素を参照しうる。

30

【0227】

酵素免疫検定の場合には、酵素は第二の抗体に、一般にグルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸塩により、結合させられる。しかし、容易に分かるように、当業者に容易に利用可能な多様な異種の結合方法が存在する。これらの特異的酵素と共に使用される基質は一般に対応する酵素により加水分解される際に検出可能な色の変化を生ずることで選択される。適当な酵素の例には、上に記載したものが含まれる。上に述べた発色原基質ではなく蛍光産物を生ずる蛍光原基質を使用することも可能である。全ての場合、酵素標識化抗体が第一抗体-抗原複合体に添加される。次いで、結合させ、過剰な試薬を洗い流す。次に、適当な基質を含む溶液をその抗体-抗原-抗体という複合体に添加する。基質は第二抗体に結合した酵素と反応し、定性的な可視的シグナルを生ずる、これは、通常分光光度計によりさらに定量化され、該試料中に存在した抗原の量の指標を与えうる。

40

50

【0228】

フルオレセイン、ローダミン及びランタニド、ユーロピウム（EU）などの蛍光性化合物は抗体の結合能力を変えずに抗体に交互に化学的に結合しうる。特定波長の光で照射することにより活性化すると、蛍光色素標識化抗体は光エネルギーを吸収し、分子内に励起状態を誘発し、その後光学顕微鏡で可視的に検出可能な特徴的な色の光を放射する。蛍光標識化抗体は第一抗体-抗原複合体に結合させられる。未結合の試薬を洗い流した後、残る三重複合体を次に適当な波長の光に曝す。観察される蛍光は目的の抗原の存在を示す。免疫蛍光定量検定（IFMA）は当分野で十分に確立されている。しかしながら、放射性同位元素、化学発光性又は生物発光性分子などの他のレポーター分子も採用しうる。

【0229】

10

5.2 本発明のポリヌクレオチドの検出

別の実施態様では、検出方法は該ポリペプチド、断片、変異型又は誘導体をコードするポリヌクレオチドの細胞内での発現を検出する工程を含む。該ポリヌクレオチドの発現は任意の適当な技法を用いて測定しうる。例えば、該メンバーをコードする標識化ポリヌクレオチドを、筋細胞から得たRNA抽出物のノーザンブロットにおけるプローブとして利用しうる。動物からの核酸抽出物は、RT-PCRなどの核酸増幅反応に於ける該メンバーをコードするポリヌクレオチド又はその両側に隣接する配列のセンス又はアンチセンス配列に相当するオリゴヌクレオチドプライマーと一緒に利用されることが好ましい。種々の自動化固相検出法も適切である。例えば、極めて大きなスケールの固定化プライマーアレイ（VLSIPS（商標））は、例えばフォドルら（1991, *Science* 251: 767-777）及びカザールら（1996, *Nature Medicine* 2: 753-759）により記載された核酸検出のために使用される。上記の遺伝子法は当業者に周知である。

20

【0230】

6. キメラ核酸構築物

6.1 原核細胞による発現

本発明はさらに、プロモーター配列に機能しうるように連結された本発明のポリヌクレオチド、断片又は変異型を含む、原核細胞の遺伝子形質転換用に設計されたキメラ核酸構築物に関する。このキメラ構築物はグラム陰性原核細胞中で機能しうることを好ましい。キメラ核酸構築物を構築するための根拠として使用されうる種々の原核発現ベクターは本発明のポリヌクレオチド、断片又は変異型を発現するために利用しうる。これらには、染色体ベクター（例えば、バクテリオファージなどのバクテリオファージ）、染色体外ベクター（例えば、プラスミド又はコスミドの発現ベクター）が含まれるが、これらに限定されない。この発現ベクターは通常このベクターの自動複製を可能とする複製起点、及び形質転換された細胞の表現型選択を可能とする一つ以上の遺伝子を含む。構成プロモーター配列及び誘導プロモーター配列を含む幾つかの適当なプロモーター配列のいずれかを発現ベクター中に使用しうる（例えば、ピターら、1987, *Methods in Enzymology* 153: 516-544）。例えば、バクテリオファージ、*plac*、*ptrp*、*ptac* の *pL* などの誘導プロモーター、*ptrp-lac* ハイブリッドプロモーターなどが使用しうる。次いで、キメラ核酸構築物を用いて所望の原核宿主細胞を形質転換して、上記のような組換えポリペプチドを製造するため又は以下に述べるイソマルチュロースを製造するための組換え原核宿主細胞を作成しうる。

30

40

【0231】

6.2 真核細胞による発現

本発明は真核宿主細胞中で本発明のポリヌクレオチド、断片又は変異型を発現させるように設計されたキメラ核酸構築物をも意図する。種々の真核宿主-発現ベクター系がこの面で利用しうる。これらには、組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母、組換えウイルス発現ベクターで感染させた昆虫細胞系（例えば、バキュロウイルス）、又は組換えウイルス発現ベクターで感染させた動物細胞系（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクチニアウイルス）、又は安定な発現をさせるために工学処理された形質転換動物細

50

胞系が含まれるが、これらに限定されない。キメラ核酸構築物は以下に記載されるように植物の遺伝的形質転換のために設計されることが好ましい。

【0232】

6.3 植物の発現

好ましい実施態様では、本発明のポリヌクレオチド、断片又は変異型は、植物の遺伝的形質転換のために設計されたキメラDNA構築物を作成するため、プロモーター配列及び3'非翻訳配列に融合される。

【0233】

6.3.1 植物プロモーター

本発明が意図するプロモーター配列は、その領域が宿主植物中で機能しうる場合、形質転換されるべき宿主植物にとって本来のものであってもよく、又は別の起源から誘導されたものでもよい。他の起源としては、ノパリン、オクタピン、マンノピン又は他のオピネ (opine) の生合成のためのプロモーターなどのアグロバクテリウム T-DNA 遺伝子、ユビキチンプロモーターなどの植物由来のプロモーター、組織特異的プロモーター (コンクリングらによる米国特許第 5,459,252 号、アドバンスド・テクノロジーズによる WO 91/13992 号を参照)、ウイルス由来のプロモーター (宿主特異的ウイルスを含む)、又は部分的に若しくは全体的に合成されたプロモーターが含まれる。単子葉植物及び双子葉植物で機能する多数のプロモーターが当分野で良く知られており (例えば、グリーブ, 1983, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 499-511、サロモンら, 1984, *EMBO J.* 3: 141-146、ガルフィンケルら, 1983, *Cell* 27: 143-153、バーカーら, 1983, *Plant Mol. Biol.* 2: 235-350 を参照)、植物から単離された種々のプロモーター (トウモロコシの ubi-1 遺伝子由来の Ubi プロモーター、クリステンセンとクエイル, 1996) (例えば、米国特許第 4,962,028 号) 及びウイルス (カリフラウワー・モザイク・ウイルス・プロモーター, CaMV 35S など) 由来のプロモーターが含まれる。

10

20

30

【0234】

プロモーター配列は転写を調節する領域を含む。この領域では、調節は、例えば、化学的又は物理的抑制又は誘導 (例えば、代謝物、光又は他の物理化学的因子に基づく調節、例えば線虫類応答プロモーターを開示する WO 93/06710 を参照) 又は細胞分化に基づく調節 (植物の葉、根、種子、などに関連するものなど、例えば、根特異的プロモーターを開示する米国特許第 5,459,252 号を参照) を含む。従って、このプロモーター領域、又はこのような領域の調節部分はそのように調節される適当な遺伝子から得られる。例えば、1,5-リビュロース・ピホスフェート・カルボキシラーゼ遺伝子は光誘導性であり、転写開始のために使用されうる。ストレス、温度、創傷、病原体などの効果により誘導される他の遺伝子が知られている。

【0235】

培養細胞中での発現に好ましいプロモーターは強力な構成プロモーター、又は特異的誘導物質に应答するプロモーター (ガツとレンク, 1998, *Trends Plant Science* 3: 352-8) である。完全な植物での発現のための好ましいプロモーターはスクロース貯蔵組織 (サトウキビの成熟茎や砂糖大根の塊茎など) 中で発現したプロモーター、又は収穫前の後期の段階で、他の植物の成長や発育過程を破壊することなくスクロースのイソマルチュロースへの変換を駆動する誘導プロモーターである。

40

【0236】

6.3.2 3'非翻訳領域

本発明のキメラ遺伝子構築物は 3'非翻訳配列を含み得る。3'非翻訳配列はポリアデニル化シグナル及び mRNA プロセス又は遺伝子発現を行なうことができる任意の他の調節シグナルを含む DNA セグメントを含む遺伝子の一部を指す。ポリアデニル化シグナルは、mRNA 前駆体の 3'末端へのポリアデニル酸トラクトの付加を行なうことにより特徴付けられる。ポリアデニル化シグナルは普通正規の形態 5' A A T A A A - 3' への相同

50

性の存在により認識されるが、変化は稀ではない。

【0237】

3'非翻訳調節DNA配列は好ましくは約50から1000ヌクレオチド塩基対までを含み、ポリアデニル化シグナル及びmRNAプロセス又は遺伝子発現を行なうことができる任意の他の調節シグナルに加え、植物の転写及び翻訳終結配列を含みうる。適当な3'非翻訳配列の例としては、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノパリン・シンターゼ(nos)遺伝子由来のポリアデニル化シグナル(ベバンら, 1983, *Nucl. Acid Res.*, 11: 369)及びアグロバクテリウム・ツメファシエンスのオクトピン・シンターゼ遺伝子由来のT7転写物のターミネーターを含む3'転写される非翻訳領域である。または、適当な3'非翻訳配列は馬鈴薯若しくはトマト由来のプロテアーゼインヒビターI若しくはII遺伝子、大豆貯蔵タンパク質遺伝子の3'末端、及びリピュロース-1,5-ビスホスフェート・カルボキシラーゼ(ssRUBISCO)遺伝子のピーE9小ユニットなどの植物遺伝子に由来するものであるが、当業者に知られた他の3'要素も利用することができる。または、3'非翻訳調節配列は、例えば、アン(1987, *Methods in Enzymology*, 153: 292)により記載されたように、新たに得ることができる。この文献は参照により本明細書にインコーポレートされる。

10

【0238】

6.3.3 任意選択的配列

本発明のキメラDNA構築物は、必要な場合は、エンハンサー、翻訳エンハンサー又は転写エンハンサーのいずれかをさらに含むことができる。これらのエンハンサー領域は当業者に良く知られており、ATG開始コドンや隣接配列を含むことができる。この開始コドンは、外来性の又は内因性のDNA配列に関するコード配列の読み取り枠と同相にし、その全配列の翻訳を確実にしなければならない。翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然でも合成でもよく、多様な起源のものであることができる。翻訳開始領域は転写開始領域の供給源から、又は外来性若しくは内因性のDNA配列から与えられうる。この配列は転写を駆動するため選択されたプロモーターの供給源からも誘導することができ、mRNAの翻訳を促進するように特異的に改変できる。

20

【0239】

転写エンハンサーの例には、CaMV 35Sプロモーター及び、例えばラストラ(米国特許第5,290,924号、これは参照により本明細書にインコーポレートされる)により記載されたオクトピン・シンターゼ遺伝子由来の要素が含まれるが、これらに限定されない。ocs要素などのエンハンサー要素の使用及び特にこの要素の多数コピーの使用は、植物形質転換の関係で適用される場合、隣接プロモーターからの転写のレベルを増加するように働くことが提唱されている。または、タバコ・モザイク・ウイルスのコートタンパク質遺伝子由来のオメガ配列(ガリーら, 1987)は本発明のポリヌクレオチドから転写されたmRNAの翻訳を促進するために使用しうる。

30

【0240】

転写開始部位とコード配列の開始点の間に挿入されるDNA配列、即ち、非翻訳リーダー配列は遺伝子発現に影響を与え得るので、特定のリーダー配列を採用することもできる。好ましいリーダー配列は、外来性若しくは内因性のDNA配列の最適発現を指示するために選択された配列を含むものを含む。例えば、このようなリーダー配列はmRNAの安定性を増加又は維持でき且つ、例えば、ジョシ(1987, *Nucl. Acid Res.*, 15: 6643)により記載された翻訳の不適当な開始を防止できる好ましいコンセンサス配列を含む。上記文献は参照により本明細書にインコーポレートされる。しかしながら、他のリーダー配列、例えば、RTBVのリーダー配列はmRNAの安定性を減少させ及び/又はmRNAの翻訳を減少させることが予想される高度の二次構造を持つ。こうして、(i)高度の二次構造を持たない、(ii)mRNA安定性を阻害しない及び/又は翻訳を減少させない高度の二次構造を持つ、又は(iii)植物で高度に発現する遺伝子から誘導されるリーダー配列が最も好ましい。

40

50

【0241】

例えば、ヴァジルら(1989, *Plant Physiol.*, 91: 5175)により記載されたようなスクロース・シンターゼのイントロン、例えば、カリスら(1987, *Genes Develop.*, *II*)により記載されたようなAdhイントロンI、例えば、ガリーら(1989, *The Plant Cell*, 1: 301)により記載されたようなTMVオメガ要素などの調節要素も必要な場合は含めることができる。本発明の実施に有用な他のこのような調節要素も当業者に知られている。

【0242】

さらに、標的化配列は植物細胞内の細胞内の区画又は細胞外の環境へ外来性若しくは内因性DNA配列のタンパク質産物を標的化するために使用しうる。例えば、移送若しくはシグナルペプチド配列をコードするDNA配列は所望のタンパク質をコードする配列に機能しうるように連結され、その結果、翻訳されたとき、この移送若しくはシグナルペプチドはこのタンパク質を細胞内若しくは細胞外の特定の目的地に輸送でき、そして次いで翻訳後に除去され得る。移送若しくはシグナルペプチドは、細胞内膜、例えば、小胞体、液胞、小胞、色素体、ミトコンドリア、及び原形質膜などの膜を通るタンパク質の輸送を促進することにより作用する。例えば、標的化配列は望みのタンパク質を細胞質ゾルへではなく、液胞又は色素体(例えば、葉緑体)などの特定のオルガネラに向けることができる。こうして、キメラDNA構築物は、本発明のプロモーター領域又はプロモーター変異型と外来性若しくは内因性DNA配列の間に機能しうるように連結されたDNA配列をコードする色素輸送ペプチドをさらに含むことができる。例えば、ハイジンら(1989, *Eur. J. Biochem.*, 180: 535)及びキーンストラら(1989, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 471)を参照しうる。これらは参照により本明細書にインコーポレートされる。

【0243】

キメラDNA構築物はプラスミドなどのベクター中に導入することもできる。プラスミドベクターは、原核又は真核細胞中で発現カセットの選択、増幅、及び形質転換を容易にするさらなるDNA配列、例えばpUC誘導ベクター、pSK誘導ベクター、pGEM誘導ベクター、pSP誘導ベクター、又はpBS誘導ベクターを含む。さらなるDNA配列はこのベクターの自律複製をさせる複製起点、好ましくは抗生物質耐性若しくは除草剤耐性をコードする選択可能マーカー遺伝子、DNA配列又はキメラDNA構築物中にコードされる遺伝子を挿入するための部位を複数与えるユニークな多重クローニング部位、及び原核及び真核細胞の形質転換を高める配列を含む。

【0244】

ベクターは、宿主細胞ゲノム中へのそのベクターの安定な組み込みを可能とする要素又は細胞のゲノムとは独立に細胞中のベクターの自律複製を可能とする要素(単数又は複数)のいずれかを含むことが好ましい。ベクターは宿主細胞に導入される場合、宿主細胞ゲノム中に組み込まれうる。組み込みのため、ベクターは、相同組換えによりゲノム中にベクターを安定に組み込むためその中に存在する外来性若しくは内因性のDNA配列又はそのベクターの任意の他の要素に依存しうる。または、ベクターは宿主細胞のゲノム中に相同組換えによる組み込みを指示するための付加的な核酸配列を含みうる。この付加的核酸配列は宿主細胞のゲノム中の該染色体の正確な位置に該ベクターを組み込むことを可能とする。正確な位置に組み込む蓋然性を増加させるため、組み込まれる要素は相同組換えの確率を高めるべく対応する標的配列と高度に相同的な十分な数の核酸、例えば、100 ~ 1,500塩基対、好ましくは400 ~ 1,500塩基対、そして最も好ましくは800 ~ 1,500塩基対の核酸を含むことが好ましい。この組み込まれる要素は宿主細胞のゲノム中の標的配列と相同である任意の配列であってよい。さらに、この組み込まれる要素はコードしている核酸配列でもコードしていない核酸配列でもよい。

【0245】

クローニング及びサブクローニングのため、該ベクターは細菌細胞などの宿主細胞中で該

ベクターの自律的な複製を可能とする複製起点をさらに含む。細菌の複製起点の例は、大腸菌で複製を可能とするプラスミド pBR322、pUC19、pACYC177、及び pACYC184 の複製起点であり、バチルス中で複製を可能とする pUB110、pE194、pTA1060、及び pAM 1 の複製起点である。この複製起点はバチルス細胞中でその機能を温度感受性にする突然変異を持つものでありうる（例えば、エールリッヒ，1978，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1433）。

【0246】

6.3.4 マーカー遺伝子

形質転換体の同定を容易にするため、キメラ DNA 構築物は本発明のポリヌクレオチド配列などの、又はこれに加えて選択可能な又はスクリーニング可能なマーカー遺伝子を含むことが望ましい。標識の実際の選択は、それが選択された植物細胞との組み合わせで機能的（即ち、選択的）である限り、決定的に重要ではない。このマーカー遺伝子及び目的の外來性若しくは内因性の DNA 配列は連結される必要はない。何故なら、例えば、米国特許第 4,399,216 号に開示されたような連結されていない遺伝子の共形質転換は植物の形質転換においても効率的なプロセスであるからである。

【0247】

選択可能な又はスクリーニング可能なマーカー遺伝子という用語には、形質転換された細胞を同定し又は選択する手段としてその分泌が検出できる「分泌可能な標識」をコードする遺伝子が含まれる。例としては、抗体との相互作用により同定可能な分泌可能な抗原、又はその触媒活性により検出できる分泌可能な酵素をコードする標識が含まれる。分泌可能なタンパク質は、細胞壁に挿入又は捕捉されるタンパク質（例えば、エクステンシン又はタバコ PR-S の発現ユニット中に見出されるものなどのリーダー配列を含むタンパク質）、例えば ELISA により検出できる小さな拡散可能なタンパク質、及び細胞外溶液中で検出可能な小さな活性酵素（例えば、 α -アミラーゼ、 β -ラクタマーゼ、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ）を含むが、これらに限定されない。

【0248】

6.3.5 選択可能なマーカー

細菌の選択可能なマーカーの例としては、バチルス・ズブチリス又はバチルス・リケニホルミス由来の *dal* 遺伝子、又はアンピシリン、カナマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール又はテトラサイクリン等の耐性などの抗生物質耐性を付与するマーカーが挙げられる。植物の形質転換体を選択するための選択可能なマーカーの典型には、ハイグロマイシン B 耐性をコードする *hyg* 遺伝子、例えばポトリクスら（1985，Mol. Gen. Genet. 199: 183）により記載されたようなカナマイシン、パロモマイシン、G418 などに対する抵抗性を付与するネオマイシン・ホスホトランスフェラーゼ（*neo*）遺伝子、例えば EP-A 256223 号に記載されたような、グルタチオン由来の除草剤に対する抵抗性を付与するラット肝臓由来のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子、例えば WO 87/05327 号に記載されたようなホスフィノトリシンなどのグルタミン・シンターゼ阻害剤に対する耐性を過剰発現の際付与するグルタミン・シンターゼ遺伝子、例えば、EP-A 275957 に記載されたような選択剤ホスフィノトリシンに対する抵抗性を付与するストレプトミセス・ビリドクロモゲネス由来のアセチル・トランスフェラーゼ遺伝子、例えばヒンチーら（1988，Biotech. 6: 915）により記載されたような N-ホスホノメチルグリニンに対する抵抗性を付与する 5-エノールシキミ酸-3-リン酸シンターゼ（EPSPS）をコードする遺伝子、例えば、WO 91/02071 に記載されたようなピアラホ（*bialaphos*）に対する抵抗性を付与する *bar* 遺伝子、プロモキシニルに対する抵抗性を付与するクレブシエラ・オザエナ由来の *bxn* などのニトリラーゼ遺伝子（スターカーら，1988，Science, 242: 419）、メトトレキセートに対する抵抗性を付与するジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子（チレットら，1988，J. Biol. Chem., 263: 12500）、イミダゾリノン、スルホニル尿素又

10

20

30

40

50

は他のALS阻害化学物質(EP-A154204)に対する抵抗性を付与する突然変異アセトラクテート・シンターゼ遺伝子(ALS)、5-メチルトリプトファンに対する抵抗性を付与する突然変異アントラニル酸シンターゼ遺伝子、又は除草剤に対する抵抗性を付与するダラポン(dalapon)デハロゲナーゼ遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。

【0249】

6.3.6 スクリーニング可能マーカー

好ましいスクリーニング可能マーカーには、種々の発色性基質が知られている - グルクロニダーゼ(GUS)酵素をコードするuidA遺伝子、発色性基質が知られている酵素をコードする ガラクトシダーゼ遺伝子、カルシウム感受性生物発光検出に使用しうるエクオリン遺伝子(プラチャーら, 1985, Biochem. Biophys. Res. Comm., 126: 1259)、緑色蛍光タンパク質遺伝子(ニーズら, 1995, Plant Cell Reports, 14: 403)、生物発光検出を可能とするルシフェラーゼ(luc)遺伝子(オウら, 1986, Science 234: 856)、種々の発色性基質(例えば、PADAC, 発色性セファロsporin)が知られている酵素をコードする - ラクタマーゼ遺伝子(サトクリッフ, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3737)、植物組織(デラポルタら, 1988, in Chromosome Structure and Function, pp. 263-282)でアントシアニン色素(赤色)の生産を調節する生成物をコードするR-遺伝子座遺伝子、 - アミラーゼ遺伝子(イクタら, 1990, Biotech., 8: 241)、チロシンをドーパ及びドーパキノンに酸化し、これらが今度は縮合して容易に検出可能なメラニン化合物を形成できる酵素をコードするチロシナーゼ遺伝子(カツツら, 1983, J. Gen. Microbiol., 129: 2703)、又は発色性のカテコールを変換できるカテコールジオキシゲナーゼをコードするxylE遺伝子(ズコウスキーら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1101)が含まれるが、これらに限定されない。

【0250】

7. 植物細胞中へのキメラ構築物の導入

DNAを植物宿主細胞内に導入するための幾つかの方法が利用可能である。当分野で研究者に良く知られた植物の形質転換法が多数ありそして新たな技法が続々と知られつつある。形質転換法の特定の選択は、選択された特定の方法及び好みにより決定される。植物細胞内にキメラDNA構築物を導入するための形質転換系の特定の選択は、それが核酸移送の許容しうるレベルを達成するならば、本発明にとって本質的なものでも本発明の制約でもないことは当業者には明らかである。植物改良のため形質転換系を実際に実施する場合の手引きはバーチ(1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol., 48: 297-326)により与えられている。

【0251】

原理的には、形質転換を受けうる双子葉植物及び単子葉植物はいずれも本発明のキメラDNA構築物を受容体細胞に導入し、本発明のポリヌクレオチドを保持し発現する新たな植物を成長させることにより改変できる。

【0252】

タバコ、ポテト及びアルファルファなどの双子葉(幅広葉の)植物への外来の又はキメラのDNA配列の導入及びその中での発現はアグロバクテリウム・ツメファシエンスの腫瘍誘導(Ti)プラスミドのT-DNAを用いて行なうことができることが示された(例えば、ウンベック, 米国特許第5,004,863号、及び国際出願番号PCT/US93/02480号を参照)。本発明の構築物はTiプラスミドを含むA.ツメファシエンスを用いて植物細胞中に導入しうる。形質転換ピークルとしてA.ツメファシエンス培養を用いる場合、形質転換された組織の正常で発癌性のない分化可能なように、ベクター担体としてアグロバクテリウムの非発癌性の株を使用するのが最も有利である。このアグロ

10

20

30

40

50

バクテリウムは二重のTiプラスミド系を保持することが好ましい。このような二重の系は(1)植物に移送DNA(T-DNA)を導入するために不可欠の病原性領域を持つ第一Tiプラスミド、及び(2)キメラプラスミドを含む。このキメラプラスミドは、移送される核酸に隣接する野性型TiプラスミドのT-DNA領域の少なくとも一つの境界領域を含む。二重のTiプラスミド系は、例えばデフラモンド(1983, *Biotec hnology*, 1: 262)及びヘケーマら(1983, *Nature* 303: 179)により記載されたように植物細胞を形質転換するのに有効であることが示された。このような二重系は、アグロバクテリウムでTiプラスミド中に組み込むことを必要としないので特に好ましい。

【0253】

アグロバクテリウムの使用を必要とする方法は、(a)アグロバクテリウムを単離され培養された原形質体と共培養する工程、(b)植物の細胞又は組織をアグロバクテリウムで形質転換する工程、又は(c)種子、葉の頂点、又は分裂組織をアグロバクテリウムで形質転換する工程を含むが、これらに限定されない。

【0254】

最近、単子葉植物である稲及びトウモロコシがアグロバクテリウムで同様に形質転換を受けうることが示された。しかしながら、カラス麦、モロコシ類、キビ、及びライ麦を含む多数の他の重要な単子葉植物はアグロバクテリウム媒介形質転換を用いての形質転換に成功していない。しかしながら、Tiプラスミドはこれらの他の単子葉植物のためのベクターとして働くように将来操作されるであろう。さらに、モデル系としてTiプラスミドを使用すると、これらの植物のための形質転換ベクターを人為的に構築することが可能となりうる。Tiプラスミドは、マイクロインジェクションなど的人為的方法により、又は単子葉植物の原形質体とT-領域を含む細菌のスフェロプラストの融合、次いで植物の核DNA中に組み込むことにより、単子葉植物にも導入されるかも知れない。

【0255】

さらに、遺伝子移送は、ベクトールドラ(1993, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 316: 1194)により記載されたように、アグロバクテリウムによるインサイチュ形質転換により達成できる。この方法はアグロバクテリウム細胞の懸濁液の真空浸入に基づいている。

【0256】

または、キメラ構築物は、ベクターとしてアグロバクテリウムの根誘導(Ri)プラスミドを用いて導入してもよい。

【0257】

カリフラウワー・モザイク・ウイルス(CaMV)も植物細胞中に外因性核酸を導入するためのベクターとして使用しうる(米国特許第4,407,956号)。CaMVのDNAゲノムは親の細菌プラスミド内に挿入されて細菌内で増殖できる組換えDNA分子を生ずる。クローニングの後、組換えプラスミドを再びクローニングし、所望の核酸配列を導入することによりさらに改変しうる。次にこの組換えプラスミドの改変されたウイルス部分を親の細菌プラスミドから切断し、植物細胞又は植物に接種するために使用する。

【0258】

キメラ核酸構築物は、例えばフロマンら(1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 5824)及びシマモトら(1989, *Nature* 338: 274-276)により記載されたように、電気穿孔法により植物細胞内に導入することもできる。この方法では、植物の原形質体を関連する核酸配列を含むベクター又は核酸の存在下で電気穿孔させる。高い電場強度の電気衝撃は膜を可逆的に透過可能とし核酸を導入させる。電気穿孔された植物原形質体は細胞壁を再形成し、分裂し、そして植物カルスを形成する。

【0259】

キメラ核酸構築物を植物細胞内に導入する別の方法は、例えばクラインら(1987, *Nature* 327: 70)に記載されたように、小さなビーズ若しくは粒子の媒体

10

20

30

40

50

の内部か又はその表面のいずれかに導入すべき核酸を含む小さな粒子による高速弾道浸入である（粒子砲撃又はマイクロプロジェクティル砲撃としても知られる）。通常、新たな核酸配列1個の導入だけが必要であるが、この方法は特に複数の導入を生ずる。

【0260】

または、キメラ核酸構築物は機械的又は化学的手段を用いて植物細胞と接触させることによりその植物細胞中に導入できる。例えば、核酸をマイクロピペットの使用により直接植物細胞中へマイクロインジェクションにより機械的に移送できる。または、遺伝物質との沈殿複合体（これは植物細胞により摂取される）を形成するポリエチレングリコールを使用することにより、核酸を該細胞内に移送しうる。

【0261】

単子葉植物の形質転換については現在多様な方法が知られている。今日、単子葉植物の形質転換のための好ましい方法は、外植片又は細胞懸濁液のマイクロプロジェクティル砲撃であり、直接DNA摂取又は、例えばシマモトラ（1989, 上掲）により記載されたような電気穿孔法である。マイクロプロジェクティル砲撃によりトウモロコシ懸濁液培養の胚形成細胞中にストレプトミセス・ヒグロスコピクスの *bar* 遺伝子を導入することによりトランスジェニック・トウモロコシ植物が得られた（ゴードン・カム, 1990, *Plant Cell*, 2: 603-618）。小麦や大麦などの他の単子葉植物のアリユーロン原形質体中への遺伝物質の導入も報告された（リー, 1989, *Plant Mol. Biol.* 13: 21-30）。小麦植物は、胚形成懸濁培養物を確立するため古くなった密な塊状の胚形成カルス組織のみを選択することにより胚形成懸濁培養から再生された（バジル, 1990, *Bio/Technol.* 8: 429-434）。これらの穀物のための形質転換系と組み合わせると、本発明を単子葉植物に適用することが可能となる。これらの方法は、双子葉植物の形質転換及び再生にも適用しうる。トランスジェニックしたサトウキビ植物は、例えば、パウワーら（1996, *Molecular Breeding* 2: 239-249）により記載されたように胚形成カルスから再生された。

【0262】

または、例えば、アグロバクテリウムで被覆した微粒子を用いる砲撃（EP-A-486234）又は創傷を誘導するためのマイクロプロジェクティル砲撃の後のアグロバクテリウムとの共培養（EP-A-486233）などの異なる方法の組み合わせは、形質転換プロセスの効率を高めるために使用しうる。

【0263】

8. 分化したトランスジェニック植物の生産及び特性決定

8.1 再生

形質転換した細胞を分化した植物に再生するために使用した方法は、本発明にとって決定的に重要ではなく、標的植物に適する方法はすべて使用できる。通常、植物細胞は形質転換プロセスの後に全植物を得るために再生される。

【0264】

原形質体からの再生は、植物の種が変われば変化するが、一般には先ず原形質体の懸濁液が作成される。ある種では、次にこの原形質体懸濁液から胚の形成が誘導できる。これは天然の胚として熟成し発芽する段階までである。この培養培地は一般に成長及び再生に必要な種々のアミノ酸及びホルモンを含む。利用されるホルモンの例としては、オーキシンやサイトカインが含まれる。モロコシやアルファルファなどの種についてはとりわけ、培地にグルタミン酸及びプロリンを添加することがしばしば有利である。効率的な再生は培地、遺伝子型、及びその培養の履歴に依存する。これらの変数が制御されるならば、再生は再現可能である。再生は植物のカルス、外植片、器官又は部分からも生ずる。形質転換は器官や植物部分の再生に関しては、例えば、*Methods in Enzymology*, Vol. 118 及びクリーら（1987, *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 467）に記載されたように行なうことができる。これらは参照により本明細書にインコーポレートされる。ホーシュら（1985,

10

20

30

40

50

Science, 227: 1229, 参照により本明細書にインコーポレートされる) の葉のディスク形質転換 - 再生法を利用して、ディスクを選択的培地上で培養し、その後約2~4週間で苗条を形成させる。發育する苗条をカルスから切断し、適当な根誘導性の選択培地に移植する。根が現れた後できるだけ早く根の形成した苗木を土壤に移植する。この苗木は成熟するまで必要に応じ別の大きな鉢に植え替える。

【0265】

植物として増殖させる植物では、成熟したトランスジェニック植物を切断採取により又は組織培養法により増殖させて多数の同一植物を作成する。所望のトランスジェニック体を選択し、新たな変異体を得、商業的用途のために植物として増殖させる。

【0266】

種子で増殖させる植物では、成熟したトランスジェニック植物を自己交配させてホモ接合的同系の植物を作成する。この同系の植物は新たに導入された外来遺伝子(単数又は複数)を含む種子を生産する。これらの種子は成長して選択された表現型、例えば早期開花を示すであろう植物を生ずることができる。

【0267】

花、種子、葉、枝、果実などの再生された植物から得られた部分は、これらの部分が記載されたように形質転換された細胞を含むならば、本発明に含まれる。再生された植物の子孫や変異体、及び突然変異体も、これらの部分が導入された核酸配列を含むならば、本発明の範囲内に含まれる。

【0268】

文献には、特定の植物型を再生する無数の方法が記載されており、その数は継続してますます増加しつつあることが認められる。当業者は詳細について文献を参照でき、そして不当な実験なしに適当な方法を選択できる。

【0269】

8.2 特性決定

再生植物の中に本発明のポリヌクレオチドが存在することを確認するため、種々の検定を行いうる。このような検定には、例えば、サザンプロットやノーザンプロットやPCRなどの当業者に周知の「分子生物学的」検定法が含まれ、本発明のポリヌクレオチドにより発現されるタンパク質が、例えば本明細書に記載されたようにスクロース・イソメラーゼ活性について検定されうる。

【0270】

9. イソマルチュロースの生産

本発明はさらに、本明細書に記載されたポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列を用いる、又はそれらの変異型若しくは断片を用いるイソマルチュロースの生産のためのプロセスに関する。このプロセスは、(a)スクロース・イソメラーゼ活性を持つタンパク質をコードするDNA配列で形質転換される生物、例えば遺伝的に改変された細菌又は植物、(b)このような細胞又は生物からの細胞外産物又は細胞抽出物、及び(c)単離された形でスクロース・イソメラーゼ活性を持つタンパク質、から選択される少なくとも一つのメンバーとスクロース又はスクロース含有培地又は基質とを、スクロースがスクロース・イソメラーゼにより少なくとも一部イソマルチュロースに変換するような条件の下で、接触させる工程を含む。続いて、このイソマルチュロースを該培地又は生物から取り出し、当分野で知られているように精製する。例えば、スクロース含有培地と接触させた固定化細胞又はスクロース・イソメラーゼを用いたイソマルチュロースの工業的生産方法は知られている(チーサムら, 1985, Biotech. Bioeng. 27: 471-481、タカゾエ, 1989, 「パラチノース, スクロースの同位体代替物」、プログレス・イン・スイートナー(グレンビ, T. H. 編)バーキング: Elsevier, pp. 143-167、及びそれぞれの中の参考文献)。本発明はイソマルチュロース生産のより高い効率を含む有利な特性を持つ新規なスクロース・イソメラーゼを提供することにより、これらの方法を改良する。

【0271】

10

20

30

40

50

さらに、本発明は植物内で直接イソマルチュロースを生産する能力を初めて明らかにする。これは、植物からスクロースを抽出し、工業的発酵により他の生物、抽出物、又は単離された酵素によりイソマルチュロースに変換するための基質としてこれを提供する費用を回避するので、極めて有利である。そうではなくて、本明細書に記載されたように遺伝的に改変された植物中で光合成により生産されたスクロースはその植物組織中のスクロース・イソメラーゼ活性によりイソマルチュロースに変換される。次いで、生ずるイソマルチュロースは他の糖類、とりわけスクロースを収穫するために十分に確立された手順を用いて植物から収穫される。貯蔵されたイソマルチュロースを持つ植物物質は先ず収穫され、次いで破碎してイソマルチュロースを含むジュースを排出させ及び/又は拡散装置を通過させて可溶性のイソマルチュロースを不溶性の植物物質から抽出する。次いで、このイソマルチュロースを当業者に周知の不純物を除去する処理、蒸発による濃縮、結晶化段階により精製する(クックとスコット, 1993, 砂糖大根: 実施のための科学, ロンドン、チャップマン&ホール、ミード, 1977, 砂糖キビハンドブック, ニューヨーク, ウィリー、及びこれらそれぞれの参考文献)。

10

【0272】

本発明が容易に理解され実用的効果を得るために、特に好ましい実施態様を下記の非限定的実施例を用いてここに説明する。

【0273】

実施例実施例 1

20

マッテスらにより特定された領域に基づくオリゴヌクレオチドプライマーを用いたスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドの単離

この戦術を既知のスクロース・イソメラーゼ発現細菌(エルウィニア・ラポンティキ受託番号WAC2928)及びさらに30の単離独立細菌についてテストした。マッテスら(上掲)により彼らに知られたスクロース・イソメラーゼ遺伝子の彼らの分析から保存領域として特定された領域に基づいて縮重PCRプライマーを設計した。

配列番号: 1のヌクレオチド 139~155 から伸長する配列からなる前向きプライマー: 5' - t g g t g g a a (a , g) g a (g , a) g c t g t - 3' (配列番号: 38)

配列番号: 1のヌクレオチド 625~644 から伸長する配列からなる逆向きプライマー: 5' - t c c c a g t t a g (g , a) t c c g g c t g - 3' (配列番号: 39)

30

【0274】

細菌のゲノムDNAをPCRの鋳型として用いた。このゲノムDNAはオーズベルら(1989, 上掲)に従って抽出された。PCR反応は、100 ngのDNA、5 µlの10×PCR緩衝液(プロメガ)、2 µlのdNTPs(それぞれ5 mM NTP)、それぞれ250 ngの前向き及び逆向きプライマー、Taqポリメラーゼ 1 µl(プロメガ)を含む50 µlの最終容量で行なった。3種の異なるアニーリング温度、46、50、又は53で3回の平行PCRを行なった。94で最初の1分の後、94で1分、アニーリング温度で1分、及び72で1分からなるサイクルを35回行なった。

40

【0275】

1%アガロースゲル上でPCR産物を走らせた後、0.3から1.0 kbの範囲の大きさを持つバンドを回収し、pCR(登録商標)2.1ベクター中にTOPO(商標)TACloning(登録商標)キット(インビトロゲン)を用い、キット中の説明書に従ってクローニングした。プラスミド挿入体を、オーストラリアン・ゲノミック・リサーチ・ファシリティで、ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを用い、このベクターについて利用可能なM13逆向き又はM13前向きの普遍的プライマーを用いて配列決定した。ANGISを介するFASTAプログラムにより、質問として配列決定された

50

DNAを用いてゲンバンクのデータベースを調査した。

【0276】

マッテスら(上掲)により特定された「保存領域」から得たプライマーを用いて、PCR産物をエルウィニア・ラポンティキから及び後にスクロース・イソメラーゼ活性が陰性であることが見出された細菌類からも増幅した。アガロースゲル電気泳動により明らかにされたPCR産物のパターンは、2単離物からはゼロ、3単離物から1本のバンド、そしてエルウィニア・ラポンティキを含む他の細菌全てから複数のバンドを含んでいた。エルウィニア・ラポンティキから増幅された6本のバンドを含む12本のバンド中のDNAをクローニングし、配列決定した。マッテスらにより教示されたエルウィニア・ラポンティキから得た遺伝子の領域を含め、配列決定されたバンドはいずれもスクロース・イソメラーゼへの明確な相同性を示さなかった。配列決定されたバンドのほとんどは既知のグルコシダーゼ遺伝子に高い類似性を示した。

10

【0277】

従って、マッテスらにより特定された保存配列はスクロース・イソメラーゼに特異的ではなく、グルコシダーゼを含む他のクラスの酵素に共通するものであると結論された。結果として、これらの保存配列はPCR条件についての煩わしい実験なしにスクロース・イソメラーゼをクローニングするためには、そしてイソメラーゼクローンを識別するため他の手段によりスクリーニングするためには直接有用ではない。

【0278】

実施例 2

20

スクロースをイソマルチュロースに変換する細菌についての機能性スクリーニング

細菌の収集及び単離

細菌の試料は、新規な、糖代謝性細菌を生ずる可能性があるとして選択されたある範囲の環境の場所から収集した。特に、周期的な糖利用性を与えられる場所を選んだ。このような場所はイソマルチュロースなどの異性体を貯蔵するためスクロースを変換できる生物に有利であるかも知れない。約100の試料をサウスイースト・クイーンズランドの場所から得て、MIM液体培養中に収集した。MIMは0.2%のイソマルチュロース(6-O-D-グルコピラノシル-D-フラクトフラノース) プラスMM(0.5%の Na_2PO_4 、0.45%の KH_2PO_4 、0.1%の NH_4Cl 、0.05%の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.005%のクエン酸 $\text{Fe}^{+3}\text{NH}_4^+$ 及び0.0005%の CaCl_2 を含む最小培地)である。200rpmの回転振盪機上で室温で2時間増殖させた後、100 μl の試料をMSM(MMプラス4%スクロース)寒天平板上に塗布し、28で一晚増殖させた。この2段階濃縮の後、形態学的に異なるコロニーをLB又はMSMの別々の新鮮な平板に単離し、さらに増殖させた(全部で578コロニー)。単一コロニー単離物の純度を確実にするためのストリーキングの後、それを2連でレプリカ張りつけ平板及び5mLのSLB(4%のスクロースを含むLB)を含む30mLのユニバーサルチューブの両方に移し、好ましくはイソマルチュロース生産能力のより高い生物を明らかにする検定法でさらなる機能性スクリーニングを行なった。

30

【0279】

実施例 3

40

アニリン/ジフェニルアミン検定のための試料調製

5mLのSLB中で一晚増殖させた培養物を10,000xgの速度で室温で10分間遠心分離した。その上清を注意深く捨て、2mLのクエン酸/リン酸緩衝液(pH6)中の50%スクロース溶液を添加した。細胞を穏やかに再懸濁し、振盪機で28で48時間インキュベートした。インキュベーションの後、1.5mLの培養を新たなエッペンドルフ管に移し、100で15分間煮沸し、室温で16,000xgで20分間遠心分離した。ペレットに触れずに、その上清をアニリン/ジフェニルアミン検定及び毛细管電気泳動に用いるため新たな管に貯蔵した。

【0280】

実施例 4

50

アニリン/ジフェニルアミン検定

試料をワットマン# 1ろ紙の外端に沿って均等にスポットし、陽性対照（エルウィニア・ラポンティキからのもの）及び陰性対照（大腸菌からのもの）を中央にスポットした。試料をろ紙の上にスポットした後、呈色試薬を調製しながら、それを15分間乾燥させた。この試薬は次のように調製した。

- a. A. R. アセトンを用いて4 mLアニリンを100 mLとした。
- b. A. R. アセトンを用いて4 gのジフェニルアミンを100 mLとした。
- c. 85%オルトリン酸の20 mL。

【0281】

成分(a)及び(b)を、アニリン/ジフェニルアミンをそれぞれアセトンに混合し完全に溶解するのを確実にする排気室中で別々に調製し、その後これらをガラスピーカー中で混合した後上記の酸を添加した。この酸を最初に添加した後で、雲状の白い沈殿が形成する。これは激しく攪拌すると溶解し澄明な褐色の溶液となる。

【0282】

各ろ紙を「発色剤」に均等且つ同様に接触させるため、調製したろ紙を発色剤に通した。次いで、ろ紙を排気フード中でペーパータオル上で15分間乾燥させ、次に80の乾燥オーブン中で10分間加熱した。その結果（スポットの色）はデジタルカメラで記録又は写真にとった。

【0283】

イソマルチュロースが存在する場合は、この反応は、1,6-結合グルコサッカライドによる黄色ないし黄褐色のスポットを生じ、一方、グルコースは暗灰色のスポット、フラクトースは銀灰色のスポット、そしてスクロースは1,2-結合による紫ないし褐色のスポットを生じた。この色の強度は存在する糖の濃度に依存する。アニリン/ジフェニルアミン検定テストにより示された12の候補が578のコロニーから選択された。次に、選択された単離物から得られたイソマルチュロース産物を同定し、関連する代謝物を分離し同定するため毛細管電気泳動を用いる定量分析により確認した。

【0284】

実施例 5毛細管電気泳動のための試料調製

アニリン/ジフェニルアミン検定に使用した上清中のイオン物質はさらなる分析のため毛細管に入れる前に取り出す必要がある。これは、バリアンから購入した強力なカチオン交換（ポンド Elut-SCX, 1210-2013）カラム及び強力なアニオン交換（ポンド Elut-SAX, 1210-2017）カラムを通過させることにより行なった。これらのカラムは1容量のメタノール続いて1容量の水で濯ぐことにより予め条件化した。この濯ぎは注射器の助けをかりてカラムを強制的に通過させて行なった。

【0285】

細菌の上清を、無菌のミリ-Q (SMQ) 水で150倍に希釈した後、まずSCXカラムついでSAXカラムを通して処理した。希釈された上清の1 mLをSCXカラムに置いた。この試料は50 mLの注射器の助けをかりてカラムに強制的に通過させられた。その溶出液をSAXカラム中に直接集めた。この試料は同様に強制的に通過させられ、最終溶出液は1.5 mLエッペンドルフ管に集めた。

【0286】

実施例 6毛細管電気泳動

高性能毛細管電気泳動 (HPCE) による分離は、重水素ランプからの190~380 nm光源を利用し、試料検出のためベックマンP/ACE UV吸収検出装置(254 nm [±10 nm] フィルターホイール) と共にベックマンP/ACE 5000シリーズC.E.系を用いて行なった。

【0287】

毛細管は剥き出しの溶融シリカ毛細管で、I.D. 50 µm、O.D. 363 µm (50

スペルコ、カタログ番号 70550-U) であった。毛細管の全長は 77 cm であり、入口から検出器の窓までの長さは 69 cm であった。毛細管検出器の窓は、マッチを用いて毛細管の外側を焼き、メタノールで拭うことにより作成した。

【0288】

移動時間の再現性を最大にするため、毛細管を毎朝毎晩下記の濯ぎ手順を用いて再条件化した。即ち、SMQ で2分間、0.1M HCl で10分間、SMQ で2分間、0.1M NaOH で10分間、SMQ で2分間、0.5Mのアンモニアで15分間、そしてSMQ で2分間である。全ての溶液はSMQに溶解し、それで希釈し、0.45 μm ミクロポアフィルターを通して濾過した。

【0289】

UV吸光度に基づく直接検出によりアルカリ性硫酸銅電解質を用いて、細胞抽出物中に予想されるグルコース及びフラクトースを含む他の糖類に加え、スクロース及びその異性体であるイソマルチュロースの低濃度を分離し検出した。6mMの硫酸銅(II)及び500mMのアンモニアからなるpH11.6の電解質を用いて、アルカリ条件下銅(II)と糖類のキレート反応に基づき、中性糖の分離と直接UV検出の両方を達成した。

【0290】

電解質緩衝液(EB)は各日の最初に新たに作成し、使用前に15分間脱ガスした。条件化の後、毛細管をEBで15分間濯いだ。試料分離の間にも毛細管をEBで10分間濯いだ。バッチ操作のためのプログラムされたパラメータは表1に列挙してある。上記のように陽性及び陰性の対照は各試料に含められた。さらに、(スクロース及びイソマルチュロースからなる)標準品は最初の試料の前及び最後の試料の後に流し、EBの涸渇、毛細管の加熱等などの因子による移動時間の相違を測定し更正した。

【0291】

【表1】

キャピラリー電気泳動のバッチ走行のパラメータ

機能	期間	入口バイアル	出口バイアル	コメント
EB濯ぎ	5分	11	10	前向き, 20psi
加圧注入	5秒	試料バイアル	10	前向き, 20psi
分離	30分	12	1	25KV, 254nm
EB濯ぎ	5分	13	10	前向き, 20psi

【0292】

349J、14s及び68Jと名付けられた3個の単離物はスクロースをイソマルチュロースに変換する能力を有することが確認された。これらの3個の陽性単離物からの上清の希釈物に5mMスクロース、0.5mMイソマルチュロース、0.5mMのフラクトース又は0.5mMのグルコースのいずれかを別々に添加した後、再テストして、既知の糖との共移動に基づいて該試料中のピークの同定を確認した。

【0293】

実施例7

細菌のゲノムライブラリーの構築

コスミドベクター SuperCos1(ストラタジーン)を用いて、エルウィニア・ラボンティキのオーストラリア単離菌(受託番号WAC2928)及び単離細菌14S、68J及び349Jからゲノムライブラリーを構築した。このベクターは30から45kbの範囲のゲノムDNA断片を受け入れる。

10

20

30

40

50

【0294】

実施例 8

ゲノムDNA挿入体の調製

SuperCos 1ベクターにクローニングするためには大きな断片が必要であるから、ゲノムDNAはプリーファーら(1984, 「コスミドでのクローニング」、Advanced Molecular Genetics (ピューラー, A. 及びチミス, K. N. 編) ベルリン, Springer-Verlag, pp. 190-201)の方法にそのまま従って抽出し、消化前では高分子量(約150kb)のDNAを得た。釣り上げたDNAを65 で3時間又は4 で2日間振盪しないでTE緩衝液に溶解した。その分子の大きさは0.4%アガロースゲル上でチェックすることにより評価した。SuperCos 1ベクターのBamHI部位中にクローニングするため、染色体DNAを制限エンドヌクレアーゼSau3Aで部分的に消化した。一連のテストの部分消化を行なって、望みの範囲の大きさの挿入体を得るための条件を決定した。1 x Sau3A緩衝液を用いて135µL容量の反応液中の10µgのゲノムDNAを37 で5分間予め平衡化した。次に、0.5ユニットのSau3Aを添加し、0、5、10、15、20、25、30、40分の後にその一部(15µL)を採り、68 で20分間処理して該反応を直ちに停止させた。この部分標本を電気泳動のため0.5%アガロースゲルに載せた。最適消化時間は50kbの平均断片サイズとなるように決定した。この反応を675µLの総容量中50µgのゲノムDNAにまで規模拡大した。消化の後、13µLの0.5MEDTA, pH8.0を試料に添加した。サンプルから(1989)に従って、フェノール/クロロホルム抽出の後、1/10容量の酢酸ナトリウム(3M, pH5.2)及び2.5容量のエタノールの添加によりDNAを沈殿させた。このペレットを450µLの1 x CIAP緩衝液中に再懸濁し、このDNAを37 で60分間CIAP処理した。別のフェノール/クロロホルム抽出をこのCIAP処理DNAについて繰り返した。このDNAを最後に30µLのTE緩衝液に溶解して連結反応に供した。

10

20

【0295】

実施例 9

ベクターDNAの調製

20µgのSuperCos 1ベクターをXbaIにより37 で3時間消化した後、その反応液にµgDNA当たり1ユニットのCIAPを添加し、さらに1時間37 でインキュベートした。上記の方法を用いて、処理されたDNAのフェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なった。このXbaI/CIAP処理したSuperCos 1 DNAをTE緩衝液に再懸濁し、7.6kbのサイズを持つ一本直鎖状のバンドであることを確認するため0.8%アガロースゲル上でチェックした。このベクターDNAは、BamHIでさらに消化し、フェノール/クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿し、TE緩衝液に1µg/µLで再懸濁して連結反応に供した。

30

【0296】

実施例 10

DNAの連結反応及びパッケージング

2.5µgのSau3Aで部分消化された細菌のゲノムDNA及びXbaI/CIAP/BamHIで処理した1.0µgのSuperCos 1ベクターDNAを、15µL容量で、70 で5分間加熱した。次いで、2µLの10mMATP、2µLの10x連結用緩衝液及び1µLのT4DNAリガーゼ(インビトロゲン)を添加して総容量を20µLとした。室温で4時間インキュベートした後、連結反応を4で一晩行なった。連結の効率は0.8%アガロースゲル上で2µLの反応液をベクターと挿入体DNAの連結していない混合物に対して走行させることにより検討した。

40

【0297】

連結物の1/4は製造者の説明書に従ってイン・ビトロ・パッケージングされた(ギガパックIII ゴールド・パッケージング・エキストラクト, ストラタジーン)。

50

【0298】

宿主細胞である大腸菌 NM554 (ストラタジーン) を 0.2% マルトース及び 10 mM MgSO₄ を含む LB 培地中で 37 °C で振盪しながら増殖させ、1 個のコロニーから OD₆₀₀ 値で 1.0 まで増殖させた。この細胞を 4 °C で 2,000 × g で 10 分間遠心分離して収穫し、次いで 10 mM MgSO₄ 中に穏やかに再懸濁し、OD₆₀₀ 値で 0.5 とした。1.5 mL のチューブ中で、10 µL のパッケージしたコスミドライブラリーを 50 µL の NM554 細胞と混合した後、それを室温で 30 分間インキュベートし、次いで 400 µL の LB をそのチューブに添加した。抗生物質耐性を発現させるため、この細胞を 15 分ごとに 1 回軽く振りながら 37 °C でさらに 1 時間インキュベートした。この細胞を 30 秒間遠心分離し、100 µL の新鮮な LB ブロスに穏やかに再懸濁した。その 50 µL を 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 平板上に塗布した。

10

【0299】

実施例 1 1コスミドライブラリーの機能性スクリーニング

4 種のコスミドライブラリーのそれぞれから得た 600 コロニーの機能性スクリーニング、上述のようなアニリン/ジフェニルアミン検定及び CE を行なった後、エルウィニア・ラボンティキ由来の 4 個のクローン、14S 由来の 4 個のクローン、349J 由来の 3 個のクローン、及び 68J 由来の 3 個のクローンはスクロースからイソマルチュロースへの変換を行なう能力を示した。

20

【0300】

実施例 1 2サブクロニング及び配列決定

陽性コロニーからのコスミド DNA はサムブルックら (1989) の方法に従って調製された。スクロース・イソメラーゼを含む最小の機能性断片を見出すため、コスミド DNA のサブクローン挿入体を、EcoRI、BamHI 又は HindIII により別々に部分消化することにより調製した。EcoRI、BamHI 又は HindIII により新たに消化された pZero (商標) - 2 ベクター (インビトロゲン) を挿入体と共に連結に使用した。連結反応や大腸菌 Top 10 株への形質転換などの全てのクローニング手順はインビトロゲンにより提供された説明書に従った。各連結反応の 200 個の形質転換体を釣り上げ、塗布し、増殖させて、上記のようなアニリン/ジフェニルアミン検定による機能性スクリーニングに供した。機能的に陽性のサブクローンを CE 分析によりさらに確認した。CE で確認された陽性体からプラスミド DNA を単離し、EcoRI、BamHI 又は HindIII についての消化パターンをチェックした。コスミド挿入体からの消化断片をさらに pZero (商標) - 2 ベクター中にサブクロニングし、上記のように検定し、サイズを決定して、最小の挿入体を持つ機能性クローンを得て配列決定に供した。

30

【0301】

プラスミド挿入体はオーストラリアン・ゲノミック・リサーチ・ファシリティで ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction キットを用いて配列決定した。第一ラウンドの配列決定のために、pZero (商標) - 2 ベクターで利用可能な部位から出発するユニバーサル・プライマー (Sp6、T7、M13 の逆向き又は M13 前向き) を用いた。次いで、配列伸長のためには詭えたプライマーを使用した。配列決定は DNA の両方の鎖から行なわれ、確認された。

40

【0302】

実施例 1 3大腸菌中での 3 種のスクロース・イソメラーゼ遺伝子の発現

上記のように機能性スクリーニングによりクローニングされた遺伝子の配列に基づいて、3 個のスクロース・イソメラーゼ遺伝子を発現ベクター pET 24b 中にサブクローニ

50

ングするため、3対のプライマーを設計した。PCRにより、非コード領域及びリーダー配列を欠失させ、人為的開始コドンを組み込んだ。各前向きプライマーは1) 開始コドンを含み、2) 翻訳開始のためのプラント様文脈 (plant-like context) を創り、3) 容易にクローニングされ且つ遺伝子のオープン・リーディング・フレームと適合させるための BamHI 制限部位を組み込む。各逆向きプライマーは KpnI 制限部位を組み込み且つ停止コドンを含む。かかるプライマー塩基対は以下のものである。

エルウィニア・ラポンティキの前向き：

5' - g g a t c c a a c a a t g g c a a c c g t t c a g c a a t c a a a t g - 3' (配列番号：15)

10

14S 前向き：

5' - g g a t c c a a c a a t g g c a a c c g t t c a c a a g g a a a g t g - 3' (配列番号：17)

68J 前向き：

5' - g g a t c c a a c a a t g g c a a c g a a t a t a c a a a a g t c c - 3' (配列番号：13)

エルウィニア・ラポンティキの逆向き：

5' - a t a g g t a c c t t a c t t a a a c g c g t g g a t g - 3' (配列番号：16)

14S 逆向き：

5' - a t a g g t a c c t t a c c g c a g c t t a t a c a c a c c - 3' (配列番号：18)

20

68J 逆向き：

5' - a t a g g t a c c t c a g t t c a g c t t a t a g a t c c c - 3' (配列番号：14)

【0303】

高忠実DNAポリメラーゼ pfu (ストラタジーン) をPCRに用いた。そのPCR産物を TOPO (商標) TA クローニング (登録商標) キット (インビトロゲン) を用い、そのキットに付属の説明書に従って PCR (登録商標) 2.1ベクター中に直接クローニングした。

30

【0304】

PCR (登録商標) 2.1ベクター中の3個のスクロース・イソメラーゼ遺伝子を切断し、pGEM (登録商標) -3Zf (+) 中にクローニングし、次いで大腸菌 BL21 (DE3) 株で発現させるため pET 24bベクター (ノバゲン) 中にクローニングした。50 µg / mLのカナマイシンを含む5 mLのLB培地を BL21 (DE3) 細胞の培養に用いた。最初、構築当たり15の培養を設定した。細胞を225 rpmの振盪機で37で増殖させた。OD₆₀₀が1.000 ± 0.005の培養を構築物当たり6~10個選択し、さらに誘導を行なった。各培養から0.5 mLの試料を採取した後、該培養に最終濃度が1.0 mMとなるようにIPTGを添加した。この培養のインキュベーションをさらに3時間続けた。この誘導された培養物でOD₆₀₀が1.750 ± 0.005の培養物のみをさらに選択し、スクロース変換分析及びタンパク質測定に供した。構築物当たり3個の複製培養を分析した。選択されたIPTG誘導培養物のそれぞれから、1.5 mLの試料を採取してタンパク質の定量を行い、0.5 mLの試料でタンパク質のSDS-PAGEを行い、1.0 mLでスクロースからイソマルチュロースへの変換効率の定量を行なった。

40

【0305】

実施例14

タンパク質検定

細胞を遠心分離 (3,000 × g, 4, 10分間) により収穫した。この細胞ペレットを、50 mMのトリス - 塩酸 pH 8.0 及び2 mMのEDTAの50 µL中

50

に再懸濁し、次いで再遠心分離した。この細胞ペレットを液体窒素中で直ちに凍結し、 -70°C で貯蔵した。細胞を 0.5 mL の抽出緩衝液(20 mM のトリス-塩酸, $\text{pH } 7.4$, 200 mM の NaCl , 1 mM の EDTA , 1 mM のアジド, 10 mM の β -メルカプトエタノール)に懸濁し、次いで音波処理(プランソン・ソニファイア-450 ミクロプローブから 50 W で 9×15 秒パルス)により溶解し、遠心分離($10,000 \times g$, 4°C , 10 分)した。この上清を、Acrodisc(登録商標) 32 Super(登録商標) $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 膜フィルターユニット(ゲルマン・サイエンス)を通して濾過した。

【0306】

タンパク質は、ブラドフォード(1976, Anal. Biochem. 72: 248-254)に従い、ウシ血清アルブミンを標準として使用して検定した。上記のタンパク質抽出物 $10\text{ }\mu\text{L}$ を $90\text{ }\mu\text{L}$ の 0.15 M NaCl 及び 1 mL のクーマシー・ブリリアント・ブルー溶液(50 mL の 95% エタノール中の 100 mg のクーマシー・ブリリアント・ブルー G-250 + 100 mL の 85% リン酸 + 850 mL の SMQ)と混合した。 A_{595} を測定し、タンパク質含量を標準曲線から計算した。

【0307】

実施例 15

SDS-PAGE

SDSポリアクリルアミドゲルを重合させ、レムリ(1970, Nature 227: 680-685)により記載されたように行なった。タンパク質試料を、 $1 \times \text{SDS-PAGE}$ 試料緩衝液(25 mM のトリス-塩酸 $\text{pH } 6.8$, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v)の β -メルカプトエタノール, 10% (v/v)グリセロール, 0.005% (v/v)のプロモフェノール・ブルー)中 100°C で5分間加熱し、 $12,000 \times g$ で1分間遠心分離し、その上清をゲルに載せた。各試料は二つの隣接するレーンに載せた。走行後、ゲルの一つのレーンを 0.025% (w/v)クーマシー・ブルー R-250で染色し、 30% (v/v)メタノール, 10% (v/v)酢酸で脱染色し、次いで発現したスクロース・イソメラーゼを染色ゲルレーンの相対移動位置に相当する未染色レーンから切り出した。このゲル切片を抽出緩衝液に 4°C で一晩温和に攪拌しながら浸漬することにより、スクロース・イソメラーゼタンパク質を該ゲル切片から溶出した。溶出されたスクロース・イソメラーゼは上記のタンパク質定量法を用いて定量した。

【0308】

実施例 16

大腸菌で発現したスクロース・イソメラーゼによるスクロースからイソマルチュロースへの変換割合

1.0 mL の培養物を遠心分離し、次いでクエン酸/リン酸($\text{pH } 6.0$)緩衝化 50% スクロース溶液に再懸濁し、上記のCE分析によりイソマルチュロース変換について検定した。変換割合は、ベックマンP/A CE 5000シリーズC.E.システムのソフトウェアを用い、既知濃度の標準に対して規格化されたスクロースピーク面積とイソマルチュロースピーク面積から計算された。

【0309】

実施例 17

構築物DNAの調製

pET 24b ベクター中のスクロース・イソメラーゼ(SI)遺伝子挿入体を、サトウキビ細胞中で発現させるため、トウモロコシのubi-I遺伝子からのUbiプロモーター(クリステンセンとクエイル, 1996, Transgen. Res. 5: 215-218)とアグロバクテリウム nosターミネーター(ベパンら, 1983, Nature 304: 183-187)の間にさらにクローニングした。

【0310】

スクロース・イソメラーゼ遺伝子(pU3ZERw, pU3Z14s又はpU3Z68) 50

J) 及び aph A 構築プラスミド pEmuKN (選択可能なマーカーとして) を含むプラスミドをアルカリ抽出により単離し (サンプブックら, 1989, 上掲)、TE 緩衝液に溶解した。プラスミドの完全性及びゲノム DNA 又は RNA を含まないことはゲル電気泳動によりチェックし、濃度は分光光度法により測定した。このスクロース・イソメラーゼ (UbiSI) 遺伝子構築物及び選択可能なマーカー構築物をタングステン弾丸の上に共沈殿させ、サトウキビのカルス中に導入し、その後形質転換したカルスを選択し、パウアーら (1996, Molec. Breed. 2: 239-249) に記載された通りにトランスジェニック植物の再生を行なった。

【0311】

実施例 18

粒子砲撃

沈殿反応は、1.5 mL のマイクロフュージ管に 4 で次のものを添加することにより行なった。即ち、5 μ L の pEmuKN プラスミド DNA (1 mg/mL)、5 μ L の UbiSI プラスミド DNA (1 μ g/ μ L)、50 μ L のタングステン (バイオ-ラド M10, 100 μ g/ μ L)、50 μ L の CaCl₂ (2.5 M)、20 μ L のスペルミジン (100 mM の遊離の塩基) である。CaCl₂ とスペルミジンの添加の間の遅れを最小にして各試薬を添加した後、この調製物を直ちに混合した。次いで、このタングステンを氷の上に 5 分間置いた後、100 μ L の上清を除去し、管の底を管台と交差させて走らせることによりタングステンを再懸濁させた。各部分標本を除去する直前に粒子の再懸濁を行い、懸濁液を 15 分以内に、4 μ L / 砲撃の負荷で使用した。この反応の間に全ての DNA が沈殿していると仮定すると、これは 667 μ g タングステン / 砲撃における 1.3 μ g DNA / 砲撃と等価である。

【0312】

サトウキビ栽培変種 Q117 から得た胚形成性のカルスを砲撃に用いた。粒子は、パウアーら (1996, 上掲) により記載されたように真空室中の標的カルス中に注射器フィルターホルダーの圧縮により、ヘリウムガスのパルス中での直接連行により加速された。この組織を砲撃の前後の 4 時間の間浸透圧的に条件化された。抗生物質を含まない固体培地の上で 48 時間回収した後、砲撃されたカルスを選択、カルス発育及び植物再生のため 45 mg/L のゲネティシンを含む培地に移した。

【0313】

実施例 19

スクロース変換における形質転換体の機能性

独立のトランスジェニックカルスから試料を集めそして液体窒素の下で摩砕した。また、形質転換されていない Q117 カルスと Ubi-1uc で形質転換されたカルスを陰性対照として用いた。摩砕した組織を 4 で 16,000 \times g で遠心分離してペレット状の細胞破砕物とした。その上清を SMQ 中で 10 倍希釈し、次いで 20 分間煮沸した。変性したタンパク質を除去するためさらに遠心分離した後、その上清を Bond Elut (商標) SCX 及び SAX を通過させた。上記のように CE 分析を行なった。

【0314】

結果及び実施例に関する考察

スクロース・イソメラーゼ活性を持つ細菌 3 株を単離した

エルウィニア・ラポンティキ (受託番号 WAC2928) のオーストラリア単離菌をイソマルチュロース生産の陽性対照として用いた。この種はスクロースをイソマルチュロースに変換するスクロース・イソメラーゼ酵素を生産することが先に証明されていた (チーサム, 1985, 上掲) からである。濃縮法により単離された全部で 578 株の細菌から、3 株がアニリン / ジフェニルアミン検定でイソマルチュロースに特徴的な黄色の呈色反応を生じ、そして CE 検定でイソマルチュロース標準にそしてエルウィニア・ラポンティキのそれに相当する新規なピーク (図 1) を生じた。14S、68J 及び 349J と命名されたこれらの株は全て、唯一炭素源としてスクロース又はイソマルチュロースのいずれかを利用できるグラム陰性細菌である。3 株は全て 22 ~ 30 で良く増殖し、そし

10

20

30

40

50

て68Jは4でもゆっくりと増殖する。

【0315】

3個のスクロース・イソメラーゼ遺伝子を機能しうるようにクローニングし配列決定した
エルウィニア・ラポンティキ、14S、349J及び68Jのゲノム・コスミド・ライブラリーの大腸菌における機能性スクリーニングにより、スクロースをイソマルチュロースに変換できるクローンが得られた(図2)。pZerO(商標)-2ベクターへのサブクローニングと機能性スクリーニングを数サイクル行なった後、pZerO(商標)-2ベクター内の最小の機能性挿入体は3~5kbの範囲であった。

【0316】

エルウィニア・ラポンティキからの配列(図3)は1899bpのORFをコードする632のアミノ酸を示した(図5)。最初、鎖の配列決定はこのエルウィニア・ラポンティキのORFと99%同一性を有する349Jサブクローン中の遺伝子を明らかにしたので、349Jの配列決定を中止した。14Sからの配列は1797bpORFをコードする598アミノ酸を明らかにした。FASTAによるデータベース調査は、エルウィニア・ラポンティキからのSI遺伝子の1305bp及び14SからのSI遺伝子の全長がマッテスら(上掲)により開示されていたことを示した。68Jからの配列(図4)は1797bpのORFを持つ新規なSI遺伝子を示した。ヌクレオチドレベルでは、リーダー断片を含む又は含まない既知のスクロース・イソメラーゼと70%未満の同一性を有する(表2)。アミノ酸レベルでは、他のスクロース・イソメラーゼに対する同一性は、リーダーを含めて63.4%~70.6%、又はリーダーなしで64.6%~73.7%の間である。68Jに基づくSI遺伝子産物は598アミノ酸を有するタンパク質であり(図6)、分子量が69291であり且つ78の塩基性及び69の酸性アミノ酸残基により等電点が7.5である。アミノ酸配列の系統発生的分析により、68J SI遺伝子と既知の遺伝子間の関連性が示される。スクロース・イソメラーゼ遺伝子の全て及びグルコシダーゼは糖結合のためのドメインの保存された産物を共有する。その結果、マッテスら(上掲)により記載された保存された配列及び対応するプライマーはスクロース・イソメラーゼに特異的ではなく、異なる生物からの多くの非SI遺伝子を生ずるであろう。68JのSI遺伝子は、シュードモナス・メソアシドフィラの既知のSI遺伝子に対するものとほぼ同レベルのヌクレオチド同一性を種々のグルコシダーゼに対して示す。

10

20

30

【0317】

【表2】

68J、他のスクロース・イソメラーゼ、スクロース・イソメラーゼの断片、及びグルコシダーゼの特性の比較

配列 受託番号	種	注	ORF長さ (aa)		リーダー付のペプチド 類似性 (%)		リーダー無しのペプチド 類似性 (%)		ヌクレオチド同一性 (%)	
			1797	598	類似性	同一性	類似性	同一性	リーダー付	リーダー無し
UQ 68J		全長 UQ単離物	1797	598						
a45846 Sudz #1	プロタミノバクター ルブルム	全長	1890	629	81.1	70.3	83.0	73.3	68.2	69.4
a45854 Sudz #9	プロタミノバクター ルブルム (変異型)	全長	1803	600	81.5	70.6	83.4	73.7	68.2	69.4
a45856 Sudz #11	エンテロバクター スビーシーズ	全長	1794	597	80.7	68.5	82.6	71.4	67.3	68.5
UQ 281	エルウィニア ラポンティキ	全長 UQ単離物	1899	632	79.6	68.8	82.1	72.0	66.4	67.7
a45858 Sudz # 13	シュードモナス メソアシドフィラ	全長	1782	593	75.5	63.4	76.3	64.6	60.9	62.4
a45860 Sudz #16	シュードモナス メソアシドフィラ	全長	1704	567	非リーダー配列		70.4	52.4	---	56.4
a45850 Sudz # 3	エンテロバクター スビーシーズ	Sudz # 11 の PCR 断片 (非機能性)	471	157	--	--	89.1*	81.4*	--	75.4*
a45848 Sudz #2	エルウィニア ラポンティキ	UQ281同族体の N-末端領域 (非機能性)	1305	435	84.2*	74.9*	87.0*	78.5*	67.2*	72.4*
Bco16gI	バチルス セレウス	グルコシダーゼ	1677	599	非リーダー配列		68.2	48.8	---	53.2

* 68Jと不完全スクロース・イソメラーゼ遺伝子由来の非機能性断片との比較

Sudz # 配列は、ズドツッカー (マッテスら) の特許で開示されている。

10

20

30

40

50

【0318】

68J からのスクロース・イソメラーゼはテストしたイソメラーゼの中で最高の変換効率を示した

エルウィニア・ラポンティキ、14S、及び68JからのSI遺伝子と同じベクター(同じプロモーター、開始コドン及び終結配列)を用いて発現用に配列させた場合、タンパク質総含量又はスクロース・イソメラーゼの発現レベルにおいて有意の差はなく、総タンパク質の約10%であった(表3)。しかしながら、クローニングされた68J遺伝子産物によるスクロースからイソマルチュロースへの変換効率はエルウィニア・ラポンティキの10倍、そして14S遺伝子産物の18倍である(図7)。さらに、68Jのスクロース・イソメラーゼは14S及びエルウィニア・ラポンティキのそれよりも比較

的小さな割合のグルコース及びフラクトースを形成した。遺伝子発現及び酵素活性定量の間の他の因子は全て同一であった。即ち、遺伝子構築物との関連では同一の A T G 開始コドン、同一のベクター p E T 2 4 b 、同一の宿主細胞株 B L 2 1 (D E 3)、同一の培養条件、I P T G 誘導の前後における同一の細胞密度、スクロース変換に使用した細胞の量の同一、S D S - P A G E に負荷した総タンパク質量の同一、及び同一の総タンパク質含量を有する上清の同一容量を C E に載せたことである。実験は 3 回実施し、同一の結果を得た。

【 0 3 1 9 】

これらの実験結果はイソマルチュロース生産のための工業的適用における 6 8 J からのスクロース・イソメラーゼの高い能力を示す。

10

【 0 3 2 0 】

【 表 3 】

エルウィニア・ラポンティキ、1 4 S 又は 6 8 J[#] の S I 遺伝子を持つ大腸菌細胞中の総タンパク質含量及び推定的スクロース・イソメラーゼタンパク質含量

スクロース・イソメラーゼ	総タンパク質含量 (乾燥重量%)	スクロース・イソメラーゼ含量 (総タンパク質%*)
エルウィニア・ラポンティキ	15.97 ± 1.63	12.2 ± 1.5
14S	15.75 ± 1.38	11.8 ± 0.5
68J	16.12 ± 1.79	12.4 ± 1.2
対照	14.36 ± 2.04	1.9 ± 0.6

20

* 結果は 3 回試行からの平均 ± 標準誤差である。

* スクロース・イソメラーゼと共に移動した約 2 % タンパク質のバックグラウンドを含む

【 0 3 2 1 】

6 8 J スクロース・イソメラーゼを持つサトウキビトランスジェニックカルスもテストしたスクロース・イソメラーゼ遺伝子構築物の中で最高の変換率を示した

30

イソマルチュロースは、スクロース・イソメラーゼ遺伝子を発現するトランスジェニックサトウキビカルスの細胞抽出物中に見出されるであろう。テストした 3 種の 6 8 J トランスジェニック系統のうち 3 種が C E 電気記録器上でスクロースピークよりも高いイソマルチュロースピークを示した (図 8 A)。対照的に、テストした 1 4 S トランスジェニック系統 7 個のうち 3 個がスクロースピークよりも低いイソマルチュロースピークを示した (図 8 B)。イソマルチュロースはテストした他の 4 個の 1 4 S トランスジェニック系統のカルス中では検出できなかった。エルウィニア・ラポンティキ遺伝子を持つトランスジェニックカルスは 1 4 S 系統よりもさらに低いレベルのイソマルチュロースを示した (図 8 C)。

40

【 0 3 2 2 】

これらの結果は植物中でスクロース・イソメラーゼの発現によりイソマルチュロースの生産が可能であること、そしてそのためにスクロース・イソメラーゼ 6 8 J が高い能力を持つことを初めて明らかにするものである。

【 0 3 2 3 】

本明細書で引用された全ての特許、特許出願及び出版物の開示はその全体が参照により本明細書にインコーポレートされる。

【 0 3 2 4 】

本明細書における参考文献の引用はいずれもこのような参考文献が本出願の「先行技術」として利用可能であることを認めたものと解すべきではない。

50

【0325】

本明細書を通じて、その目的は、本発明を如何なる一実施態様又は特定の特徴の集合に限定することなく、本発明の好ましい実施態様を記述することであった。従って、当業者は、本開示に照らして、種々の修飾及び変更が本発明の範囲を逸脱することなく例示された特定の実施態様になされ得ることを認めるであろう。このような修飾や変更は全て特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】単離された細菌におけるイソマルチュロースへのスクロースの変換。ピーク：1 - スクロース、2 - イソマルチュロース、3 - フルクトース、4 - グルコース。「点から成る」電気泳動図はスクロース及びイソマルチュロースの標準である。

10

【図2】SuperCos (商標) ベクターにクローニングされたスクロース・イソメラーゼ遺伝子を発現する大腸菌におけるイソマルチュロースへのスクロースの変換。ピーク：1 - スクロース、2 - イソマルチュロース、3 - フルクトース、4 - グルコース。「点から成る」電気泳動図はスクロース及びイソマルチュロースの標準である。

【図3】エルウィニア・ラポンティキからクローニングされたスクロース・イソメラーゼのヌクレオチド配列。

【図4】68 J からクローニングされたスクロース・イソメラーゼのヌクレオチド配列。

【図5】エルウィニア・ラポンティキからクローニングされたスクロース・イソメラーゼの演繹アミノ酸配列。

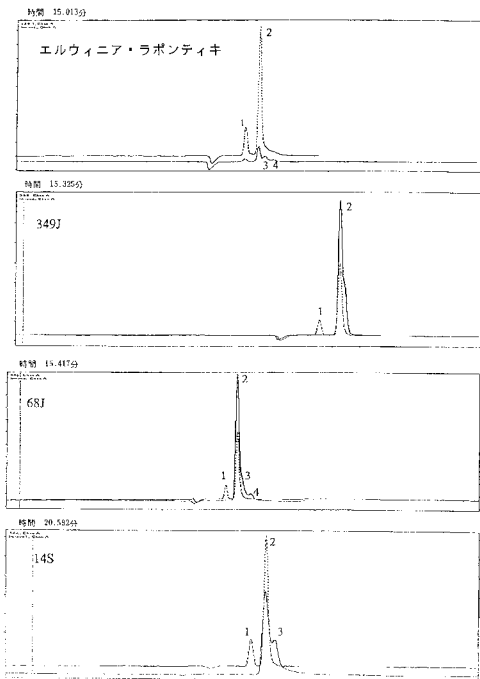
【図6】68 J からクローニングされたスクロース・イソメラーゼの演繹アミノ酸配列。

20

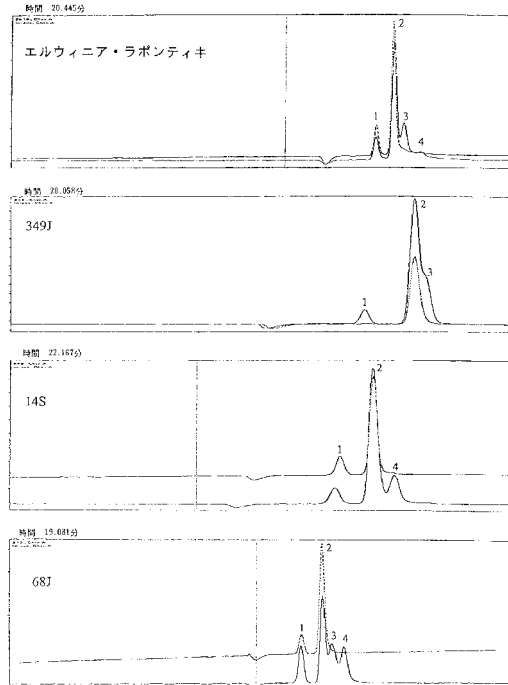
【図7】クローニングされたスクロース・イソメラーゼ遺伝子を発現する大腸菌によるスクロースからイソマルチュロースへの変換効率。結果は3回の反復から得られる平均値 ± 標準誤差である。

【図8】クローニングされたスクロース・イソメラーゼ遺伝子を発現する安定に形質転換されたサトウキビのカルスにおけるイソマルチュロースへのスクロースの変換。ピーク：1 - スクロース、2 - イソマルチュロース、3 - フルクトース、4 - グルコース。トレース：a - p U b i E r + 2 . 5 m M イソマルチュロース、b - p U b i E r、c - p U b i 1 4 S、d - 2 . 5 m M スクロース及びイソマルチュロースの標準、e - p U b i 6 8 J、f - p U b i 6 8 J + 2 . 5 m M イソマルチュロース。

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

1 ATGTCCCTCC AAGAATTGAA AGGGCTGTCT GCTATTTTTC TTGCAACCAC 50
 51 TTCTTCTGCC ACATCTTATC AGCCCTTCCAG TCGCCGGCCA GATACGCCCC 100
 101 CCTCACTCAC GPTTACGCAA TCAATSCCC TGCCACATG GTGAGACGAC 150
 151 GCTCTTTTTT ATCAGCTATA TCCAGGCTCA TTAAAGATA CGAATGGGGA 200
 201 TGGCAFTGGG GATTTAAACG GTATTATGTA GAATTTAGAC TATCTGAAGA 250
 251 AACTGGGTAT TGATGCCATT TGGATCACT CACATTACGA TTGCCCGAAT 300
 301 ACGGATAATG GTTATGACAT CCGCCATTAC CGTAAGATAA TGAAAGAATA 350
 351 CGTACGATG GAAGACTTG ACCGCTTAT TFCAGAAATG AAGAAGCA 400
 401 ATATGGTITG GATGATTGAT ATGTTTATCA ACCACACAG CGATCAGCAT 450
 451 GCGTGGTITG TTCAGAGCAA ATGCTGTAG AACACCCCT ACAGGGACTA 500
 501 TTACTTCTGG CGTACGCTTA AGGATGGCCA TGCCCCCAAT AACTTCCCT 550
 551 CCTCTTCTGG TGGCTCAGCC TGGGAAAGAG ACGATAAATC AGGCCAGTAT 600
 601 TACTCTCATT ACTTTGCCAA ACAGCAACC GACCTCAACT GGCACAATCC 650
 651 CAAAGTCCGT CAAGACCTGT ATGACATGCT CGCTTCTCG TTAGATAAAG 700
 701 CGGTTTIMGG TTACCGCTT GATACCGTTC CCCTTCTCG AAAAAATCCG 750
 751 AACTTCCCTG ACCTTAGCCA ACAGCAGTTA AAAAAATTCG CCGAGGAATA 800
 801 TACTAAGGCT CTTAAATTC ACAGTACTCT GATGAAATG AACAGAGAAG 850
 851 TATATCCCA CTATGATTC GCACTCAGG GGAATATTT TGGGTTCCCT 900
 901 CTGGAFAAT CGATTAAGCT TTTCGATCCG CGTAGAATG AATTAATAT 950
 951 ACGTTFACG TTTGATCTGA TCAGACTCGA TCGTAGTCT GATGAAGAT 1000
 1001 GCGCGCAAAA AGACTGGACG CTTTGGCAGT TCGGAAAAT TGTGATAG 1050
 1051 GTTGACAAA CGGCAGGAGA CTTTGGGTTG AATGCTTTT TCTTAGACAA 1100
 1101 TCACGACAA CCGCGCGCCG TTCTCCACTT TGGTATGAT CGACCACAT 1150
 1151 GCGCGGAGCA TCGCGGAAA GCACTGGCAA CATTGACGCT GACCCAGCT 1200
 1201 GCACGCGUST TTACTATCA GGGTTCAGAA CTGGTATGA CCAATATCC 1250
 1251 CTTTAAAAA ATCGATGTT TTGATATGAT AGAGTGGAMA CGTTTTGSC 1300
 1301 AGACTACGT TGAACACGCG AAGTGAAG CTGAGGAAT CTTTANAC 1350
 1351 GFAAGCAAAA CAGGCGTTGA TACAGCAGA ACCCCCTCC ACTGGATCC 1400
 1401 AAGCAAAAAT GCGGCGTTA CAGCGGAAC CCGTGGTGA AAAATCAAT 1450
 1451 CCAATTATA AGAATCAAC AGCGGAGATC AGATTAACAA TCCAATTTCC 1500
 1501 GTATTAACT AITATGAAA GCTCAATTAAC ATTTGCCACC ACATCCCTGC 1550
 1551 CTTAACCTAC GGCAGTTATA TTGATTTAGC TCTGACAC AATTCACTCT 1600
 1601 ATGCTTACG TCGAAGCTTT GCGGCTGAAA AATATCTTGT GTCATTAAT 1650
 1651 TTTAAGAA AGTGTATCA CTACACCTG CTTGGGAT TATCCATCAA 1700
 1701 TAAGTGATT ACTGAAACA ACAGTCAAC TATTTGAT AAAATGAG 1750
 1751 TAGAAGATCC TGTGGGCTC ACAAGCGTIT GTAGCCCTT CCGGCTCAA 1800
 1801 AAAAGCCCTG GCGACCGGG TTACTCTCT GCCATTGA TTXGTTCTT 1850
 1851 CCCCCTTIT TTGCTTAT ACAGGGGCA CATCCAAGG TTAAGTAA 1899

【 図 4 】

1 ATGTTTUTTA ATGGATTAA GACAGTATT GCTCTGACTA TGGCAAGCTC 50
 51 GTTTTATCTT GCGCGAGCC CGTAACTAA GCCATCGACC CCTATTGCCG 100
 101 CAGCAATAT ACAAAAGTCC GCTGATTTTC CCATTTGGT GAAACAGGCA 150
 151 GTATTTTACC AGATTTATCC CCCTCATTT AAGATAGCA ATGGTATG 200
 201 TATCCGCTAT ATCCCGCTA TCAATGAAA ACTGACATAT TTAARATCC 250
 251 TGGGAGTGA TCTTATCTG ATAAACCCGC ACTATGATC TCTTAACCC 300
 301 GACAATGTT ACGATATTAG TGATATTGT AAAATCAGA AGGATGACG 350
 351 CAGCATGCT GACTTTGACC GTCTGTGTC GAAATGAAT AAACCTGGA 400
 401 TGCCCTGAT GATTGATAT GTTATCAAT ATACCAGCA TCGTCCGCC 450
 451 TGGTTTGGC AGAGCCGTT AGTAAAGAT AATCCTTACC GCGCATTTA 500
 501 TTTCTGGCT GATGTTAAG AGGACAGGC TCCCAATAC TATCCCTCTT 550
 551 TCTTGGGCT TCGACCTGC CACTCGATA AACGACTGA CAGTATTAT 600
 601 CTGACTATT TTGCCACCA GCGCCGCTG CTGAATGCG ATAACCCAAA 650
 651 AGTTGGGCT GACTCTAG ATATTCTCG TTCTGGCTG GAFAAAGCG 700
 701 TATCCGACT ACGTTTGTG ACCGTTGCTA CTTTCTCAA AATTTCTGG 750
 751 TTCCCGACC TGTCAAAGC GCAGCTGAC AATTTTGGC AAGCTTATAC 800
 801 TGAGGGCCG AATATTCATA AATATATCA TGAATGAC CCGCAGGATC 850
 851 TGTCTAATA TAATTTGCC ACCGCTGGT AAATCTTCCG TGTGCCAGT 900
 901 AGTCTATGC CGATTTATTT TGACCGGCG CTTGAGAAC TCAATTTGC 950
 951 TTTCTCTTT GATTTGATA GCGTGGATC TTATCCGAT CAKCCCTGC 1000
 1001 GTCCTAACC ATGGACATTA AGCCATTTCT CTGAAATAT CTTCTGACT 1050
 1051 GACCGTCCG CCGTGAAT TGGCTGAC GCCTTTTCC TTGATAACCA 1100
 1101 TGATAACCG CCGCAGTCT CACACTTTC TGACGACAG CCACATGGC 1150
 1151 GCGAACGCT GGCNAAAGCA CTGCCAACG TCTGTCTGAC CAGCGCTGC 1200
 1201 ACGCCGTTA TCTTTCAGG GCGGAGTTC GGAATGACTA ATTACCCCTT 1250
 1251 TAAAAATA GAGGAATTT ATGATATTGA GGTAAAGGC TTTCCGAGC 1300
 1301 ACTATGAC CAGGAAAATA GTAAACGCTC CTGAATTTT ACAGGAGGT 1350
 1351 CGATGACCA GCGCGATA CAGCGAACA CCAATGCGT GGAACGCTC 1400
 1401 TGTAAATGC GATTCACCC AGGCAACCC CTGTTTCC CTAATGCCA 1450
 1451 ACTATAAGCA AATCAATGCC CCGAGGNGG TGATAAAC CCACTGCTA 1500
 1501 TCAATTAAT CCGTCAACT GATCAACTC GCGCACCA CA TCCCGAGCT 1550
 1551 GACGAGTGT GAATACCGT ATCTCGATCC CCGAATAAC CAGTCTTATG 1600
 1601 CTAATACCCG TATCTGAT AATGAAAAT ATCTGCTGT AGTAAATTT 1650
 1651 AAACCTGAG AGCTGATTA CGCTTSCCA GATAACTGA CTAATGCCAG 1700
 1701 CATCTCTG GAAATGCTC ACCAACCTC ACTGCAAGAA AATGCTCCA 1750
 1751 CCGTACTCT TCTCCGTC CAGCCGGA TCTATAAGCT GAACTGA 1797

【 図 5 】

1 MSSQELKAAV AIFLATTFA TSYQACSAGP DTAPSLTVQQ SNALPTWWKQ 50
 51 AVFYQVYPR FKTNGDGI DINGIENLD YLKKLGLDAI WINPHYDSPN 100
 101 TDNGYDIRY RKIMKEYGM EDPDLISEM KKRMLRLMD IVINHTSDQH 150
 151 AWFVQSKSK NPNRYDYFW RDGKDGHAP NYPSPFGSA WEKDDKSGQY 200
 201 YLHYFAKQFP DLNWDNFKVR QDLYMLRFW LDKQVXGLRF DTVAYSKIP 250
 251 NFPDLSQQQL KNFAEYTKG PKIHDVNM NREVLSHYDI ATAGEIPQVP 300
 301 LDKSKIFDR RNELNIAFT FDLIRLDRDA DERWRKDWI LSQFKRIVDK 350
 351 VDQTAGEYCW NAFPLDNHDN PRAVSHFGDD RPQWRHAHA ALATLTLQR 400
 401 ATPPIYQGS LGMINYPFK ILDVDDVEK GFWDYVETG KVKAEPFLXN 450
 451 VROTSRDNR TPQWDASKN AGFTSTPWL KINPNYKEIN SADQINPNNS 500
 501 VFNYYRKLIN IRHDIPALTY GSYLDLADN NSVYAYTRF GBKYLVLVIN 550
 551 FKBEVMHYTL PGDSLINKEI TENNSHTIV KNDVEDPRGA TSCVSPFQAQ 600
 601 KRFGDGYSA AHSIRFLPRF PASYRDIHA FK* 632

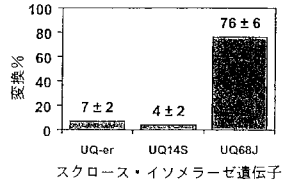
【 図 6 】

```

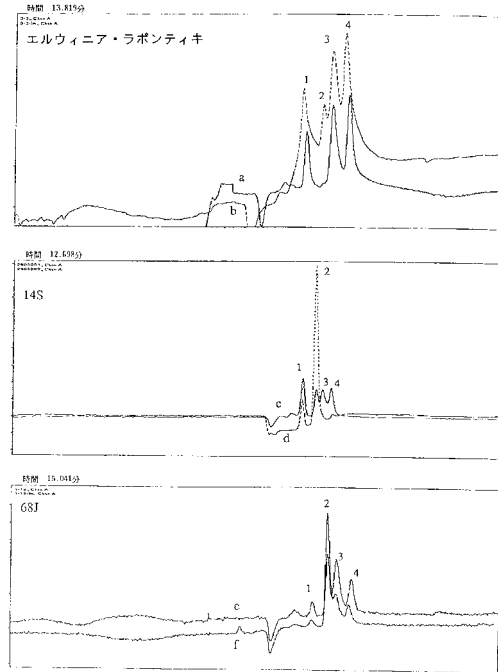
1  MPINGFKTVI  ALTMASFFYL  AASPLTKPST  PIAATNIQKS  ADFPIWKKQA  50
51 VFYQIYFRSF  KDSNGDGIGD  TPGIIEKLDY  LRMLGVDAIW  INPHYESPNT  100
101 DNGYDISDYR  KIMKEYGSMA  DFDRLVAEMN  KRGMRLMIDI  VINHTSDRHR  150
151 WPCQSRSGKD  NPYRDYYFWR  DGKQQAQFNN  YPSFPGGSAM  QLDKQIDQYY  200
201 LHYPAPQQFD  LNWDNPKVRA  ELYDIIRFWL  DKGVSGLRFD  TVATFSGIPG  250
251 FPDLSKAQLK  NFAEAYTEGP  NIHKYIHEMN  RQVLSKYNVA  TAGRIFGVPV  300
301 SAMPDYFDRR  REELNIAFTF  DLIRLDKRPD  QRWRKPKWTL  SQFRQVISQT  350
351 DRAAGEFGWN  APFLNHDNP  RQVSHFGDDS  PQWRERSAKA  LATLLLTORA  400
401 TPFIFCGABL  GMTNYPFKNI  EEFDDIEVKG  FWNDYVASKG  VNAAEFLQEV  450
451 RMTSRDNRRT  PMQWNVSVNA  GPTQGGKPFH  LWENYKQINA  ARXVNFQDSV  500
501 FSYRQLINL  RHQIPALISG  EYRDLDKQNN  QVYAYTRILD  NEKYLWVWN*  550
551 KPEQLHYALP  DNLTIASSLL  ENVHQPSLQE  NASTLTLAPW  QAGIYKLN*   598

```

【 図 7 】



【 図 8 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/18603 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 15/61, 15/31, 9/90, C12K 13/00, A01H 1/00
- (21) International Application Number: PCT/AU01/01084
- (22) International Filing Date: 29 August 2001 (29.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: PQ 9768 29 August 2000 (29.08.2000) AU
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND [AU/AU]; St Lucia, Queensland 4072 (AU).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): BIRCH, Robert, George [AU/AU], 24 Yarrimbah Street, Jundalee, Queensland 4074 (AU).
- (74) Agents: ARGAET, Victor, Peter et al., Davies Collison Cave, Level 3, 303 Coronation Drive, Milton, Queensland 4064 (AU).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/18603 A1

(54) Title: ISOMALTULOSE SYNTHASE

(57) Abstract: Isomaltulose synthase (sucrose, EC 5.4.99.11) converts sucrose to isomaltulose (6-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose). The enzyme has been isolated from *Erwinia rhapsodica* and an additional bacterial isolate 681. Also disclosed are methods for converting sucrose to isomaltulose, transformation of plants and bacteria such that they convert sucrose, methods of detection of isomaltulose synthase from samples and methods of identifying bacteria with isomaltulose synthase from environmental samples.

**NOVEL POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES AND USES
THEREFOR**

FIELD OF THE INVENTION

THIS INVENTION relates generally to enzymes that convert sucrose to isomaltulose. More particularly, the present invention relates to novel sucrose isomerases, to polynucleotides encoding these sucrose isomerases, to methods for isolating such polynucleotides and to nucleic acid constructs that express these polynucleotides. The invention also relates to cells, particularly transformed bacterial or plant cells, and to differentiated plants comprising cells, which contain these nucleic acid constructs. The invention further relates to the use of the polypeptides, polynucleotides, cells and plants of the invention for producing isomaltulose.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The acariogenic sugar substitute, isomaltulose (palatinose), is a hetero-disaccharide composed of glucose and fructose linked together through an α -1,6-glucosidic linkage. Isomaltulose can be produced on a large scale by enzymatic rearrangement of sucrose using the bacterial enzyme sucrose isomerase.

Initially, large-scale production of isomaltulose was facilitated using immobilised bacterial cells that naturally produce sucrose isomerase enzymes (*eg.* species of *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici* and *Serratia plymuthica*). Higher yields of isomaltulose have been achieved recently using recombinant techniques. In this respect, Mattes *et al.* (U.S. Patent Serial No. 5,786,140) disclose isolated polynucleotides encoding partial or full-length sucrose isomerase enzymes from *Protaminobacter rubrum* (CBS 547,77), *Erwinia rhapontici* (NCPPB 1578), the microorganism SZ 62 (*Enterobacter* species) and the microorganism MX-45 (FERM 11808 or FERM BP 3619).

Mattes *et al.* also disclose conserved amino acid sequences from which degenerate oligonucleotides could be designed for cloning sucrose isomerase-encoding polynucleotides by the polymerase chain reaction (PCR).

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 2 -

SUMMARY OF THE INVENTION

In work leading up to the present invention, degenerate oligonucleotides, based on the conserved amino acid sequences disclosed by Mattes *et al.*, were used to amplify sucrose isomerase-encoding polynucleotides by PCR from *Erwinia rhapontici* (Accession Number WAC2928), and from 30 independent sucrose-isomerase negative bacterial isolates. The PCR amplification yielded multiple DNA products from most tested bacteria. However, these products were found not to encode sucrose isomerase. Nucleic acid sequence analysis of 12 separate PCR products, including 6 products amplified from *Erwinia rhapontici*, revealed that none of the DNA products displayed significant sequence homology to sucrose isomerase genes. Instead, most of these products showed high sequence homology to known glucosidase genes. It was therefore concluded that the conserved sequences of Mattes *et al.* were not specific to sucrose isomerases, but were common to other classes of enzymes including glucosidases.

Notwithstanding the above, the present inventors developed a novel functional screening assay for the isolation and characterisation of novel polynucleotides encoding isomaltulose-producing sucrose isomerase enzymes. Several such novel polynucleotides were cloned using this assay and some of these were found to encode polypeptides with superior sucrose isomerase activity relative to those disclosed by Mattes *et al.* Comparison of the deduced polypeptide sequences with known sucrose isomerase or glucosidase polypeptide sequences revealed a number of conserved motifs, which are unique to sucrose isomerases, and which could therefore be used *inter alia* for designing sucrose isomerase-specific oligonucleotides. Such oligonucleotides are advantageous in that they provide for the first time facile isolation of sucrose isomerase-encoding polynucleotides using nucleic acid amplification techniques.

The inventors have reduced the above discoveries to practice in new isolated molecules, recombinant cells and plants for producing isomaltulose as described hereinafter.

Accordingly, in one aspect of the invention, there is provided a method for isolating novel polynucleotides encoding isomaltulose-producing sucrose isomerase enzymes, said method comprising:

- (a) obtaining an environmental sample from a location in which organisms, capable of converting sucrose to isomaltulose, have a selective advantage;

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 3 -

- (b) screening for organisms producing isomaltulose from sucrose; and
- (c) isolating polynucleotides encoding isomaltulose-producing sucrose isomerase enzymes from isomaltulose-producing organisms.

5 Preferably, the method further comprises selecting or otherwise enriching for dual sucrose- and isomaltulose-metabolising organisms which are capable of using both sucrose and isomaltulose as carbon sources for growth.

Suitably, the screening utilises an assay that quantifies isomaltulose production by an organism.

10 In another aspect of the invention, there is provided an isolated polypeptide, or a biologically active fragment thereof, or a variant or derivative of these, said polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 2 or 4 comprises a contiguous sequence of amino acids contained within SEQ ID NO: 26 or variant thereof.

15 Suitably, the variant has at least 75%, preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90% and still more preferably at least 95% sequence identity to any one of the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, and 26.

Suitably, the biologically active fragment is at least 6 amino acids in length.

20 Preferably, the variant comprises the consensus sequence set forth in any one or more of SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24 or variant thereof.

Suitably, said consensus sequence variant has at least 80%, preferably at least 85%, more preferably at least 90%, and still more preferably at least 95% sequence identity to any one of the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24.

25 In another aspect, the invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide, fragment, variant or derivative as broadly described above. Preferably, the polynucleotide comprises the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9, or a biologically active fragment thereof, or a polynucleotide variant of these, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 1, or 3 comprises a

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 4 -

contiguous sequence of nucleotides contained within SEQ ID NO: 25 or polynucleotide variant thereof.

In one embodiment, the polynucleotide variant has at least 60%, preferably at least 70%, more preferably at least 80%, and still more preferably at least 90% sequence identity to any one of the polynucleotides set forth in SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9.

In another embodiment, the polynucleotide variant is capable of hybridising to any one of the polynucleotides identified by SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9 under at least low stringency conditions, preferably under at least medium stringency conditions, and more preferably under high stringency conditions.

Suitably, the biologically active fragment is at least 18 nucleotides in length.

Preferably, the polynucleotide variant comprises a nucleotide sequence encoding a consensus sequence set forth in any one or more of SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24 or variant thereof.

Suitably, the consensus sequence is encoded by a nucleotide sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36 or nucleotide sequence variant thereof.

In one embodiment, the nucleotide sequence variant has at least 60%, preferably at least 70%, more preferably at least 80%, and still more preferably at least 90% sequence identity to any one of the sequences set forth in SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36.

In another embodiment, the nucleotide sequence variant is capable of hybridising to any one of the sequences identified by SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36 under at least low stringency conditions, preferably under at least medium stringency conditions, and more preferably under high stringency conditions.

In another aspect, the invention features an expression vector comprising a polynucleotide as broadly described above wherein the polynucleotide is operably linked to a regulatory polynucleotide.

In a further aspect, the invention provides a host cell containing a said expression vector.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 5 -

Suitably, the host cell is a bacterium or other prokaryote, or a plant cell or other eukaryote.

Preferably, the plant is sugarcane (*Saccharum* sp.) or another species capable of synthesising and/or accumulating sucrose (e.g. sugar beet).

5 The invention also features a method of producing a recombinant polypeptide, fragment, variant or derivative as broadly described above, comprising:

– culturing a host cell containing an expression vector as broadly described above such that said recombinant polypeptide, fragment, variant or derivative is expressed from said polynucleotide; and

10 – isolating the said recombinant polypeptide, fragment, variant or derivative.

In another aspect, the invention provides a method of producing a biologically active fragment of a polypeptide as broadly described above, comprising:

– detecting sucrose isomerase activity associated with a fragment of a polypeptide according to any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, which indicates that said fragment is a said biologically active fragment.

15

In a further aspect, the invention provides a method of producing a biologically active fragment as broadly described above, comprising:

– introducing a polynucleotide from which a fragment of a polypeptide according to any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10 can be produced into a cell; and

20 – detecting sucrose isomerase activity, which indicates that said fragment is a said biologically active fragment.

In yet a further aspect, the invention provides a method of producing a polypeptide variant of a parent polypeptide comprising the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or biologically active fragment thereof, comprising:

25 – producing a modified polypeptide whose sequence is distinguished from the parent polypeptide by substitution, deletion or addition of at least one amino acid; and

– detecting sucrose isomerase activity associated with the modified polypeptide, which indicates that said modified polypeptide is a said polypeptide variant.

30 In a further aspect, the invention contemplates a method of producing a polypeptide variant of a parent polypeptide comprising the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or biologically active fragment thereof, comprising:

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 6 -

- producing a polynucleotide from which a modified polypeptide as described above can be produced;
- introducing said polynucleotide into a cell; and
- detecting sucrose isomerase activity, which is indicative of the modified polypeptide being a said polypeptide variant.

According to another aspect of the invention, there is provided a method for producing isomaltulose from sucrose, said method comprising contacting sucrose or a sucrose-containing substrate with the polypeptide, fragment, variant or derivative as broadly described above, or with a host cell as broadly described above, for a time and under conditions sufficient to produce isomaltulose.

In another aspect, the invention resides in an antigen-binding molecule that is immuno-interactive with said polypeptide, fragment, variant or derivative according to the present invention.

Preferably, said antigen-binding molecule is immuno-interactive with any one of the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24 or variant thereof.

Another aspect of the invention provides a method for detecting a specific polypeptide or polynucleotide, comprising detecting the sequence of:

- (a) SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or biologically active fragment thereof at least 6 amino acids in length, or variant of these, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 2 or 4 comprises a contiguous sequence of amino acids contained within SEQ ID NO: 26 or variant thereof; or
- (b) a polynucleotide encoding (a).

In a preferred embodiment, the sequence of (b) is selected from SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9, or a biologically active fragment thereof at least 18 nucleotides in length, or a polynucleotide variant of these, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 1, or 3 comprises a contiguous sequence of nucleotides contained within SEQ ID NO: 25 or polynucleotide variant thereof.

According to another aspect of the invention, there is provided a method of detecting a sucrose isomerase in a sample, comprising:

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 7 -

- contacting the sample with an antigen-binding molecule as broadly described above; and
- detecting the presence of a complex comprising the said antigen-binding molecule and the said polypeptide, fragment, variant or derivative in said contacted sample.

5 In yet another aspect, there is provided a method for detecting a polypeptide, fragment, variant or derivative as broadly described above, comprising:

- detecting expression in a cell of a polynucleotide encoding said polypeptide, fragment, variant or derivative as broadly described above.

10 Still a further aspect of the invention provides a probe comprising a nucleotide sequence which is capable of hybridising to at least a portion of a nucleotide sequence encoding SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10 under at least low stringency conditions.

15 In a preferred embodiment, the probe comprises a nucleotide sequence which is capable of hybridising to at least a portion of SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9 under at least low stringency conditions.

According to another aspect of the invention, there is provided a transformed plant cell containing an expression vector as broadly described above.

In a preferred embodiment, the plant is sugarcane (*Saccharum* sp.).

20 In a still further aspect, the invention provides a differentiated plant comprising plant cells containing an expression vector as broadly described above.

In yet another aspect, the invention provides isomaltulose harvested from a differentiated plant as broadly described above.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 8 -

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Conversion of sucrose to isomaltulose in isolated bacteria. Peaks: 1 – sucrose, 2 – isomaltulose, 3 – fructose, 4 – glucose. “Dotted” electrophoretogram is sucrose and isomaltulose standards.

5 Figure 2. Conversion of sucrose to isomaltulose in *E.coli* expressing sucrose isomerase genes cloned in SuperCos™ vector. Peaks: 1 – sucrose, 2 – isomaltulose, 3 – fructose, 4 – glucose. “Dotted” electrophoretogram is sucrose and isomaltulose standards.

Figure 3. Nucleotide sequence of sucrose isomerase cloned from *Erwinia rhapontici*.

10 Figure 4. Nucleotide sequence of sucrose isomerase cloned from 68J.

Figure 5. Predicted amino acid sequence of sucrose isomerase cloned from *Erwinia rhapontici*.

Figure 6. Predicted amino acid sequence of sucrose isomerase cloned from 68J.

15 Figure 7. Efficiency of conversion from sucrose to isomaltulose by *E. coli* expressing cloned sucrose isomerase genes. Results are means \pm standard errors derived from 3 replications.

20 Figure 8. Conversion of sucrose to isomaltulose in stably transformed sugarcane calli expressing cloned sucrose isomerase genes. Peaks: 1 – sucrose, 2 – isomaltulose, 3 – fructose, 4 – glucose. Traces: a – pUbi Er + 2.5mM isomaltulose, b – pUbi Er, c – pUbi 14S, d – 2.5mM sucrose and isomaltulose standards, e – pUbi 68J, f – pUbi 68J+ 2.5mM isomaltulose

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCES: SUMMARY TABLE

TABLE A

Sequence ID Number	Sequence	Length
SEQ ID NO: 1	Full-length sucrose isomerase coding sequence from <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	1899 bases
SEQ ID NO: 2	Full-length sucrose isomerase polypeptide sequence from <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	632 residues
SEQ ID NO: 3	Polynucleotide sequence encoding mature sucrose isomerase from <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	1791 bases
SEQ ID NO: 4	Mature sucrose isomerase polypeptide sequence from <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	596 residues
SEQ ID NO: 5	Signal peptide coding sequence relating to sucrose isomerase from <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	108 bases
SEQ ID NO: 6	Signal peptide relating to sucrose isomerase from <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	36 residues
SEQ ID NO: 7	Full-length sucrose isomerase coding sequence from bacterial isolate 68J	1797 bases
SEQ ID NO: 8	Full-length sucrose isomerase polypeptide sequence from bacterial isolate 68J	598 residues
SEQ ID NO: 9	Polynucleotide sequence encoding mature sucrose isomerase from bacterial isolate 68J	1698 bases
SEQ ID NO: 10	Mature sucrose isomerase polypeptide sequence from bacterial isolate 68J	565 residues
SEQ ID NO: 11	Signal peptide coding sequence relating to sucrose isomerase from bacterial isolate 68J	99 bases
SEQ ID NO: 12	Signal peptide relating to sucrose isomerase from bacterial isolate 68J	33 residues

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 10 -

Sequence ID Number	Sequence	Length
SEQ ID NO: 13	5' oligonucleotide primer for amplification of 68J isolate	34 bases
SEQ ID NO: 14	3' oligonucleotide primer for amplification of 68J isolate	30 bases
SEQ ID NO: 15	5' oligonucleotide primer for amplification of <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	35 bases
SEQ ID NO: 16	3' oligonucleotide primer for amplification of <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	28 bases
SEQ ID NO: 17	5' oligonucleotide primer for amplification of 14S isolate	35 bases
SEQ ID NO: 18	3' oligonucleotide primer for amplification of 14S isolate	30 bases
SEQ ID NO: 19	Sucrose isomerase consensus sequence	7 residues
SEQ ID NO: 20	Sucrose isomerase consensus sequence	10 residues
SEQ ID NO: 21	Sucrose isomerase consensus sequence	6 residues
SEQ ID NO: 22	Sucrose isomerase consensus sequence	6 residues
SEQ ID NO: 23	Sucrose isomerase consensus sequence	13 residues
SEQ ID NO: 24	Sucrose isomerase consensus sequence	16 residues
SEQ ID NO: 25	Polynucleotide sequence encoding novel carboxyl terminal portion of sucrose isomerase from <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	594 bases
SEQ ID NO: 26	Polypeptide sequence of novel carboxyl terminal portion of sucrose isomerase from <i>Erwinia rhapontici</i> (Accession No. WAC2928)	197 residues
SEQ ID NO: 27	Sub-sequence of SEQ ID NO: 1 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 19	21 bases
SEQ ID NO: 28	Sub-sequence of SEQ ID NO: 1 encoding consensus	30 bases

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 11 -

<i>Sequence ID Number</i>	<i>Sequence</i>	<i>Length</i>
	sequence set forth in SEQ ID NO: 20	
SEQ ID NO: 29	Sub-sequence of SEQ ID NO: 1 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 21	18 bases
SEQ ID NO: 30	Sub-sequence of SEQ ID NO: 1 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 23	39 bases
SEQ ID NO: 31	Sub-sequence of SEQ ID NO: 1 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 24	48 bases
SEQ ID NO: 32	Sub-sequence of SEQ ID NO: 7 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 19	21 bases
SEQ ID NO: 33	Sub-sequence of SEQ ID NO: 7 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 20	30 bases
SEQ ID NO: 34	Sub-sequence of SEQ ID NO: 7 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 21	18 bases
SEQ ID NO: 35	Sub-sequence of SEQ ID NO: 7 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 23	39 bases
SEQ ID NO: 36	Sub-sequence of SEQ ID NO: 7 encoding consensus sequence set forth in SEQ ID NO: 24	48 bases
SEQ ID NO: 37	Geysen library peptide	8 residues
SEQ ID NO: 38	Mattes-based forward primer	17 bases
SEQ ID NO: 39	Mattes-based reverse primer	19 bases

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**1. Definitions**

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by those of ordinary skill in the art to which the invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, preferred methods and materials are described. For the purposes of the present invention, the following terms are defined below.

The articles "a" and "an" are used herein to refer to one or to more than one (i.e. to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, "an element" means one element or more than one element.

The term "about" is used herein to refer to sequences that vary by as much as 30%, preferably by as much as 20% and more preferably by as much as 10% to the length of a reference quantity, level, value, dimension, length, position, size, or amount.

"Amplification product" refers to a nucleic acid product generated by nucleic acid amplification techniques.

By "antigen-binding molecule" is meant a molecule that has binding affinity for a target antigen. It will be understood that this term extends to immunoglobulins, immunoglobulin fragments and non-immunoglobulin derived protein frameworks that exhibit antigen-binding activity.

As used herein, the term "binds specifically" and the like refers to antigen-binding molecules that bind the polypeptide or polypeptide fragments of the invention but do not significantly bind to homologous prior art polypeptides.

By "biologically active fragment" is meant a fragment of a full-length parent polypeptide which fragment retains the activity of the parent polypeptide. A biologically active fragment will therefore comprise sucrose isomerase activity, which converts sucrose to isomaltulose. As used herein, the term "biologically active fragment" includes deletion mutants and small peptides, for example of at least 8, preferably at least 10, more preferably at least 20, and still more preferably at least 30 contiguous amino acids, which comprise the above activities. Peptides of this type may be obtained through the

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 13 -

application of standard recombinant nucleic acid techniques or synthesised using conventional liquid or solid phase synthesis techniques. For example, reference may be made to solution synthesis or solid phase synthesis as described, for example, in Chapter 9 entitled "*Peptide Synthesis*" by Atherton and Shephard which is included in a publication 5 entitled "*Synthetic Vaccines*" edited by Nicholson and published by Blackwell Scientific Publications. Alternatively, peptides can be produced by digestion of a polypeptide of the invention with proteinases such as endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C and staphylococcus V8-protease. The digested fragments can be purified by, for example, high performance liquid chromatographic (HPLC) techniques.

10 Throughout this specification, unless the context requires otherwise, the words "*comprise*", "*comprises*" and "*comprising*" will be understood to imply the inclusion of a stated step or element or group of steps or elements but not the exclusion of any other step or element or group of steps or elements.

15 By "*corresponds to*" or "*corresponding to*" is meant a polynucleotide (a) having a nucleotide sequence that is substantially identical or complementary to all or a portion of a reference polynucleotide sequence or (b) encoding an amino acid sequence identical to an amino acid sequence in a peptide or protein. This phrase also includes within its scope a peptide or polypeptide having an amino acid sequence that is substantially identical to a sequence of amino acids in a reference peptide or protein.

20 By "*derivative*" is meant a polypeptide that has been derived from the basic sequence by modification, for example by conjugation or complexing with other chemical moieties or by post-translational modification techniques as would be understood in the art. The term "*derivative*" also includes within its scope alterations that have been made to a parent sequence including additions, or deletions that provide for functionally equivalent 25 molecules. Accordingly, the term derivative encompasses molecules that will have sucrose isomerase activity.

"*Homology*" refers to the percentage number of amino acids that are identical or constitute conservative substitutions as defined in Table B *infra*. Homology may be determined using sequence comparison programs such as GAP (Deveraux *et al.* 1984, 30 *Nucleic Acids Research* **12**, 387-395). In this way, sequences of a similar or substantially different length to those cited herein might be compared by insertion of gaps into the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 14 -

alignment, such gaps being determined, for example, by the comparison algorithm used by GAP.

“Hybridisation” is used herein to denote the pairing of complementary nucleotide sequences to produce a DNA-DNA hybrid or a DNA-RNA hybrid. Complementary base sequences are those sequences that are related by the base-pairing rules. In DNA, A pairs with T and C pairs with G. In RNA U pairs with A and C pairs with G. In this regard, the terms “match” and “mismatch” as used herein refer to the hybridisation potential of paired nucleotides in complementary nucleic acid strands. Matched nucleotides hybridise efficiently, such as the classical A-T and G-C base pair mentioned above. Mismatches are other combinations of nucleotides that do not hybridise efficiently.

Reference herein to “immuno-interactive” includes reference to any interaction, reaction, or other form of association between molecules and in particular where one of the molecules is, or mimics, a component of the immune system.

By “immuno-interactive fragment” is meant a fragment of the polypeptide set forth in any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, which fragment elicits an immune response, including the production of elements that specifically bind to said polypeptide, or variant or derivative thereof. As used herein, the term “immuno-interactive fragment” includes deletion mutants and small peptides, for example of at least six, preferably at least 8 and more preferably at least 20 contiguous amino acids, which comprise antigenic determinants or epitopes. Several such fragments may be joined together.

By “isolated” is meant material that is substantially or essentially free from components that normally accompany it in its native state. For example, an “isolated polynucleotide”, as used herein, refers to a polynucleotide, which has been purified from the sequences which flank it in a naturally occurring state, e.g., a DNA fragment which has been removed from the sequences which are normally adjacent to the fragment.

By “marker gene” is meant a gene that imparts a distinct phenotype to cells expressing the marker gene and thus allows such transformed cells to be distinguished from cells that do not have the marker. A selectable marker gene confers a trait for which one can ‘select’ based on resistance to a selective agent (e.g., a herbicide, antibiotic, radiation, heat, or other treatment damaging to untransformed cells). A screenable marker gene (or reporter gene) confers a trait that one can identify through observation or testing,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 15 -

i.e., by 'screening' (e.g. β -glucuronidase, luciferase, or other enzyme activity not present in untransformed cells).

By "obtained from" is meant that a sample such as, for example, a nucleic acid extract or polypeptide extract is isolated from, or derived from, a particular source. For example, the extract may be isolated directly from any sucrose-metabolising organism, preferably from a sucrose-metabolising microorganism, more preferably from microorganisms of the genera *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Leuconostoc*, *Protaminobacter*, *Pseudomonas* and *Serratia* or from a microorganism obtained from a location in which organisms, capable of converting sucrose to isomaltulose, have a selective advantage as for example described herein.

The term "oligonucleotide" as used herein refers to a polymer composed of a multiplicity of nucleotide units (deoxyribonucleotides or ribonucleotides, or related structural variants or synthetic analogues thereof) linked via phosphodiester bonds (or related structural variants or synthetic analogues thereof). Thus, while the term "oligonucleotide" typically refers to a nucleotide polymer in which the nucleotides and linkages between them are naturally occurring, it will be understood that the term also includes within its scope various analogues including, but not restricted to, peptide nucleic acids (PNAs), phosphoramidates, phosphorothioates, methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleic acids, and the like. The exact size of the molecule may vary depending on the particular application. An oligonucleotide is typically rather short in length, generally from about 10 to 30 nucleotides, but the term can refer to molecules of any length, although the term "polynucleotide" or "nucleic acid" is typically used for large oligonucleotides.

By "operably linked" is meant that transcriptional and translational regulatory nucleic acids are positioned relative to a polypeptide-encoding polynucleotide in such a manner that the polynucleotide is transcribed and optionally the polypeptide is translated.

As used herein, "plant" and "differentiated plant" refer to a whole plant or plant part containing differentiated plant cell types, tissues and/or organ systems. Plantlets and seeds are also included within the meaning of the foregoing terms. Plants included in the invention are any plants amenable to transformation techniques, including angiosperms, gymnosperms, monocotyledons and dicotyledons.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 16 -

The term "*plant cell*" as used herein refers to protoplasts or other cells derived from plants, gamete-producing cells, and cells which regenerate into whole plants. Plant cells include cells in plants as well as protoplasts or other cells in culture.

5 By "*plant tissue*" is meant differentiated and undifferentiated tissue derived from roots, shoots, pollen, seeds, tumour tissue, such as crown galls, and various forms of aggregations of plant cells in culture, such as embryos and calluses.

"*Constitutive promoter*" refers to a promoter that directs expression of an operably linked transcribable sequence in many or all tissues of a plant.

10 By "*stem-specific promoter*" is meant a promoter that preferentially directs expression of an operably linked transcribable sequence in culm or stem tissue of a plant, as compared to expression in leaf, root or other tissues of the plant.

The term "*polynucleotide*" or "*nucleic acid*" as used herein designates mRNA, RNA, cRNA, cDNA or DNA. The term typically refers to oligonucleotides greater than 30 nucleotides in length.

15 The terms "*polynucleotide variant*" and "*variant*" refer to polynucleotides displaying substantial sequence identity with a reference polynucleotide sequence or polynucleotides that hybridise with a reference sequence under stringent conditions that are defined hereinafter. These terms also encompass polynucleotides in which one or more nucleotides have been added or deleted, or replaced with different nucleotides. In this
20 regard, it is well understood in the art that certain alterations inclusive of mutations, additions, deletions and substitutions can be made to a reference polynucleotide whereby the altered polynucleotide retains the biological function or activity of the reference polynucleotide. The terms "*polynucleotide variant*" and "*variant*" also include naturally occurring allelic variants.

25 "*Polypeptide*", "*peptide*" and "*protein*" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues and to variants and synthetic analogues of the same. Thus, these terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residues is a synthetic non-naturally occurring amino acid, such as a chemical analogue of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally-occurring amino acid
30 polymers.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 17 -

The term "*polypeptide variant*" refers to polypeptides in which one or more amino acids have been replaced by different amino acids. It is well understood in the art that some amino acids may be changed to others with broadly similar properties without changing the nature of the activity of the polypeptide (conservative substitutions) as described hereinafter. These terms also encompass polypeptides in which one or more amino acids have been added or deleted, or replaced with different amino acids. Accordingly, polypeptide variants as used herein encompass polypeptides that have sucrose isomerase activity.

By "*primer*" is meant an oligonucleotide which, when paired with a strand of DNA, is capable of initiating the synthesis of a primer extension product in the presence of a suitable polymerising agent. The primer is preferably single-stranded for maximum efficiency in amplification but may alternatively be double-stranded. A primer must be sufficiently long to prime the synthesis of extension products in the presence of the polymerisation agent. The length of the primer depends on many factors, including application, temperature to be employed, template reaction conditions, other reagents, and source of primers. For example, depending on the complexity of the target sequence, the oligonucleotide primer typically contains 15 to 35 or more nucleotides, although it may contain fewer nucleotides. Primers can be large polynucleotides, such as from about 200 nucleotides to several kilobases or more. Primers may be selected to be "substantially complementary" to the sequence on the template to which it is designed to hybridise and serve as a site for the initiation of synthesis. By "substantially complementary", it is meant that the primer is sufficiently complementary to hybridise with a target nucleotide sequence. Preferably, the primer contains no mismatches with the template to which it is designed to hybridise but this is not essential. For example, non-complementary nucleotides may be attached to the 5' end of the primer, with the remainder of the primer sequence being complementary to the template. Alternatively, non-complementary nucleotides or a stretch of non-complementary nucleotides can be interspersed into a primer, provided that the primer sequence has sufficient complementarity with the sequence of the template to hybridise therewith and thereby form a template for synthesis of the extension product of the primer.

"*Probe*" refers to a molecule that binds to a specific sequence or sub-sequence or other moiety of another molecule. Unless otherwise indicated, the term "probe" typically refers to a polynucleotide probe that binds to another nucleic acid, often called the "target nucleic acid", through complementary base pairing. Probes may bind target nucleic acids

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 18 -

lacking complete sequence complementarity with the probe, depending on the stringency of the hybridisation conditions. Probes can be labelled directly or indirectly.

The term "*recombinant polynucleotide*" as used herein refers to a polynucleotide formed *in vitro* by the manipulation of nucleic acid into a form not normally found in nature. For example, the recombinant polynucleotide may be in the form of an expression vector. Generally, such expression vectors include transcriptional and translational regulatory nucleic acid operably linked to the nucleotide sequence.

By "*recombinant polypeptide*" is meant a polypeptide made using recombinant techniques, *i.e.*, through the expression of a recombinant polynucleotide.

The term "*regeneration*" as used herein in relation to plant materials means growing a whole, differentiated plant from a plant cell, a group of plant cells, a plant part (including seeds), or a plant piece (*e.g.*, from a protoplast, callus, or tissue part).

By "*reporter molecule*" as used in the present specification is meant a molecule that, by its chemical nature, provides an analytically identifiable signal that allows the detection of a complex comprising an antigen-binding molecule and its target antigen. The term "*reporter molecule*" also extends to use of cell agglutination or inhibition of agglutination such as red blood cells on latex beads, and the like.

Terms used to describe sequence relationships between two or more polynucleotides or polypeptides include "reference sequence", "comparison window", "sequence identity", "percentage of sequence identity" and "substantial identity". A "*reference sequence*" is at least 12 but frequently 15 to 18 and often at least 25 monomer units, inclusive of nucleotides and amino acid residues, in length. Because two polynucleotides may each comprise (1) a sequence (*i.e.*, only a portion of the complete polynucleotide sequence) that is similar between the two polynucleotides, and (2) a sequence that is divergent between the two polynucleotides, sequence comparisons between two (or more) polynucleotides are typically performed by comparing sequences of the two polynucleotides over a "comparison window" to identify and compare local regions of sequence similarity. A "*comparison window*" refers to a conceptual segment of at least 6 contiguous positions, usually about 50 to about 100, more usually about 100 to about 150 in which a sequence is compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned. The comparison window may comprise additions or deletions (*i.e.*, gaps) of about 20% or less as compared

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 19 -

to the reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. Optimal alignment of sequences for aligning a comparison window may be conducted by computerised implementations of algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 5 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) or by inspection and the best alignment (*i.e.*, resulting in the highest percentage homology over the comparison window) generated by any of the various methods selected. Reference also may be made to the BLAST family of programs as for example disclosed by Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. A detailed discussion of sequence analysis can be 10 found in Unit 19.3 of Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.

The term "sequence identity" as used herein refers to the extent that sequences are identical on a nucleotide-by-nucleotide basis or an amino acid-by-amino acid basis over a window of comparison. Thus, a "percentage of sequence identity" is calculated by 15 comparing two optimally aligned sequences over the window of comparison, determining the number of positions at which the identical nucleic acid base (*e.g.*, A, T, C, G, I) or the identical amino acid residue (*e.g.*, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys and Met) occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of 20 positions in the window of comparison (*i.e.*, the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. For the purposes of the present invention, "sequence identity" will be understood to mean the "match percentage" calculated by the DNASIS computer program (Version 2.5 for windows; available from Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA) using 25 standard defaults as used in the reference manual accompanying the software.

"Stringency" as used herein, refers to the temperature and ionic strength conditions, and presence or absence of certain organic solvents, during hybridisation and washing procedures. The higher the stringency, the higher will be the degree of complementarity between immobilised target nucleotide sequences and the labelled probe 30 polynucleotide sequences that remain hybridised to the target after washing.

"Stringent conditions" refers to temperature and ionic conditions under which only nucleotide sequences having a high frequency of complementary bases will hybridise. The stringency required is nucleotide sequence dependent and depends upon the various

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 20 -

components present during hybridisation and subsequent washes, and the time allowed for these processes. Generally, in order to maximise the hybridisation rate, non-stringent hybridisation conditions are selected; about 20 to 25° C lower than the thermal melting point (T_m). The T_m is the temperature at which 50% of specific target sequence hybridises to a perfectly complementary probe in solution at a defined ionic strength and pH. Generally, in order to require at least about 85% nucleotide complementarity of hybridised sequences, highly stringent washing conditions are selected to be about 5 to 15° C lower than the T_m . In order to require at least about 70% nucleotide complementarity of hybridised sequences, moderately stringent washing conditions are selected to be about 15 to 30° C lower than the T_m . Highly permissive (low stringency) washing conditions may be as low as 50° C below the T_m , allowing a high level of mis-matching between hybridised sequences. Those skilled in the art will recognise that other physical and chemical parameters in the hybridisation and wash stages can also be altered to affect the outcome of a detectable hybridisation signal from a specific level of homology between target and probe sequences. Other examples of stringency conditions are described in section 3.3.

The term "*transformation*" means alteration of the genotype of an organism, for example a bacterium or a plant, by the introduction of a foreign or endogenous nucleic acid.

By "*transgenote*" is meant an immediate product of a transformation process.

By "*vector*" is meant a nucleic acid molecule, preferably a DNA molecule derived, for example, from a plasmid, bacteriophage, or plant virus, into which a nucleic acid sequence may be inserted or cloned. A vector preferably contains one or more unique restriction sites and may be capable of autonomous replication in a defined host cell including a target cell or tissue or a progenitor cell or tissue thereof, or be integrable with the genome of the defined host such that the cloned sequence is reproducible. Accordingly, the vector may be an autonomously replicating vector, *i.e.*, a vector that exists as an extrachromosomal entity, the replication of which is independent of chromosomal replication, *e.g.*, a linear or closed circular plasmid, an extrachromosomal element, a minichromosome, or an artificial chromosome. The vector may contain any means for assuring self-replication. Alternatively, the vector may be one which, when introduced into a cell, is integrated into the genome of the recipient cell and replicated together with the chromosome(s) into which it has been integrated. A vector system may comprise a single vector or plasmid, two or more vectors or plasmids, which together contain the total DNA

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 21 -

to be introduced into the genome of the host cell, or a transposon. The choice of the vector will typically depend on the compatibility of the vector with the cell into which the vector is to be introduced. The vector may also include a selection marker such as an antibiotic resistance gene that can be used for selection of suitable transformants. Examples of such resistance genes are well known to those of skill in the art.

2. *Isolated polypeptides, biologically active fragments, polypeptide variants and derivatives*

2.1 Polypeptides of the invention

The present invention is predicated in part on the determination of the full-length sequence of a sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* (Accession No. WAC2928) and the full-length sequence of a novel sucrose isomerase from a bacterial isolate designated 68J.

The full-length amino acid sequence of the *Erwinia rhapontici* sucrose isomerase extends 632 residues and includes 197 additional residues of carboxyl terminal sequence (set forth in SEQ ID NO: 26) relative to the sequence disclosed by Mattes *et al.* (*supra*). The *E. rhapontici* polypeptide includes a leader or signal peptide, set forth in SEQ ID NO: 6, which extends from residues 1 to about 36 of SEQ ID NO: 2. The signal peptide is necessary only for correct localisation of the mature polypeptide in a particular cell compartment (*e.g.*, in the outer membrane, in the inner membrane or in the periplasmic space between the outer membrane and the inner membrane). The mature polypeptide, set forth in SEQ ID NO: 4, extends from about residue 37 to residue 632. Accordingly, in one embodiment, the invention provides an isolated precursor polypeptide according to SEQ ID NO: 2, which comprises a leader peptide according to SEQ ID NO: 6 fused in frame with a polypeptide according to SEQ ID NO: 4. In another embodiment, the invention provides an isolated mature polypeptide comprising the sequence set forth in SEQ ID NO: 4.

The full-length amino acid sequence of the 68J sucrose isomerase extends 598 residues set forth in SEQ ID NO: 8, and comprises a signal peptide, set forth in SEQ ID NO: 12, extending from residues 1 to about 33 of SEQ ID NO: 8. The mature polypeptide, set forth in SEQ ID NO: 10, extends from about residue 34 to residue 598 of SEQ ID NO: 8. Thus, in one embodiment, the present invention features an isolated precursor polypeptide according to SEQ ID NO: 8, which comprises a leader peptide according to

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 22 -

SEQ ID NO: 12 fused in frame with a polypeptide according to SEQ ID NO: 10. In another embodiment, the invention contemplates an isolated mature polypeptide comprising the sequence set forth in SEQ ID NO: 10.

2.2 Biologically active fragments

5 Biologically active fragments may be produced according to any suitable procedure known in the art. For example, a suitable method may include first producing a fragment of said polypeptide and then testing the fragment for the appropriate biological activity. In one embodiment, the fragment may be tested for sucrose isomerase activity. Any assay that detects or preferably measures sucrose isomerase activity is contemplated
10 by the present invention. Preferably, sucrose isomerase activity is determined by an aniline/diphenylamine assay and capillary electrophoresis as described herein.

In another embodiment, biological activity of the fragment is tested by introducing a polynucleotide from which a fragment of the polypeptide can be translated into a cell, and detecting sucrose isomerase activity, which is indicative of said fragment
15 being a said biologically active fragment.

The invention also contemplates biological fragments of the above polypeptides of at least 6 and preferably at least 8 amino acids in length, which can elicit an immune response in an animal for the production of antibodies that are immuno-interactive with a sucrose isomerase enzyme of the invention. For example exemplary polypeptide fragments
20 of 8 residues in length, which could elicit an immune response, include but are not limited to residues 1-8, 9-16, 17-24, 25-32, 33-40, 41-48, 49-56, 57-64, 65-72, 73-80, 81-88, 89-96, 97-104, 105-112, 113-120, 121-128, 129-136, 137-144, 145-152, 153-160, 161-168, 169-176, 177-184, 185-192, 193-200, 201-208, 209-216, 217-224, 225-232, 223-240, 241-248, 249-256, 257-264, 265-272, 273-280, 281-288, 289-296, 297-304, 305-312, 313-320,
25 321-328, 329-336, 337-344, 345-352, 353-360, 361-368, 369-376, 377-384, 385-392, 393-400, 401-408, 409-416, 417-424, 425-432, 423-440, 441-448, 449-456, 457-464, 465-472, 473-480, 481-488, 489-496, 497-504, 505-512, 513-520, 521-528, 529-536, 537-544, 545-552, 553-560, 561-568, 569-576, 577-584, 585-592 and 589-596 of SEQ ID NO: 2, or residues 1-8, 9-16, 17-24, 25-32, 33-40, 41-48, 49-56, 57-64, 65-72, 73-80, 81-88, 89-96,
30 97-104, 105-112, 113-120, 121-128, 129-136, 137-144, 145-152, 153-160, 161-168, 169-176, 177-184, 185-192, 193-200, 201-208, 209-216, 217-224, 225-232, 223-240, 241-248, 249-256, 257-264, 265-272, 273-280, 281-288, 289-296, 297-304, 305-312, 313-320, 321-

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 23 -

328, 329-336, 337-344, 345-352, 353-360, 361-368, 369-376, 377-384, 385-392, 393-400, 401-408, 409-416, 417-424, 425-432, 423-440, 441-448, 449-456, 457-464, 465-472, 473-480, 481-488, 489-496, 497-504, 505-512, 513-520, 521-528, 529-536, 537-544, 545-552, 553-560 and 559-566 of SEQ ID NO: 4. In a preferred embodiment of this type, the
5 biologically active fragment comprises at least one sucrose isomerase consensus sequence selected from SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 or 24.

2.3 Polypeptide variants

The invention also contemplates polypeptide variants of the polypeptides of the invention wherein said variants have sucrose isomerase activity. Suitable methods of
10 producing polypeptide variants include, for example, producing a modified polypeptide whose sequence is distinguished from a parent polypeptide by substitution, deletion and/or addition of at least one amino acid, wherein the parent polypeptide comprises a sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or a biologically active fragment thereof. The modified polypeptide is then tested for sucrose isomerase activity, wherein the
15 presence of that activity indicates that said modified polypeptide is a said variant.

In another embodiment, a polypeptide variant is produced by introducing into a cell a polynucleotide from which a modified polypeptide can be translated, and detecting sucrose isomerase activity associated with the cell, which is indicative of the modified polypeptide being a said polypeptide variant.

20 In general, variants will have at least 60%, more suitably at least 70%, preferably at least 80%, and more preferably at least 90% homology to a polypeptide as for example shown in SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or biologically active fragments thereof. It is preferred that variants display at least 60%, more suitably at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least
25 90% and still more preferably at least 95% sequence identity with a polypeptide as for example shown in SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or biologically active fragments thereof. In this respect, the window of comparison preferably spans about the full length of the polypeptide or of the biologically active fragment.

Suitable variants can be obtained from any suitable sucrose-metabolising
30 organism. Preferably, the variants are obtained from a sucrose-metabolising bacterium as for example described in Section 3.3 *infra*.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 24 -

2.4 Methods of producing polypeptide variants**2.4.1 Mutagenesis**

Polypeptide variants according to the invention can be identified either rationally, or via established methods of mutagenesis (see, for example, Watson, J. D. *et al.*, 5 "MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE", Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987). Significantly, a random mutagenesis approach requires no *a priori* information about the gene sequence that is to be mutated. This approach has the advantage that it assesses the desirability of a particular mutant based on its function, and thus does not require an understanding of how or why the resultant mutant protein has 10 adopted a particular conformation. Indeed, the random mutation of target gene sequences has been one approach used to obtain mutant proteins having desired characteristics (Leatherbarrow, R. 1986, *J. Prot. Eng.* 1: 7-16; Knowles, J. R., 1987, *Science* 236: 1252-1258; Shaw, W. V., 1987, *Biochem. J.* 246: 1-17; Gerit, J. A. 1987, *Chem. Rev.* 87: 1079-1105). Alternatively, where a particular sequence alteration is desired, methods of site- 15 directed mutagenesis can be employed. Thus, such methods may be used to selectively alter only those amino acids of the protein that are believed to be important (Craik, C. S., 1985, *Science* 228: 291-297; Cronin, *et al.*, 1988, *Biochem.* 27: 4572-4579; Wilks, *et al.*, 1988, *Science* 242: 1541-1544).

Variant peptides or polypeptides, resulting from rational or established methods of 20 mutagenesis or from combinatorial chemistries as hereinafter described, may comprise conservative amino acid substitutions. Exemplary conservative substitutions in a polypeptide or polypeptide fragment according to the invention may be made according to the following table:

TABLE B

<i>Original Residue</i>	<i>Exemplary Substitutions</i>
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Original Residue	Exemplary Substitutions
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile,
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Substantial changes in function are made by selecting substitutions that are less conservative than those shown in TABLE B. Other replacements would be non-conservative substitutions and relatively fewer of these may be tolerated. Generally, the substitutions which are likely to produce the greatest changes in a polypeptide's properties are those in which (a) a hydrophilic residue (*e.g.*, Ser or Thr) is substituted for, or by, a hydrophobic residue (*e.g.*, Ala, Leu, Ile, Phe or Val); (b) a cysteine or proline is substituted for, or by, any other residue; (c) a residue having an electropositive side chain (*e.g.*, Arg, His or Lys) is substituted for, or by, an electronegative residue (*e.g.*, Glu or Asp) or (d) a residue having a bulky side chain (*e.g.*, Phe or Trp) is substituted for, or by, one having a smaller side chain (*e.g.*, Ala, Ser) or no side chain (*e.g.*, Gly).

What constitutes suitable variants may be determined by conventional techniques. For example, nucleic acids encoding a polypeptide according to SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10 can be mutated using either random mutagenesis for example using transposon mutagenesis, or site-directed mutagenesis as described, for example, in Section 3.3 *infra*.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2.4.2 Peptide libraries produced by combinatorial chemistry

A number of facile combinatorial technologies can be utilised to synthesise molecular libraries of immense diversity. In the present case, variants of a polypeptide, or preferably a polypeptide fragment according to the invention, can be synthesised using such technologies. Variants can be screened subsequently using the methods described in Section 2.3.

Preferably, soluble synthetic peptide combinatorial libraries (SPCLs) are produced which offer the advantage of working with free peptides in solution, thus permitting adjustment of peptide concentration to accommodate a particular assay system. SPCLs are suitably prepared as hexamers. In this regard, a majority of binding sites is known to involve four to six residues. Cysteine is preferably excluded from the mixture positions to avoid the formation of disulfides and more difficult-to-define polymers. Exemplary methods of producing SPCLs are disclosed by Houghten *et al.* (1991, *Nature* 354: 84-86; 1992, *BioTechniques* 13: 412-421), Appel *et al.* (1992, *Immunomethods* 1: 17-23), and Pinilla *et al.* (1992, *BioTechniques* 13: 901-905; 1993, *Gene* 128: 71-76).

Preparation of combinatorial synthetic peptide libraries may employ either *t*-butyloxycarbonyl (*t*-Boc) or 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) chemistries (see Chapter 9.1, of Coligan *et al.*, *supra*; Stewart and Young, 1984, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chemical Co., Rockford, Ill; and Atherton and Sheppard, 1989, *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford) preferably, but not exclusively, using one of two different approaches. The first of these approaches, suitably termed the "split-process-recombine" or "split synthesis" method, was described first by Furka *et al.* (1988, *14th Int. Congr. Biochem.*, Prague, Czechoslovakia 5: 47; 1991, *Int. J. Pept. Protein Res.* 37: 487-493) and Lam *et al.* (1991, *Nature* 354: 82-84), and reviewed later by Eichler *et al.* (1995, *Medicinal Research Reviews* 15(6): 481-496) and Balkenhohl *et al.* (1996, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 2288-2337). Briefly, the split synthesis method involves dividing a plurality of solid supports such as polymer beads into *n* equal fractions representative of the number of available amino acids for each step of the synthesis (*e.g.*, 20 L-amino acids), coupling a single respective amino acid to each polymer bead of a corresponding fraction, and then thoroughly mixing the polymer beads of all the fractions together. This process is repeated for a total of *x* cycles to produce a stochastic collection of up to N^x different compounds. The peptide library so produced may be screened for sucrose isomerase activity. Upon detection, some of the positive beads are

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 27 -

selected for sequencing to identify the active peptide. Such a peptide may be subsequently cleaved from the beads, and assayed as above.

The second approach, the chemical ratio method, prepares mixed peptide resins using a specific ratio of amino acids empirically defined to give equimolar incorporation of each amino acid at each coupling step. Each resin bead contains a mixture of peptides. Approximate equimolar representation can be confirmed by amino acid analysis (Dooley and Houghten, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 10811-10815; Eichler and Houghten, 1993, *Biochemistry* **32**: 11035-11041). Preferably, the synthetic peptide library is produced on polyethylene rods, or pins, as a solid support, as for example disclosed by Geysen *et al.* (1986, *Mol. Immunol.* **23**: 709-715). An exemplary peptide library of this type may consist of octapeptides in which the third and fourth position represent defined amino acids selected from natural and unnatural amino acids, and in which the remaining six positions represent a randomised mixture of amino acids. This peptide library can be represented by the formula Ac-XXO₁O₂XXXX-S_s [SEQ ID NO: 37], where S_s is the solid support. Peptide mixtures remain on the pins for assaying purposes. For example, a peptide library can be first screened for the ability to convert sucrose to isomaltulose. The most active peptides are then selected for an additional round of testing comprising linking, to the starting peptide, an additional residue (or by internally modifying the components of the original starting peptide) and then screening this set of candidates for sucrose isomerase activity. This process is reiterated until the peptide with the desired sucrose isomerase activity is identified. One identified, the identity of the peptide attached to the solid phase support may be determined by peptide sequencing.

2.4.3 Alanine scanning mutagenesis

In one embodiment, the invention herein utilises a systematic analysis of a polypeptide or polypeptide fragment according to the invention to determine the residues in the polypeptide or fragment that are involved in catalysis of sucrose to isomaltulose. Such analysis is conveniently performed using recombinant DNA technology. In general, a DNA sequence encoding the polypeptide or fragment is cloned and manipulated so that it may be expressed in a convenient host. DNA encoding the polypeptide or fragment can be obtained from a genomic library, from cDNA derived from mRNA in cells expressing the said polypeptide or fragment, or by synthetically constructing the DNA sequence (Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, *supra*).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

The wild-type DNA encoding the polypeptide or fragment is then inserted into an appropriate plasmid or vector as described herein. In particular, prokaryotes are preferred for cloning and expressing DNA sequences to produce variants of the polypeptide or fragment. For example, *E. coli* K12 strain 294 (ATCC No. 31446) may be used, as well as
5 *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC No. 31537), and *E. coli* c600 and c600hfl, and *E. coli* W3110 (F^+ , γ^- , prototrophic, ATCC No. 27325), bacilli such as *Bacillus subtilis*, and other *enterobacteriaceae* such as *Salmonella typhimurium* or *Serratia marcescens*, and various *Pseudomonas* species. A preferred prokaryote is *E. coli* W3110 (ATCC 27325).

Once the polypeptide or fragment is cloned, site-specific mutagenesis as for
10 example described by Carter *et al.* (1986, *Nucl. Acids. Res.*, **13**: 4331) or by Zoller *et al.* (1987, *Nucl. Acids Res.*, **10**: 6487), cassette mutagenesis as for example described by Wells *et al.* (1985, *Gene*, **34**: 315), restriction selection mutagenesis as for example described by Wells *et al.* (1986, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, **317**: 415), or other known techniques may be performed on the cloned DNA to produce the variant DNA that codes
15 for the changes in amino acid sequence defined by the residues being substituted. When operably linked to regulatory polynucleotides in an appropriate expression vector, variant polypeptides are obtained. In some cases, recovery of the variant may be facilitated by expressing and secreting such molecules from the expression host by use of an appropriate signal sequence operably linked to the DNA sequence encoding the variant. Such methods
20 are well known to those skilled in the art. Of course, other methods may be employed to produce such polypeptides or fragments such as the *in vitro* chemical synthesis of the desired polypeptide variant (Barany *et al.* In *The Peptides*, eds. E. Gross and J. Meienhofer (Academic Press: N.Y. 1979), Vol. 2, pp. 3-254).

Once the different variants are produced, they are contacted with sucrose or a
25 sucrose-containing substrate and the conversion to isomaltulose, if any, is determined for each variant. These sucrose isomerase activities are compared to the activity of the parent polypeptide or fragment to determine which of the amino acid residues in the active site are involved in sucrose isomerisation.

The sucrose isomerase activity of the parent and variant, respectively, can be
30 measured by any convenient assay as for example described herein. While any number of analytical measurements may be used to compare activities, a convenient one for enzymic activity is the Michaelis constant K_m of the variant as compared to the K_m for the parent polypeptide or fragment. Generally, a two-fold increase or decrease in K_m per analogous

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 29 -

residue substituted by the substitution indicates that the substituted residue(s) is active in the interaction of the parent polypeptide or fragment with the substrate.

When a suspected or known active amino acid residue is subjected to scanning amino acid analysis, the amino acid residues immediately adjacent thereto should be scanned. The scanning amino acid used in such an analysis may be any different amino acid from that substituted, *i.e.*, any of the 19 other naturally occurring amino acids. Three residue-substituted polypeptides can be made. One contains a scanning amino acid, preferably alanine, at position N that is the suspected or known active amino acid. The two others contain the scanning amino acid at position N+1 and N-1. If each substituted polypeptide or fragment causes a greater than about two-fold effect on K_m for the substrate, the scanning amino acid is substituted at position N+2 and N-2. This is repeated until at least one, and preferably four, residues are identified in each direction which have less than about a two-fold effect on K_m or until either of the ends of the parent polypeptide or fragment are reached. In this manner, along a continuous amino acid sequence one or more amino acids that are involved in the catalysis of sucrose to isomaltulose can be identified.

The active amino acid residue identified by amino acid scan is typically one that contacts sucrose directly. However, active amino acids may also indirectly contact sucrose through salt bridges formed with other residues or small molecules such as H_2O or ionic species such as Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , or Zn^{+2} .

In some cases, the substitution of a scanning amino acid at one or more residues results in a residue-substituted polypeptide which is not expressed at levels that allow for the isolation of quantities sufficient to carry out analysis of its sucrose isomerase activity. In such cases, a different scanning amino acid, preferably an isosteric amino acid, can be used.

Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is the preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant. Alanine is also preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions (Creighton, *The Proteins*, W. H. Freeman & Co., N.Y.; Chothia, 1976, *J. Mol. Biol.*, 150: 1). If alanine substitution does not

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 30 -

yield adequate amounts of variant, an isosteric amino acid can be used. Alternatively, the following amino acids in decreasing order of preference may be used: Ser, Asn, and Leu.

Once the active amino acid residues are identified, isosteric amino acids may be substituted. Such isosteric substitutions need not occur in all instances and may be performed before any active amino acid is identified. Such isosteric amino acid substitution is performed to minimise the potential disruptive effects on conformation that some substitutions can cause. Isosteric amino acids are shown in the table below:

TABLE C

<i>Polypeptide Amino Acid</i>	<i>Isosteric Substituting Amino Acid</i>
Ala (A)	Ser, Gly
Glu (E)	Gln, Asp
Gln (Q)	Asn, Glu
Asp (D)	Asn, Glu
Asn (N)	Ala, Asp
Leu (L)	Met, Ile
Gly (G)	Pro, Ala
Lys (K)	Met, Arg
Ser (S)	Thr, Ala
Val (V)	Ile, Thr
Arg (R)	Lys, Met, Asn
Thr (T)	Ser, Val
Pro (P)	Gly
Ile (I)	Met, Leu, Val
Met (M)	Ile, Leu
Phe (F)	Tyr
Tyr (Y)	Phe
Cys (C)	Ser, Ala
Trp (W)	Phe

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

<i>Polypeptide Amino Acid</i>	<i>Isosteric Scanning Amino Acid</i>
His (H)	Asn, Gln

The method herein can be used to detect active amino acid residues within different domains of a polypeptide or fragment according to the invention. Once this identification is made, various modifications to the parent polypeptide or fragment may be made to modify the interaction between the parent polypeptide or fragment and its substrate.

2.4.4 Polypeptide or peptide libraries produced by phage display

The identification of variants can also be facilitated through the use of a phage (or phagemid) display protein ligand screening system as for example described by Lowman, *et al.* (1991, *Biochem.* **30**: 10832-10838), Markland, *et al.* (1991, *Gene* **109**: 13-19), Roberts, *et al.* (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **89**: 2429-2433), Smith, G. P. (1985, *Science* **228**: 1315-1317), Smith, *et al.* (1990, *Science* **248**: 1126-1128) and Lardner *et al.* (U.S. Patent 5,223,409). In general, this method involves expressing a fusion protein in which the desired protein ligand is fused to the N-terminus of a viral coat protein (such as the M13 Gene III coat protein, or a lambda coat protein).

In one embodiment, a library of phage is engineered to display novel peptides within the phage coat protein sequences. Novel peptide sequences are generated by random mutagenesis of gene fragments encoding a polypeptide of the invention or biologically active fragment using error-prone PCR, or by *in vivo* mutation by *E. coli* mutator cells. The novel peptides displayed on the surface of the phage are placed in contact with sucrose or a sucrose-containing substrate. Phage that display coat protein having peptides that are capable of isomerising sucrose to isomaltulose are then selected. The selected phage can be amplified, and the DNA encoding their coat proteins can be sequenced. In this manner, the amino acid sequence of the embedded peptide or polypeptide can be deduced.

In more detail, the method involves (a) constructing a replicable expression vector comprising a first gene encoding a polypeptide or fragment of the invention, a second gene encoding at least a portion of a natural or wild-type phage coat protein wherein the first and second genes are heterologous, and a transcription regulatory element operably linked to the first and second genes, thereby forming a gene fusion encoding a fusion protein; (b)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 32 -

mutating the vector at one or more selected positions within the first gene thereby forming a family of related plasmids; (c) transforming suitable host cells with the plasmids; (d) infecting the transformed host cells with a helper phage having a gene encoding the phage coat protein; (e) culturing the transformed infected host cells under conditions suitable for
5 forming recombinant phagemid particles containing at least a portion of the plasmid and capable of transforming the host, the conditions adjusted so that no more than a minor amount of phagemid particles displays more than one copy of the fusion protein on the surface of the particle; (f) contacting the phagemid particles with sucrose or a sucrose-containing substrate; and (g) separating the phagemid particles that isomerise sucrose to
10 isomaltulose from those that do not. Preferably, the method further comprises transforming suitable host cells with recombinant phagemid particles that isomerise sucrose to isomaltulose and repeating steps (d) through (g) one or more times.

Preferably, in this method the plasmid is under tight control of the transcription regulatory element, and the culturing conditions are adjusted so that the amount or number
15 of phagemid particles displaying more than one copy of the fusion protein on the surface of the particle is less than about 20%. More, preferably, the number of phagemid particles displaying more than one copy of the fusion protein is less than 10% of the number of phagemid particles displaying a single copy of the fusion protein. Most preferably, the number is less than 1%.

20 Typically in this method, the expression vector will further contain a secretory signal sequence fused to the DNA encoding each subunit of the polypeptide and the transcription regulatory element will be a promoter system. Preferred promoter systems are selected from *lac Z*, λ_{PT} , *tac*, T7 polymerase, tryptophan, and alkaline phosphatase promoters and combinations thereof. Normally the method will also employ a helper phage
25 selected from M13K07, M13R408, M13-VCS, and Phi X 174. The preferred helper phage is M13K07, and the preferred coat protein is the M13 Phage gene III coat protein. The preferred host is *E. coli*, and protease-deficient strains of *E. coli*.

Repeated cycles of variant selection are used to select for higher and higher affinity binding by the phagemid selection of multiple amino acid changes that are selected
30 by multiple selection cycles. Following a first round of phagemid selection, involving a first region or selection of amino acids in the ligand polypeptide, additional rounds of phagemid selection in other regions or amino acids of the ligand polypeptide are

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 33 -

conducted. The cycles of phagemid selection are repeated until the desired affinity properties of the polypeptide are achieved.

5 It will be appreciated that the amino acid residues that form the active site of the polypeptide or fragment may not be sequentially linked and may reside on different subunits of the polypeptide or fragment. That is, the binding domain tracks with the particular secondary structure at the active site and not the primary structure. Thus, generally, mutations will be introduced into codons encoding amino acids within a particular secondary structure at sites directed away from the interior of the polypeptide so that they will have the potential to interact with sucrose or a sucrose-containing substrate.

10 The phagemid-display method herein contemplates fusing a polynucleotide encoding the polypeptide or fragment (polynucleotide 1) to a second polynucleotide (polynucleotide 2) such that a fusion protein is generated during transcription. Polynucleotide 2 is typically a coat protein gene of a phage, and preferably it is the phage M13 gene III coat protein, or a fragment thereof. Fusion of polynucleotides 1 and 2 may be accomplished by inserting polynucleotide 2 into a particular site on a plasmid that contains polynucleotide 1, or by inserting polynucleotide 1 into a particular site on a plasmid that contains polynucleotide 2.

20 Between polynucleotide 1 and polynucleotide 2, DNA encoding a termination codon may be inserted, such termination codons being UAG (amber), UAA (ocher), and UGA (opal) (see for example, Davis *et al.*, *Microbiology* (Harper and Row: New York, 1980), pages 237, 245-247, and 274). The termination codon expressed in a wild-type host cell results in the synthesis of the polynucleotide 1 protein product without the polynucleotide 2 protein attached. However, growth in a suppressor host cell results in the synthesis of detectable quantities of fused protein. Such suppressor host cells contain a tRNA modified to insert an amino acid in the termination codon position of the mRNA, thereby resulting in production of detectable amounts of the fusion protein. Suppressor host cells of this type are well known and described, such as *E. coli* suppressor strain, such as JM101 or XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987, *BioTechniques*, 5: 376-379). Any acceptable method may be used to place such a termination codon into the mRNA encoding the fusion polypeptide.

30 The suppressible codon may be inserted between the polynucleotide encoding the polypeptide or fragment and a second polynucleotide encoding at least a portion of a phage

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 34 -

coat protein. Alternatively, the suppressible termination codon may be inserted adjacent to the fusion site by replacing the last amino acid triplet in the polypeptide/fragment or the first amino acid in the phage coat protein. When the phagemid containing the suppressible codon is grown in a suppressor host cell, it results in the detectable production of a fusion
5 polypeptide containing the polypeptide or fragment and the coat protein. When the phagemid is grown in a non-suppressor host cell, the polypeptide or fragment is synthesised substantially without fusion to the phage coat protein due to termination at the inserted suppressible triplet encoding UAG, UAA, or UGA. In the non-suppressor cell the polypeptide is synthesised and secreted from the host cell due to the absence of the fused
10 phage coat protein which otherwise anchored it to the host cell.

The polypeptide or fragment may be altered at one or more selected codons. An alteration is defined as a substitution, deletion, or insertion of one or more codons in the gene encoding the polypeptide or fragment that results in a change in the amino acid sequence as compared with the unaltered or native sequence of the said polypeptide or
15 fragment. Preferably, the alterations will be by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more regions of the molecule. The alterations may be produced by a variety of methods known in the art, as for example described in Section 2.3 and 2.4.1. These methods include, but are not limited to, oligonucleotide-mediated mutagenesis and cassette mutagenesis as described for example herein.

20 The library of phagemid particles is then contacted with sucrose or a sucrose-containing substrate under suitable conditions. Normally, the conditions, including pH, ionic strength, temperature, and the like will mimic physiological conditions. Phagemid particles having high sucrose isomerase activity are then selected from those having low activity.

25 Suitable host cells are infected with the selected phagemid particles and helper phage, and the host cells are cultured under conditions suitable for amplification of the phagemid particles. The phagemid particles are then collected and the selection process is repeated one or more times until binders having the desired affinity for the target molecule are selected.

30 2.4.5 *Rational drug design*

Variants of an isolated polypeptide according to the invention, or a biologically active fragment thereof, may also be obtained using the principles of conventional or of
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

rational drug design as for example described by Andrews, *et al.* (In: "PROCEEDINGS OF THE ALFRED BENZON SYMPOSIUM", volume 28, pp. 145-165, Munksgaard, Copenhagen, 1990), McPherson, A. (1990, *Eur. J. Biochem.* **189**: 1-24), Hol, *et al.* (In: "MOLECULAR RECOGNITION: CHEMICAL AND BIOCHEMICAL PROBLEMS", Roberts, S. M. (ed.); Royal Society of Chemistry; pp. 84-93, 1989), Hol, W. G. J. (1989, *Arzneim-Forsch.* **39**: 1016-1018), Hol, W. G. J. (1986, *Agnew Chem. Int. Ed. Engl.* **25**: 767-778).

In accordance with the methods of conventional drug design, the desired variant molecules are obtained by randomly testing molecules whose structures have an attribute in common with the structure of a parent polypeptide or biologically active fragment according to the invention. The quantitative contribution that results from a change in a particular group of a binding molecule can be determined by measuring the capacity of competition or cooperativity between the parent polypeptide or polypeptide fragment and the candidate polypeptide variant.

In one embodiment of rational drug design, the polypeptide variant is designed to share an attribute of the most stable three-dimensional conformation of a polypeptide or polypeptide fragment according to the invention. Thus, the variant may be designed to possess chemical groups that are oriented in a way sufficient to cause ionic, hydrophobic, or van der Waals interactions that are similar to those exhibited by the polypeptide or polypeptide fragment of the invention. In a second method of rational design, the capacity of a particular polypeptide or polypeptide fragment to undergo conformational "breathing" is exploited. Such "breathing" - the transient and reversible assumption of a different molecular conformation - is a well-appreciated phenomenon, and results from temperature, thermodynamic factors, and from the catalytic activity of the molecule. Knowledge of the 3-dimensional structure of the polypeptide or polypeptide fragment facilitates such an evaluation. An evaluation of the natural conformational changes of a polypeptide or polypeptide fragment facilitates the recognition of potential hinge sites, potential sites at which hydrogen bonding, ionic bonds or van der Waals bonds might form or might be eliminated due to the breathing of the molecule, etc. Such recognition permits the identification of the additional conformations that the polypeptide or polypeptide fragment could assume, and enables the rational design and production of mimetic polypeptide variants that share such conformations.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 36 -

The preferred method for performing rational mimetic design employs a computer system capable of forming a representation of the three-dimensional structure of the polypeptide or polypeptide fragment (such as those obtained using RIBBON (Priestle, J., 1988, *J. Mol. Graphics* 21: 572), QUANTA (Polygen), InSite (Biosyn), or Nanovision (American Chemical Society)). Such analyses are exemplified by Hol, *et al.* (In: "MOLECULAR RECOGNITION: CHEMICAL AND BIOCHEMICAL PROBLEMS", *supra*, Hol, W. G. J. (1989, *supra*) and Hol, W. G. J., (1986, *supra*).

In lieu of such direct comparative evaluations of candidate polypeptide variants, screening assays may be used to identify such molecules. Such assays will preferably exploit the capacity of the variant to catalyse the conversion of sucrose to isomaltulose.

2.5 Polypeptide derivatives

With reference to suitable derivatives of the invention, such derivatives include amino acid deletions and/or additions to a polypeptide, fragment or variant of the invention, wherein said derivatives catalyse the conversion of sucrose to isomaltulose. "Additions" of amino acids may include fusion of the polypeptides, fragments and polypeptide variants of the invention with other polypeptides or proteins. For example, it will be appreciated that said polypeptides, fragments or variants may be incorporated into larger polypeptides, and that such larger polypeptides may also be expected to catalyse the conversion of sucrose to isomaltulose as mentioned above.

The polypeptides, fragments or variants of the invention may be fused to a further protein, for example, which is not derived from the original host. The further protein may assist in the purification of the fusion protein. For instance, a polyhistidine tag or a maltose binding protein may be used in this respect as described in more detail below. Other possible fusion proteins are those which produce an immunomodulatory response. Particular examples of such proteins include Protein A or glutathione S-transferase (GST).

Other derivatives contemplated by the invention include, but are not limited to, modification to side chains, incorporation of unnatural amino acids and/or their derivatives during peptide, polypeptide or protein synthesis and the use of crosslinkers and other methods which impose conformational constraints on the polypeptides, fragments and variants of the invention.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 37 -

Examples of side chain modifications contemplated by the present invention include modifications of amino groups such as by acylation with acetic anhydride; acylation of amino groups with succinic anhydride and tetrahydrophthalic anhydride; amidination with methylacetimidate; carbamoylation of amino groups with cyanate; 5 pyridoxylation of lysine with pyridoxal-5-phosphate followed by reduction with NaBH₄; reductive alkylation by reaction with an aldehyde followed by reduction with NaBH₄; and trinitrobenzylation of amino groups with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS).

The carboxyl group may be modified by carbodiimide activation via O-acylisourea formation followed by subsequent derivatisation, by way of example, to a 10 corresponding amide.

The guanidine group of arginine residues may be modified by formation of heterocyclic condensation products with reagents such as 2,3-butanedione, phenylglyoxal and glyoxal.

Sulphydryl groups may be modified by methods such as performic acid oxidation 15 to cysteic acid; formation of mercurial derivatives using 4-chloromercuriphenylsulphonic acid, 4-chloromercuribenzoate; 2-chloromercuri-4-nitrophenol, phenylmercury chloride, and other mercurials; formation of a mixed disulphides with other thiol compounds; reaction with maleimide, maleic anhydride or other substituted maleimide; carboxymethylation with iodoacetic acid or iodoacetamide; and carbamoylation with 20 cyanate at alkaline pH.

Tryptophan residues may be modified, for example, by alkylation of the indole ring with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide or sulphonyl halides or by oxidation with N-bromosuccinimide.

Tyrosine residues may be modified by nitration with tetranitromethane to form a 25 3-nitrotyrosine derivative.

The imidazole ring of a histidine residue may be modified by N-carbethoxylation with diethylpyrocarbonate or by alkylation with iodoacetic acid derivatives.

Examples of incorporating unnatural amino acids and derivatives during peptide synthesis include but are not limited to, use of 4-amino butyric acid, 6-aminohexanoic acid, 30 4-amino-3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid, 4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid, t-butylglycine, norleucine, norvaline, phenylglycine, ornithine, sarcosine, 2-thienyl alanine

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 38 -

and/or D-isomers of amino acids. A list of unnatural amino acids contemplated by the present invention is shown in TABLE D.

TABLE D

<i>Non-conventional amino acid</i>	<i>Non-conventional amino acid</i>
α -aminobutyric acid	L-N-methylalanine
α -amino- α -methylbutyrate	L-N-methylarginine
aminocyclopropane-carboxylate	L-N-methylasparagine
aminoisobutyric acid	L-N-methylaspartic acid
aminonorbornyl-carboxylate	L-N-methylcysteine
cyclohexylalanine	L-N-methylglutamine
cyclopentylalanine	L-N-methylglutamic acid
L-N-methylisoleucine	L-N-methylhistidine
D-alanine	L-N-methylleucine
D-arginine	L-N-methyllysine
D-aspartic acid	L-N-methylmethionine
D-cysteine	L-N-methylnorleucine
D-glutamate	L-N-methylnorvaline
D-glutamic acid	L-N-methylornithine
D-histidine	L-N-methylphenylalanine
D-isoleucine	L-N-methylproline
D-leucine	L-N-methylserine
D-lysine	L-N-methylthreonine
D-methionine	L-N-methyltryptophan
D-ornithine	L-N-methyltyrosine
D-phenylalanine	L-N-methylvaline
D-proline	L-N-methylethylglycine
D-serine	L-N-methyl-t-butylglycine

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

<i>Non-conventional amino acid</i>	<i>Non-conventional amino acid</i>
D-threonine	L-norleucine
D-tryptophan	L-norvaline
D-tyrosine	α -methyl-aminoisobutyrate
D-valine	α -methyl- γ -aminobutyrate
D- α -methylalanine	α -methylcyclohexylalanine
D- α -methylarginine	α -methylcyclopentylalanine
D- α -methylasparagine	α -methyl- α -naphthylalanine
D- α -methylaspartate	α -methylpenicillamine
D- α -methylcysteine	N-(4-aminobutyl)glycine
D- α -methylglutamine	N-(2-aminoethyl)glycine
D- α -methylhistidine	N-(3-aminopropyl)glycine
D- α -methylisoleucine	N-amino- α -methylbutyrate
D- α -methylleucine	α -naphthylalanine
D- α -methyllysine	N-benzylglycine
D- α -methylmethionine	N-(2-carbamylethyl)glycine
D- α -methylornithine	N-(carbamylmethyl)glycine
D- α -methylphenylalanine	N-(2-carboxyethyl)glycine
D- α -methylproline	N-(carboxymethyl)glycine
D- α -methylserine	N-cyclobutylglycine
D- α -methylthreonine	N-cycloheptylglycine
D- α -methyltryptophan	N-cyclohexylglycine
D- α -methyltyrosine	N-cyclodecylglycine
L- α -methylleucine	L- α -methyllysine
L- α -methylmethionine	L- α -methylnorleucine
L- α -methylnorvaline	L- α -methylornithine
L- α -methylphenylalanine	L- α -methylproline

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 40 -

<i>Non-conventional amino acid</i>	<i>Non-conventional amino acid</i>
L- α -methylserine	L- α -methylthreonine
L- α -methyltryptophan	L- α -methyltyrosine
L- α -methylvaline	L-N-methylhomophenylalanine
N-(N-(2,2-diphenylethyl carbamylmethyl)glycine	N-(N-(3,3-diphenylpropyl carbamylmethyl)glycine
1-carboxy-1-(2,2-diphenyl-ethyl amino)cyclopropane	

Also contemplated is the use of crosslinkers, for example, to stabilise 3D conformations of the polypeptides, fragments or variants of the invention, using homobifunctional crosslinkers such as bifunctional imido esters having (CH₂)_n spacer groups with n = 1 to n = 6, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters and hetero-bifunctional reagents which usually contain an amino-reactive moiety such as N-hydroxysuccinimide and another group specific-reactive moiety such as maleimido or dithio moiety or carbodiimide. In addition, peptides can be conformationally constrained, for example, by introduction of double bonds between C _{α} and C _{β} atoms of amino acids, by incorporation of C _{α} and N _{α} -methylamino acids, and by formation of cyclic peptides or analogues by introducing covalent bonds such as forming an amide bond between the N and C termini between two side chains or between a side chain and the N or C terminus of the peptides or analogues. For example, reference may be made to: Marlowe (1993, *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters* 3: 437-44) who describes peptide cyclisation on TFA resin using trimethylsilyl (TMSE) ester as an orthogonal protecting group; Pallin and Tam (1995, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 2021-2022) who describe the cyclisation of unprotected peptides in aqueous solution by oxime formation; Algin *et al* (1994, *Tetrahedron Letters* 35: 9633-9636) who disclose solid-phase synthesis of head-to-tail cyclic peptides via lysine side-chain anchoring; Kates *et al* (1993, *Tetrahedron Letters* 34: 1549-1552) who describe the production of head-to-tail cyclic peptides by three-dimensional solid phase strategy; Tumelty *et al* (1994, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1067-1068) who describe the synthesis of cyclic peptides from an immobilised activated intermediate, wherein activation of the immobilised peptide is carried out with the N-protecting group intact and the N-protecting group is subsequently removed leading to cyclisation; McMurray *et al* (1994, *Peptide Research* 7: 195-206) who disclose head-to-tail

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 41 -

cyclisation of peptides attached to insoluble supports by means of the side chains of aspartic and glutamic acid; Hruby *et al* (1994, *Reactive Polymers* 22: 231-241) who teach an alternate method for cyclising peptides *via* solid supports; and Schmidt and Langer (1997, *J. Peptide Res.* 49: 67-73) who disclose a method for synthesising cyclotetrapeptides and cyclopentapeptides. The foregoing methods may be used to produce conformationally constrained polypeptides that catalyse the conversion of sucrose to isomaltulose.

The invention also contemplates polypeptides, fragments or variants of the invention that have been modified using ordinary molecular biological techniques so as to improve their resistance to proteolytic degradation or to optimise solubility properties or to render them more suitable as an immunogenic agent.

2.6 Methods of preparing the polypeptides of the invention

Polypeptides of the invention may be prepared by any suitable procedure known to those of skill in the art. For example, the polypeptides may be prepared by a procedure including the steps of: (a) preparing a recombinant polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or variant or derivative of these, which nucleotide sequence is operably linked to transcriptional and translational regulatory nucleic acid; (b) introducing the recombinant polynucleotide into a suitable host cell; (c) culturing the host cell to express recombinant polypeptide from said recombinant polynucleotide; and (d) isolating the recombinant polypeptide. Suitably, said nucleotide sequence comprises the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9.

The recombinant polynucleotide is preferably in the form of an expression vector that may be a self-replicating extra-chromosomal vector such as a plasmid, or of a vector that integrates into a host genome.

The transcriptional and translational regulatory nucleic acid will generally need to be appropriate for the host cell used for expression. Numerous types of appropriate expression vectors and suitable regulatory sequences are known in the art for a variety of host cells.

Typically, the transcriptional and translational regulatory nucleic acid may include, but is not limited to, promoter sequences, leader or signal sequences, ribosomal

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 42 -

binding sites, transcriptional start and stop sequences, translational start and termination sequences, and enhancer or activator sequences.

Constitutive or inducible promoters as known in the art are contemplated by the invention. The promoters may be either naturally occurring promoters, or hybrid promoters
5 that combine elements of more than one promoter.

In a preferred embodiment, the expression vector contains a selectable marker gene to allow the selection of transformed host cells. Selectable marker genes are well known in the art and will vary with the host cell used.

The expression vector may also include a fusion partner (typically provided by the
10 expression vector) so that the recombinant polypeptide of the invention is expressed as a fusion polypeptide with said fusion partner. The main advantage of fusion partners is that they assist identification and/or purification of said fusion polypeptide.

In order to express said fusion polypeptide, it is necessary to ligate a
15 polynucleotide according to the invention into the expression vector so that the translational reading frames of the fusion partner and the polynucleotide coincide.

Well known examples of fusion partners include, but are not limited to, glutathione-S-transferase (GST), Fc portion of human IgG, maltose binding protein (MBP) and hexahistidine (HIS₆), which are particularly useful for isolation of the fusion
20 polypeptide by affinity chromatography. For the purposes of fusion polypeptide purification by affinity chromatography, relevant matrices for affinity chromatography include, but are not restricted to, glutathione-, amylose-, and nickel- or cobalt-conjugated resins. Many such matrices are available in "kit" form, such as the QIAexpress™ system (Qiagen) useful with (HIS₆) fusion partners and the Pharmacia GST purification system. In
25 a preferred embodiment, the recombinant polynucleotide is expressed in the commercial vector pFLAG as described more fully hereinafter.

Another fusion partner well known in the art is green fluorescent protein (GFP). This fusion partner serves as a fluorescent "tag" which allows the fusion polypeptide of the invention to be identified by fluorescence microscopy or by flow cytometry. The GFP tag is useful when assessing subcellular localisation of the fusion polypeptide of the invention,
30 or for isolating cells which express the fusion polypeptide of the invention. Flow

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 43 -

cytometric methods such as fluorescence activated cell sorting (FACS) are particularly useful in this latter application.

5 Preferably, the fusion partners also have protease cleavage sites, such as for Factor X_a or Thrombin, which allow the relevant protease to partially digest the fusion polypeptide of the invention and thereby liberate the recombinant polypeptide of the invention therefrom. The liberated polypeptide can then be isolated from the fusion partner by subsequent chromatographic separation.

10 Fusion partners according to the invention also include within their scope "epitope tags", which are usually short peptide sequences for which a specific antibody is available. Well known examples of epitope tags for which specific monoclonal antibodies are readily available include c-Myc, influenza virus, haemagglutinin and FLAG tags.

15 The step of introducing into the host cell the recombinant polynucleotide may be effected by any suitable method including transfection, and transformation, the choice of which will be dependent on the host cell employed. Such methods are well known to those of skill in the art.

20 Recombinant polypeptides of the invention may be produced by culturing a host cell transformed with an expression vector containing nucleic acid encoding a polypeptide, biologically active fragment, variant or derivative according to the invention. The conditions appropriate for protein expression will vary with the choice of expression vector and the host cell. This is easily ascertained by one skilled in the art through routine experimentation.

25 Suitable host cells for expression may be prokaryotic or eukaryotic. One preferred host cell for expression of a polypeptide according to the invention is a bacterium. The bacterium used may be *Escherichia coli*. Alternatively, the host cell may be an insect cell such as, for example, *SF9* cells that may be utilised with a baculovirus expression system.

30 The recombinant protein may be conveniently prepared by a person skilled in the art using standard protocols as for example described in Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, 1989), in particular Sections 16 and 17; Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley & Sons, Inc. 1994-1998), in particular Chapters 10 and 16; and

Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), in particular Chapters 1, 5 and 6.

Alternatively, the polypeptide, fragments, variants or derivatives of the invention may be synthesised using solution synthesis or solid phase synthesis as described, for example, in Chapter 9 of Atherton and Shephard (*supra*) and in Roberge *et al* (1995, *Science* 269: 202).

3. Polynucleotides of the invention

3.1 Method of isolating polynucleotides encoding isomaltulose-producing sucrose isomerase enzymes

10 The present invention features a method of isolating novel polynucleotides encoding isomaltulose-producing sucrose isomerase enzymes. The method comprises obtaining an environmental sample from a location in which organisms capable of converting sucrose to isomaltulose have a selective advantage. The environmental sample may comprise, for instance, soil or plant matter including plant surfaces or tissues (*e.g.*,
15 flowers). The environmental sample is preferably obtained from a location that is subject to periodic or constant availability of substantial sucrose concentrations including, but not restricted to, a factory involved in processing or storage sugar-containing plants or plant parts and a field containing remnants of harvested sugar-containing plants. Preferably, but not exclusively, the sugar-containing plant is sugar beet or sugarcane.

20 The method preferably further comprises selecting or otherwise enriching for dual sucrose- and isomaltulose-metabolising organisms that are capable of using both sucrose and isomaltulose as carbon sources for growth. For example, the organisms may be grown on an isomaltulose-containing medium for a time and under conditions sufficient to select or enrich for isomaltulose-metabolising organisms. Organisms thus selected or enriched
25 may be grown subsequently on a sucrose-containing medium for a time and under conditions sufficient to select or enrich for dual isomaltulose- and sucrose-metabolising organisms. The order in which the organisms are grown on the aforesaid media may be reversed if desired.

30 Organisms are screened for those that produce isomaltulose from sucrose using at least one assay that quantifies the production of isomaltulose. Preferably, but not exclusively, the assay is an aniline/diphenylamine assay such as, for example, disclosed in

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 45 -

Examples 3 and 4 *infra*. Alternatively, or in addition thereto, an assay is preferably employed which quantifies the conversion of sucrose to isomaltulose. A suitable assay of this type may quantify the isomaltulose product relative to sucrose and/or related metabolites. For example the capillary electrophoresis assay described in Examples 5 and 6
5 *infra* may be used in this regard.

Sucrose isomerase-encoding polynucleotides are then isolated from isomaltulose-producing organisms. This isolation preferably comprises screening a nucleic acid library derived from an isomaltulose-producing organism and optionally subclones of this library for polynucleotides encoding isomaltulose-producing sucrose isomerase enzymes. The
10 screening is suitably facilitated using primers or probes that are specific for sucrose isomerase-encoding polynucleotides, as for example disclosed herein. The nucleic acid library is preferably an expression library, which is suitably produced from genomic nucleic acid or cDNA. Desired polynucleotides may be detected using assays that quantify the production of isomaltulose such as, for example, described above. An exemplary
15 protocol for functional screening of polynucleotides is described in Examples 7 to 12.

Clones testing positive for isomaltulose production may then be subjected to nucleic acid sequence analysis to identify genes and/or gene products novel in relation to known sucrose isomerases. Enzymatic activities, yields and purities of desired products may then be compared to known reference enzymes under suitable conditions, to identify
20 isolated polynucleotides that encode polypeptides with superior sucrose isomerase activity.

3.2 Polynucleotides encoding polypeptides of the invention

The invention further provides a polynucleotide that encodes a polypeptide, fragment, variant or derivative as defined above. In one embodiment, the polynucleotide comprises the entire sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1
25 corresponds to the full-length *E. rhapontici* 1899 bp sucrose isomerase coding sequence. This sequence defines: (1) a first region encoding a signal peptide, from nucleotide 1 through about nucleotide 108; and (2) a second region encoding a mature sucrose isomerase enzyme from about nucleotide 109 through nucleotide 1899. Suitably, the polynucleotide comprises the sequence set forth in SEQ ID NO: 3, which defines the
30 region encoding the mature sucrose isomerase polypeptide without the signal sequence. The coding sequence of the present invention comprises an additional 594 bp of sequence

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 46 -

at the 3' end relative to the *E. rhapontici* sucrose isomerase-encoding polynucleotide of Mattes *et al.* (*supra*).

In another embodiment, the polynucleotide comprises the entire sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO: 8. SEQ ID NO: 8 corresponds to the 1791-bp full-length sucrose isomerase coding sequence of the bacterial isolate 68J. SEQ ID NO: 12 defines: (1) a first region encoding a signal peptide, from nucleotide 1 through about nucleotide 99; and (2) a second region encoding a mature sucrose isomerase enzyme from about nucleotide 100 through nucleotide 1791. Suitably, the polynucleotide comprises the sequence set forth in SEQ ID NO: 10, which defines the region encoding the mature sucrose isomerase polypeptide without the signal sequence.

3.3 Polynucleotide variants

In general, polynucleotide variants according to the invention comprise regions that show at least 60%, more suitably at least 70%, preferably at least 80%, and more preferably at least 90% sequence identity over a reference polynucleotide sequence of identical size ("*comparison window*") or when compared to an aligned sequence in which the alignment is performed by a computer homology program known in the art. What constitutes suitable variants may be determined by conventional techniques. For example, a polynucleotide according to any one of SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9 can be mutated using random mutagenesis (*e.g.*, transposon mutagenesis), oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or non-variant version of an isolated natural promoter according to the invention.

Oligonucleotide-mediated mutagenesis is a preferred method for preparing nucleotide substitution variants of a polynucleotide of the invention. This technique is well known in the art as, for example, described by Adelman *et al.* (1983, *DNA* 2:183). Briefly, a polynucleotide according to any one of SEQ ID NO: 1, 3, 7 or 9 is altered by hybridising an oligonucleotide encoding the desired mutation to a template DNA, wherein the template is the single-stranded form of a plasmid or bacteriophage containing the unaltered or parent DNA sequence. After hybridisation, a DNA polymerase is used to synthesise an entire second complementary strand of the template that will thus incorporate the oligonucleotide primer, and will code for the selected alteration in said parent DNA sequence.

Generally, oligonucleotides of at least 25 nucleotides in length are used. An optimal oligonucleotide will have 12 to 15 nucleotides that are completely complementary

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 47 -

to the template on either side of the nucleotide(s) coding for the mutation. This ensures that the oligonucleotide will hybridise properly to the single-stranded DNA template molecule.

5 The DNA template can be generated by those vectors that are either derived from bacteriophage M13 vectors, or those vectors that contain a single-stranded phage origin of replication as described by Viera *et al.* (1987, *Methods Enzymol.* 153:3). Thus, the DNA that is to be mutated may be inserted into one of the vectors to generate single-stranded template. Production of single-stranded template is described, for example, in Sections 4.21-4.41 of Sambrook *et al.* (1989, *supra*).

10 Alternatively, the single-stranded template may be generated by denaturing double-stranded plasmid (or other DNA) using standard techniques.

For alteration of the native DNA sequence, the oligonucleotide is hybridised to the single-stranded template under suitable hybridisation conditions. A DNA polymerising enzyme, usually the Klenow fragment of DNA polymerase I, is then added to synthesise the complementary strand of the template using the oligonucleotide as a primer for synthesis. A heteroduplex molecule is thus formed such that one strand of DNA encodes the mutated form of the polypeptide or fragment under test, and the other strand (the original template) encodes the native unaltered sequence of the polypeptide or fragment under test. This heteroduplex molecule is then transformed into a suitable host cell, usually a prokaryote such as *E. coli*. After the cells are grown, they are plated onto agarose plates and screened using the oligonucleotide primer having a detectable label to identify the bacterial colonies having the mutated DNA. The resultant mutated DNA fragments are then cloned into suitable expression hosts such as *E. coli* using conventional technology and clones that retain the desired sucrose isomerase activity are detected. Where the clones have been derived using random mutagenesis techniques, positive clones would have to be sequenced in order to detect the mutation.

25 Alternatively, linker-scanning mutagenesis of DNA may be used to introduce clusters of point mutations throughout a sequence of interest that has been cloned into a plasmid vector. For example, reference may be made to Ausubel *et al.*, *supra*, (in particular, Chapter 8.4) which describes a first protocol that uses complementary oligonucleotides and requires a unique restriction site adjacent to the region that is to be mutagenised. A nested series of deletion mutations is first generated in the region. A pair of complementary oligonucleotides is synthesised to fill in the gap in the sequence of

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 48 -

interest between the linker at the deletion endpoint and the nearby restriction site. The linker sequence actually provides the desired clusters of point mutations as it is moved or "scanned" across the region by its position at the varied endpoints of the deletion mutation series. An alternate protocol is also described by Ausubel *et al.*, *supra*, which makes use of site directed mutagenesis procedures to introduce small clusters of point mutations throughout the target region. Briefly, mutations are introduced into a sequence by annealing a synthetic oligonucleotide containing one or more mismatches to the sequence of interest cloned into a single-stranded M13 vector. This template is grown in an *E. coli dut ung* strain, which allows the incorporation of uracil into the template strand. The oligonucleotide is annealed to the purified template and extended with T4 DNA polymerase to create a double-stranded heteroduplex. Finally, the heteroduplex is introduced into a wild-type *E. coli* strain, which will prevent replication of the template strand due to the presence of uracil in template strand, thereby resulting in plaques containing only mutated DNA.

Region-specific mutagenesis and directed mutagenesis using PCR may also be employed to construct polynucleotide variants according to the invention. In this regard, reference may be made, for example, to Ausubel *et al.*, *supra*, in particular Chapters 8.2A and 8.5.

Alternatively, suitable polynucleotide sequence variants of the invention may be prepared according to the following procedure: (i) creating primers which are optionally degenerate wherein each comprises a portion of a reference polynucleotide encoding a reference polypeptide or fragment of the invention, preferably encoding the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 1, 3, 7 or 9; (ii) obtaining a nucleic acid extract from a sucrose-metabolising organism, which is preferably a bacterium, more preferably from a species obtained from a location in which organisms capable of converting sucrose to isomaltulose could obtain a selective advantage as described herein; and (iii) using said primers to amplify, *via* nucleic acid amplification techniques, at least one amplification product from said nucleic acid extract, wherein said amplification product corresponds to a polynucleotide variant.

Suitable nucleic acid amplification techniques are well known to the skilled addressee, and include polymerase chain reaction (PCR) as for example described in Ausubel *et al.* (*supra*); strand displacement amplification (SDA) as for example described in U.S. Patent No 5,422,252; rolling circle replication (RCR) as for example described in Liu *et al.*, (1996, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 1537, 1594) and International application WO 98/15715, and

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 49 -

92/01813) and Lizardi *et al.*, (International Application WO 97/19193); nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) as for example described by Sookninan *et al.*, (1994, *Biotechniques* 17:1077-1080); and Q- β replicase amplification as for example described by Tyagi *et al.*, (1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5395-5400).

5 Typically, polynucleotide variants that are substantially complementary to a reference polynucleotide are identified by blotting techniques that include a step whereby nucleic acids are immobilised on a matrix (preferably a synthetic membrane such as nitrocellulose), followed by a hybridisation step, and a detection step. Southern blotting is used to identify a complementary DNA sequence; northern blotting is used to identify a
10 complementary RNA sequence. Dot blotting and slot blotting can be used to identify complementary DNA/DNA, DNA/RNA or RNA/RNA polynucleotide sequences. Such techniques are well known by those skilled in the art, and have been described in Ausubel *et al.* (1994-1998, *supra*) at pages 2.9.1 through 2.9.20.

15 According to such methods, Southern blotting involves separating DNA molecules according to size by gel electrophoresis, transferring the size-separated DNA to a synthetic membrane, and hybridising the membrane-bound DNA to a complementary nucleotide sequence labelled radioactively, enzymatically or fluorochromatically. In dot blotting and slot blotting, DNA samples are directly applied to a synthetic membrane prior to hybridisation as above.

20 An alternative blotting step is used when identifying complementary polynucleotides in a cDNA or genomic DNA library, such as through the process of plaque or colony hybridisation. A typical example of this procedure is described in Sambrook *et al.* ("Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Press, 1989) Chapters 8-12.

25 Typically, the following general procedure can be used to determine hybridisation conditions. Polynucleotides are blotted/transferred to a synthetic membrane, as described above. A reference polynucleotide such as a polynucleotide of the invention is labelled as described above, and the ability of this labelled polynucleotide to hybridise with an immobilised polynucleotide is analysed.

30 A skilled addressee will recognise that a number of factors influence hybridisation. The specific activity of radioactively labelled polynucleotide sequence should typically be greater than or equal to about 10^8 dpm/mg to provide a detectable

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 50 -

signal. A radiolabelled nucleotide sequence of specific activity 10^8 to 10^9 dpm/mg can detect approximately 0.5 pg of DNA. It is well known in the art that sufficient DNA must be immobilised on the membrane to permit detection. It is desirable to have excess immobilised DNA, usually 10 μ g. Adding an inert polymer such as 10% (w/v) dextran sulfate (MW 500,000) or polyethylene glycol 6000 during hybridisation can also increase the sensitivity of hybridisation (see Ausubel *supra* at 2.10.10).

To achieve meaningful results from hybridisation between a polynucleotide immobilised on a membrane and a labelled polynucleotide, a sufficient amount of the labelled polynucleotide must be hybridised to the immobilised polynucleotide following washing. Washing ensures that the labelled polynucleotide is hybridised only to the immobilised polynucleotide with a desired degree of complementarity to the labelled polynucleotide.

It will be understood that polynucleotide variants according to the invention will hybridise to a reference polynucleotide under at least low stringency conditions. Reference herein to low stringency conditions includes and encompasses from at least about 1% v/v to at least about 15% v/v formamide and from at least about 1 M to at least about 2 M salt for hybridisation at 42°C, and at least about 1 M to at least about 2 M salt for washing at 42°C. Low stringency conditions also may include 1% Bovine Serum Albumin (BSA), 1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS for hybridisation at 65°C, and (i) 2xSSC, 0.1% SDS; or (ii) 0.5% BSA, 1 mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7.2), 5% SDS for washing at room temperature.

Suitably, the polynucleotide variants hybridise to a reference polynucleotide under at least medium stringency conditions. Medium stringency conditions include and encompass from at least about 16% v/v to at least about 30% v/v formamide and from at least about 0.5 M to at least about 0.9 M salt for hybridisation at 42°C, and at least about 0.1 M to at least about 0.2 M salt for washing at 55°C. Medium stringency conditions also may include 1% Bovine Serum Albumin (BSA), 1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS for hybridisation at 65°C, and (i) 2 x SSC, 0.1% SDS; or (ii) 0.5% BSA, 1 mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7.2), 5% SDS for washing at 60-65°C.

Preferably, the polynucleotide variants hybridise to a reference polynucleotide under high stringency conditions. High stringency conditions include and encompass from at least about 31% v/v to at least about 50% v/v formamide and from about 0.01 M to

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 51 -

about 0.15 M salt for hybridisation at 42°C, and about 0.01 M to about 0.02 M salt for washing at 55°C. High stringency conditions also may include 1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS for hybridisation at 65°C, and (i) 0.2 x SSC, 0.1% SDS; or (ii) 0.5% BSA, 1mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7.2), 1% SDS for washing at a temperature in excess of 65°C.

Other stringent conditions are well known in the art. A skilled addressee will recognise that various factors can be manipulated to optimise the specificity of the hybridisation. Optimisation of the stringency of the final washes can serve to ensure a high degree of hybridisation. For detailed examples, see Ausubel *et al.*, *supra* at pages 2.10.1 to 2.10.16 and Sambrook *et al.* (1989, *supra*) at sections 1.101 to 1.104.

While stringent washes are typically carried out at temperatures from about 42°C to 68°C, one skilled in the art will appreciate that other temperatures may be suitable for stringent conditions. Maximum hybridisation rate typically occurs at about 20°C to 25°C below the T_m for formation of a DNA-DNA hybrid. It is well known in the art that the T_m is the melting temperature, or temperature at which two complementary polynucleotide sequences dissociate. Methods for estimating T_m are well known in the art (see Ausubel *et al.*, *supra* at page 2.10.8).

In general, the T_m of a perfectly matched duplex of DNA may be predicted as an approximation by the formula:

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} M) + 0.41 (\%G+C) - 0.63 (\% \text{ formamide}) - (600/\text{length})$$

wherein: M is the concentration of Na⁺, preferably in the range of 0.01 molar to 0.4 molar; %G+C is the sum of guanosine and cytosine bases as a percentage of the total number of bases, within the range between 30% and 75% G+C; % formamide is the percent formamide concentration by volume; length is the number of base pairs in the DNA duplex.

The T_m of a duplex DNA decreases by approximately 1°C with every increase of 1% in the number of randomly mismatched base pairs. Washing is generally carried out at T_m - 15 °C for high stringency, or T_m - 30 °C for moderate stringency.

In a preferred hybridisation procedure, a membrane (*e.g.*, a nitrocellulose membrane or a nylon membrane) containing immobilised DNA is hybridised overnight at

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 52 -

42°C in a hybridisation buffer (50% deionised formamide, 5xSSC, 5x Denhardt's solution (0.1% ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone and 0.1% bovine serum albumin), 0.1% SDS and 200 mg/mL denatured salmon sperm DNA) containing labelled probe. The membrane is then subjected to two sequential medium stringency washes (*i.e.*, 2xSSC, 0.1% SDS for 15 min at 45°C, followed by 2xSSC, 0.1% SDS for 15 min at 50°C), followed by two sequential higher stringency washes (*i.e.*, 0.2xSSC, 0.1% SDS for 12 min at 55°C followed by 0.2xSSC and 0.1%SDS solution for 12 min at 65-68°C).

Methods for detecting a labelled polynucleotide hybridised to an immobilised polynucleotide are well known to practitioners in the art. Such methods include autoradiography, phosphorimaging, and chemiluminescent, fluorescent and colorimetric detection.

4. Antigen-binding molecules

The invention also contemplates antigen-binding molecules that bind specifically to the aforementioned polypeptides, fragments, variants and derivatives. Preferably, an antigen-binding molecule according to the invention is immuno-interactive with any one or more of the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 19, 20, 21, 22, 23 and 24 or variants thereof.

For example, the antigen-binding molecules may comprise whole polyclonal antibodies. Such antibodies may be prepared, for example, by injecting a polypeptide, fragment, variant or derivative of the invention into a production species, which may include mice or rabbits, to obtain polyclonal antisera. Methods of producing polyclonal antibodies are well known to those skilled in the art. Exemplary protocols which may be used are described for example in Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, (John Wiley & Sons, Inc, 1991), and Ausubel *et al.*, (1994-1998, *supra*), in particular Section III of Chapter 11.

In lieu of the polyclonal antisera obtained in the production species, monoclonal antibodies may be produced using the standard method as described, for example, by Köhler and Milstein (1975, *Nature* 256, 495-497), or by more recent modifications thereof as described, for example, in Coligan *et al.*, (1991, *supra*) by immortalising spleen or other antibody producing cells derived from a production species which has been inoculated with one or more of the polypeptides, fragments, variants or derivatives of the invention.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 53 -

The invention also contemplates as antigen-binding molecules Fv, Fab, Fab' and F(ab')₂ immunoglobulin fragments.

Alternatively, the antigen-binding molecule may comprise a synthetic stabilised Fv fragment. Exemplary fragments of this type include single chain Fv fragments (sFv, frequently termed scFv) in which a peptide linker is used to bridge the N terminus or C terminus of a V_H domain with the C terminus or N-terminus, respectively, of a V_L domain. ScFvs lack all constant parts of whole antibodies and are not able to activate complement. Suitable peptide linkers for joining the V_H and V_L domains are those which allow the V_H and V_L domains to fold into a single polypeptide chain having an antigen binding site with a three dimensional structure similar to that of the antigen binding site of a whole antibody from which the Fv fragment is derived. Linkers having the desired properties may be obtained by the method disclosed in U.S. Patent No 4,946,778. However, in some cases a linker is absent. ScFvs may be prepared, for example, in accordance with methods outlined in Kreber *et al.* (Kreber *et al.* 1997, *J. Immunol. Methods*; **201**(1): 35-55). Alternatively, they may be prepared by methods described in U.S. Patent No 5,091,513, European Patent No 239,400 or the articles by Winter and Milstein (1991, *Nature* **349**:293) and Plückthun *et al.* (1996, In *Antibody engineering: A practical approach*. 203-252).

Alternatively, the synthetic stabilised Fv fragment comprises a disulphide stabilised Fv (dsFv) in which cysteine residues are introduced into the V_H and V_L domains such that in the fully folded Fv molecule the two residues will form a disulphide bond therebetween. Suitable methods of producing dsFv are described for example in (Glockscuther *et al.* *Biochem.* **29**: 1363-1367; Reiter *et al.* 1994, *J. Biol. Chem.* **269**: 18327-18331; Reiter *et al.* 1994, *Biochem.* **33**: 5451-5459; Reiter *et al.* 1994, *Cancer Res.* **54**: 2714-2718; Webber *et al.* 1995, *Mol. Immunol.* **32**: 249-258).

Also contemplated as antigen-binding molecules are single variable region domains (termed dAbs) as for example disclosed in Ward *et al.* (1989, *Nature* **341**: 544-546); Hamers-Casterman *et al.* (1993, *Nature.* **363**: 446-448); Davies & Riechmann, (1994, *FEBS Lett.* **339**: 285-290).

Alternatively, the antigen-binding molecule may comprise a "minibody". In this regard, minibodies are small versions of whole antibodies, which encode in a single chain the essential elements of a whole antibody. Suitably, the minibody is comprised of the V_H

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 54 -

and V_L domains of a native antibody fused to the hinge region and CH3 domain of the immunoglobulin molecule as, for example, disclosed in U.S. Patent No 5,837,821.

In an alternate embodiment, the antigen binding molecule may comprise non-immunoglobulin derived, protein frameworks. For example, reference may be made to Ku & Schultz, (1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 652-6556) which discloses a four-helix bundle protein cytochrome b562 having two loops randomised to create complementarity determining regions (CDRs), which have been selected for antigen binding.

The antigen-binding molecule may be multivalent (*i.e.*, having more than one antigen binding site). Such multivalent molecules may be specific for one or more antigens. Multivalent molecules of this type may be prepared by dimerisation of two antibody fragments through a cysteinyl-containing peptide as, for example disclosed by Adams *et al.*, (1993, *Cancer Res.* **53**: 4026-4034) and Cumber *et al.* (1992, *J. Immunol.* **149**: 120-126). Alternatively, dimerisation may be facilitated by fusion of the antibody fragments to amphiphilic helices that naturally dimerise (Pack P. Plünckthun, 1992, *Biochem.* **31**: 1579-1584), or by use of domains (such as the leucine zippers jun and fos) that preferentially heterodimerise (Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* **148**: 1547-1553). In an alternate embodiment, the multivalent molecule may comprise a multivalent single chain antibody (multi-scFv) comprising at least two scFvs linked together by a peptide linker. In this regard, non-covalently or covalently linked scFv dimers termed "diabodies" may be used. Multi-scFvs may be bispecific or greater depending on the number of scFvs employed having different antigen binding specificities. Multi-scFvs may be prepared for example by methods disclosed in U.S. Patent No. 5,892,020.

The antigen-binding molecules of the invention may be used for affinity chromatography in isolating a natural or recombinant polypeptide or biologically active fragment of the invention. For example reference may be made to immunoaffinity chromatographic procedures described in Chapter 9.5 of Coligan *et al.*, (1995-1997, *supra*).

The antigen-binding molecules can be used to screen expression libraries for variant polypeptides of the invention as described herein. They can also be used to detect and/or isolate the polypeptides, fragments, variants and derivatives of the invention. Thus, the invention also contemplates the use of antigen-binding molecules to isolate sucrose isomerase enzymes using , for example, any suitable immunoaffinity based method

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 55 -

including, but not limited to, immunochromatography and immunoprecipitation. A preferred method utilises solid phase adsorption in which anti-sucrose isomerase antigen-binding molecules are attached to a suitable resin, the resin is contacted with a sample suspected of containing sucrose isomerases, and the sucrose isomerases, if any, are subsequently eluted from the resin. Preferred resins include: Sepharose® (Pharmacia), Poros® resins (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis), Actigel Superflow™ resins (Sterogene Bioseparations Inc., Carlsbad Calif.), and Dynabeads™ (DynaL Inc., Lake Success, N.Y.).

5. *Methods of Detection*

10 5.1 Detection of polypeptides according to the invention

The invention also extends to a method of detecting in a sample a polypeptide, fragment, variant or derivative as broadly described above, comprising contacting the sample with an antigen-binding molecule as described in Section 4 and detecting the presence of a complex comprising the said antigen-binding molecule and the said polypeptide, fragment, variant or derivative in said contacted sample.

Any suitable technique for determining formation of the complex may be used. For example, an antigen-binding molecule according to the invention, having a reporter molecule associated therewith may be utilised in immunoassays. Such immunoassays include, but are not limited to, radioimmunoassays (RIAs), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and immunochromatographic techniques (ICTs), Western blotting which are well known those of skill in the art. For example, reference may be made to "CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY" (1994, *supra*) which discloses a variety of immunoassays that may be used in accordance with the present invention. Immunoassays may include competitive assays as understood in the art or as for example described *infra*. It will be understood that the present invention encompasses qualitative and quantitative immunoassays.

Suitable immunoassay techniques are described for example in US Patent Nos. 4,016,043, 4,424,279 and 4,018,653. These include both single-site and two-site assays of the non-competitive types, as well as the traditional competitive binding assays. These assays also include direct binding of a labelled antigen-binding molecule to a target antigen.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 56 -

Two site assays are particularly favoured for use in the present invention. A number of variations of these assays exist, all of which are intended to be encompassed by the present invention. Briefly, in a typical forward assay, an unlabelled antigen-binding molecule such as an unlabelled antibody is immobilised on a solid substrate and the sample
5 to be tested brought into contact with the bound molecule. After a suitable period of incubation, for a period of time sufficient to allow formation of an antibody-antigen complex, another antigen-binding molecule, suitably a second antibody specific to the antigen, labelled with a reporter molecule capable of producing a detectable signal is then added and incubated, allowing time sufficient for the formation of another complex of
10 antibody-antigen-labelled antibody. Any unreacted material is washed away and the presence of the antigen is determined by observation of a signal produced by the reporter molecule. The results may be either qualitative, by simple observation of the visible signal, or may be quantitated by comparing with a control sample containing known amounts of antigen. Variations on the forward assay include a simultaneous assay, in which both
15 sample and labelled antibody are added simultaneously to the bound antibody. These techniques are well known to those skilled in the art, including minor variations as will be readily apparent. In accordance with the present invention, the sample is one that might contain a sucrose isomerase such as from a sucrose-metabolising organism. Preferably, the sucrose-metabolising organism is a bacterium, which is suitably obtained from a location
20 in which organisms that are capable of converting sucrose to isomaltulose have a selective advantage.

In the typical forward assay, a first antibody having specificity for the antigen or antigenic parts thereof is either covalently or passively bound to a solid surface. The solid surface is typically glass or a polymer, the most commonly used polymers being cellulose,
25 polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl chloride or polypropylene. The solid supports may be in the form of tubes, beads, discs of microplates, or any other surface suitable for conducting an immunoassay. The binding processes are well known in the art and generally consist of cross-linking, covalently binding or physically adsorbing. The polymer-antibody complex is washed in preparation for the test sample. An aliquot of the
30 sample to be tested is then added to the solid phase complex and incubated for a period of time sufficient and under suitable conditions to allow binding of any antigen present to the antibody. Following the incubation period, the antigen-antibody complex is washed and dried and incubated with a second antibody specific for a portion of the antigen. The second antibody has generally a reporter molecule associated therewith that is used to

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 57 -

indicate the binding of the second antibody to the antigen. The amount of labelled antibody that binds, as determined by the associated reporter molecule, is proportional to the amount of antigen bound to the immobilised first antibody.

5 An alternative method involves immobilising the antigen in the biological sample and then exposing the immobilised antigen to specific antibody that may or may not be labelled with a reporter molecule. Depending on the amount of target and the strength of the reporter molecule signal, a bound antigen may be detectable by direct labelling with the antibody. Alternatively, a second labelled antibody, specific to the first antibody is exposed to the target-first antibody complex to form a target-first antibody-second antibody tertiary
10 complex. The complex is detected by the signal emitted by the reporter molecule.

From the foregoing, it will be appreciated that the reporter molecule associated with the antigen-binding molecule may include the following:

- (a) direct attachment of the reporter molecule to the antigen-binding molecule;
- (b) indirect attachment of the reporter molecule to the antigen-binding molecule;
15 *i.e.*, attachment of the reporter molecule to another assay reagent which subsequently binds to the antigen-binding molecule; and
- (c) attachment to a subsequent reaction product of the antigen-binding molecule.

20 The reporter molecule may be selected from a group including a chromogen, a catalyst, an enzyme, a fluorochrome, a chemiluminescent molecule, a lanthanide ion such as Europium (Eu^{34}), a radioisotope and a direct visual label.

In the case of a direct visual label, use may be made of a colloidal metallic or non-metallic particle, a dye particle, an enzyme or a substrate, an organic polymer, a latex particle, a liposome, or other vesicle containing a signal producing substance and the like.

25 A large number of enzymes suitable for use as reporter molecules is disclosed in United States Patent Specifications U.S. 4,366,241, U.S. 4,843,000, and U.S. 4,849,338. Suitable enzymes useful in the present invention include alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, luciferase, β -galactosidase, glucose oxidase, lysozyme, malate dehydrogenase and the like. The enzymes may be used alone or in combination with a second enzyme that is in solution.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 58 -

Suitable fluorochromes include, but are not limited to, fluorescein isothiocyanate (FITC), tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC), R-Phycoerythrin (RPE), and Texas Red. Other exemplary fluorochromes include those discussed by Dower *et al.* (International Publication WO 93/06121). Reference also may be made to the
5 fluorochromes described in U.S. Patents 5,573,909 (Singer *et al.*), 5,326,692 (Brinkley *et al.*). Alternatively, reference may be made to the fluorochromes described in U.S. Patent Nos. 5,227,487, 5,274,113, 5,405,975, 5,433,896, 5,442,045, 5,451,663, 5,453,517, 5,459,276, 5,516,864, 5,648,270 and 5,723,218.

In the case of an enzyme immunoassay, an enzyme is conjugated to the second
10 antibody, generally by means of glutaraldehyde or periodate. As will be readily recognised, however, a wide variety of different conjugation techniques exist which are readily available to the skilled artisan. The substrates to be used with the specific enzymes are generally chosen for the production of, upon hydrolysis by the corresponding enzyme, a detectable colour change. Examples of suitable enzymes include those described *supra*. It
15 is also possible to employ fluorogenic substrates, which yield a fluorescent product rather than the chromogenic substrates noted above. In all cases, the enzyme-labelled antibody is added to the first antibody-antigen complex. It is then allowed to bind, and excess reagent is washed away. A solution containing the appropriate substrate is then added to the complex of antibody-antigen-antibody. The substrate will react with the enzyme linked to
20 the second antibody, giving a qualitative visual signal, which may be further quantitated, usually spectrophotometrically, to give an indication of the amount of antigen which was present in the sample.

Fluorescent compounds, such as fluorescein, rhodamine and the lanthanide, europium (EU), may be alternately chemically coupled to antibodies without altering their
25 binding capacity. When activated by illumination with light of a particular wavelength, the fluorochrome-labelled antibody adsorbs the light energy, inducing a state of excitability in the molecule, followed by emission of the light at a characteristic colour visually detectable with a light microscope. The fluorescent-labelled antibody is allowed to bind to the first antibody-antigen complex. After washing off the unbound reagent, the remaining
30 tertiary complex is then exposed to light of an appropriate wavelength. The fluorescence observed indicates the presence of the antigen of interest. Immunofluorometric assays (IFMA) are well established in the art. However, other reporter molecules, such as radioisotope, chemiluminescent or bioluminescent molecules may also be employed.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 59 -

5.2 Detection of polynucleotides according to the invention

In another embodiment, the method for detection comprises detecting expression in a cell of a polynucleotide encoding said polypeptide, fragment, variant or derivative. Expression of the said polynucleotide may be determined using any suitable technique. For example, a labelled polynucleotide encoding a said member may be utilised as a probe in a Northern blot of a RNA extract obtained from the muscle cell. Preferably, a nucleic acid extract from the animal is utilised in concert with oligonucleotide primers corresponding to sense and antisense sequences of a polynucleotide encoding a said member, or flanking sequences thereof, in a nucleic acid amplification reaction such as RT PCR. A variety of automated solid-phase detection techniques is also appropriate. For example, very large scale immobilised primer arrays (VLSIPS™) are used for the detection of nucleic acids as for example described by Fodor *et al.* (1991, *Science* **251**:767-777) and Kazal *et al.* (1996, *Nature Medicine* **2**:753-759). The above generic techniques are well known to persons skilled in the art.

6. Chimeric nucleic acid constructs

6.1 Prokaryotic expression

The present invention further relates to a chimeric nucleic acid construct designed for genetic transformation of prokaryotic cells, comprising a polynucleotide, fragment or variant according to the invention operably linked to a promoter sequence. Preferably, the chimeric construct is operable in a Gram-negative prokaryotic cell. A variety of prokaryotic expression vectors, which may be used as a basis for constructing the chimeric nucleic acid construct, may be utilised to express a polynucleotide, fragment or variant according to the invention. These include but are not limited to a chromosomal vector (*e.g.*, a bacteriophage such as bacteriophage λ), an extrachromosomal vector (*e.g.*, a plasmid or a cosmid expression vector). The expression vector will also typically contain an origin of replication, which allows autonomous replication of the vector, and one or more genes that allow phenotypic selection of the transformed cells. Any of a number of suitable promoter sequences, including constitutive and inducible promoter sequences, may be used in the expression vector (see *e.g.*, Bitter, *et al.*, 1987, *Methods in Enzymology* **153**: 516-544). For example, inducible promoters such as pL of bacteriophage γ , plac, ptrp, ptac ptrp-lac hybrid promoter and the like may be used. The chimeric nucleic acid construct may then be used to transform the desired prokaryotic host cell to produce a recombinant prokaryotic

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 60 -

host cell for producing a recombinant polypeptide as described above or for producing isomaltulose as described hereinafter.

6.2 Eukaryotic expression

The invention also contemplates a chimeric nucleic acid construct designed for expressing a polynucleotide, fragment or variant of the invention in a eukaryotic host cell. A variety of eukaryotic host-expression vector systems may be utilised in this regard. These include, but are not limited to, yeast transformed with recombinant yeast expression vectors; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus); or animal cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., retroviruses, adenovirus, Vaccinia virus), or transformed animal cell systems engineered for stable expression. Preferably, the chimeric nucleic acid construct is designed for genetic transformation of plants as described hereinafter.

6.3 Plant expression

In a preferred embodiment, a polynucleotide, fragment or variant according to the invention is fused to a promoter sequence and a 3' non-translated sequence to create a chimeric DNA construct, designed for genetic transformation of plants.

6.3.1 Plant promoters

Promoter sequences contemplated by the present invention may be native to the host plant to be transformed or may be derived from an alternative source, where the region is functional in the host plant. Other sources include the *Agrobacterium* T-DNA genes, such as the promoters for the biosynthesis of nopaline, octapine, mannopine, or other opine promoters; promoters from plants, such as the ubiquitin promoter; tissue specific promoters (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,459,252 to Conkling *et al.*; WO 91/13992 to Advanced Technologies); promoters from viruses (including host specific viruses), or partially or wholly synthetic promoters. Numerous promoters that are functional in mono- and dicotyledonous plants are well known in the art (see, for example, Greve, 1983, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 499-511; Salomon *et al.*, 1984, *EMBO J.* 3: 141-146; Garfinkel *et al.*, 1983, *Cell* 27: 143-153; Barker *et al.*, 1983, *Plant Mol. Biol.* 2: 235-350); including various promoters isolated from plants (such as the Ubi promoter from the maize *ubi-1* gene, Christensen and Quail, 1996) (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,962,028) and viruses (such as the cauliflower mosaic virus promoter, CaMV 35S).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 61 -

The promoters sequences may include regions which regulate transcription, where the regulation involves, for example, chemical or physical repression or induction (*e.g.*, regulation based on metabolites, light, or other physicochemical factors; see, *e.g.*, WO 93/06710 disclosing a nematode responsive promoter) or regulation based on cell differentiation (such as associated with leaves, roots, seed, or the like in plants; see, *e.g.*, U.S. Pat. No. 5,459,252 disclosing a root-specific promoter). Thus, the promoter region, or the regulatory portion of such region, is obtained from an appropriate gene that is so regulated. For example, the 1,5-ribulose biphosphate carboxylase gene is light-induced and may be used for transcriptional initiation. Other genes are known which are induced by stress, temperature, wounding, pathogen effects, etc.

The preferred promoter for expression in cultured cells is a strong constitutive promoter, or a promoter that responds to a specific inducer (Gatz and Lenk, 1998, *Trends Plant Science* 3: 352-8). The preferred promoter for expression in intact plants is a promoter expressed in sucrose storage tissues (such as the mature stems of sugarcane and the tubers of sugar beet), or an inducible promoter to drive conversion of sucrose to isomaltulose at a late stage before harvest with minimal disruption to other plant growth and development processes.

6.3.2 3' Non-translated region

The chimeric gene construct of the present invention can comprise a 3' non-translated sequence. A 3' non-translated sequence refers to that portion of a gene comprising a DNA segment that contains a polyadenylation signal and any other regulatory signals capable of effecting mRNA processing or gene expression. The polyadenylation signal is characterised by effecting the addition of polyadenylic acid tracts to the 3' end of the mRNA precursor. Polyadenylation signals are commonly recognised by the presence of homology to the canonical form 5' AATAAA-3' although variations are not uncommon.

The 3' non-translated regulatory DNA sequence preferably includes from about 50 to 1,000 nucleotide base pairs and may contain plant transcriptional and translational termination sequences in addition to a polyadenylation signal and any other regulatory signals capable of effecting mRNA processing or gene expression. Examples of suitable 3' non-translated sequences are the 3' transcribed non-translated regions containing a polyadenylation signal from the nopaline synthase (*nos*) gene of *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan *et al.*, 1983, *Nucl. Acid Res.*, 11:369) and the terminator for the T7

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 62 -

transcript from the octopine synthase gene of *Agrobacterium tumefaciens*. Alternatively, suitable 3' non-translated sequences may be derived from plant genes such as the 3' end of the protease inhibitor I or II genes from potato or tomato, the soybean storage protein genes and the pea E9 small subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (ssRUBISCO) gene, although other 3' elements known to those of skill in the art can also be employed. Alternatively, 3' non-translated regulatory sequences can be obtained *de novo* as, for example, described by An (1987, *Methods in Enzymology*, 153:292), which is incorporated herein by reference.

6.3.3 *Optional sequences*

10 The chimeric DNA construct of the present invention can further include enhancers, either translation or transcription enhancers, as may be required. These enhancer regions are well known to persons skilled in the art, and can include the ATG initiation codon and adjacent sequences. The initiation codon must be in phase with the reading frame of the coding sequence relating to the foreign or endogenous DNA sequence
15 to ensure translation of the entire sequence. The translation control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic. Translational initiation regions may be provided from the source of the transcriptional initiation region, or from the foreign or endogenous DNA sequence. The sequence can also be derived from the source of the promoter selected to drive transcription, and can be specifically modified so
20 as to increase translation of the mRNA.

Examples of transcriptional enhancers include, but are not restricted to, elements from the CaMV 35S promoter and octopine synthase genes as for example described by Last *et al.* (U.S. Patent No. 5,290,924, which is incorporated herein by reference). It is proposed that the use of an enhancer element such as the *ocs* element, and particularly
25 multiple copies of the element, will act to increase the level of transcription from adjacent promoters when applied in the context of plant transformation. Alternatively, the omega sequence derived from the coat protein gene of the tobacco mosaic virus (Gallie *et al.*, 1987) may be used to enhance translation of the mRNA transcribed from a polynucleotide according to the invention.

30 As the DNA sequence inserted between the transcription initiation site and the start of the coding sequence, *i.e.*, the untranslated leader sequence, can influence gene expression, one can also employ a particular leader sequence. Preferred leader sequences

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 63 -

include those that comprise sequences selected to direct optimum expression of the foreign or endogenous DNA sequence. For example, such leader sequences include a preferred consensus sequence which can increase or maintain mRNA stability and prevent inappropriate initiation of translation as for example described by Joshi (1987, *Nucl. Acid Res.*, 15:6643), which is incorporated herein by reference. However, other leader sequences, *e.g.*, the leader sequence of RTBV, have a high degree of secondary structure that is expected to decrease mRNA stability and/or decrease translation of the mRNA. Thus, leader sequences (i) that do not have a high degree of secondary structure, (ii) that have a high degree of secondary structure where the secondary structure does not inhibit mRNA stability and/or decrease translation, or (iii) that are derived from genes that are highly expressed in plants, will be most preferred.

Regulatory elements such as the sucrose synthase intron as, for example, described by Vasil *et al.* (1989, *Plant Physiol.*, 91:5175), the Adh intron I as, for example, described by Callis *et al.* (1987, *Genes Develop.*, II), or the TMV omega element as, for example, described by Gallie *et al.* (1989, *The Plant Cell*, 1:301) can also be included where desired. Other such regulatory elements useful in the practice of the invention are known to those of skill in the art.

Additionally, targeting sequences may be employed to target a protein product of the foreign or endogenous DNA sequence to an intracellular compartment within plant cells or to the extracellular environment. For example, a DNA sequence encoding a transit or signal peptide sequence may be operably linked to a sequence encoding a desired protein such that, when translated, the transit or signal peptide can transport the protein to a particular intracellular or extracellular destination, and can then be post-translationally removed. Transit or signal peptides act by facilitating the transport of proteins through intracellular membranes, *e.g.*, endoplasmic reticulum, vacuole, vesicle, plastid, mitochondrial and plasmalemma membranes. For example, the targeting sequence can direct a desired protein to a particular organelle such as a vacuole or a plastid (*e.g.*, a chloroplast), rather than to the cytosol. Thus, the chimeric DNA construct can further comprise a plastid transit peptide encoding DNA sequence operably linked between a promoter region or promoter variant according to the invention and the foreign or endogenous DNA sequence. For example, reference may be made to Heijne *et al.* (1989, *Eur. J. Biochem.*, 180:535) and Keegstra *et al.* (1989, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40:471), which are incorporated herein by reference.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 64 -

A chimeric DNA construct can also be introduced into a vector, such as a plasmid. Plasmid vectors include additional DNA sequences that provide for easy selection, amplification, and transformation of the expression cassette in prokaryotic and eukaryotic cells, *e.g.*, pUC-derived vectors, pSK-derived vectors, pGEM-derived vectors, pSP-derived
5 vectors, or pBS-derived vectors. Additional DNA sequences include origins of replication to provide for autonomous replication of the vector, selectable marker genes, preferably encoding antibiotic or herbicide resistance, unique multiple cloning sites providing for multiple sites to insert DNA sequences or genes encoded in the chimeric DNA construct, and sequences that enhance transformation of prokaryotic and eukaryotic cells.

10 The vector preferably contains an element(s) that permits either stable integration of the vector into the host cell genome or autonomous replication of the vector in the cell independent of the genome of the cell. The vector may be integrated into the host cell genome when introduced into a host cell. For integration, the vector may rely on a foreign or endogenous DNA sequence present therein or any other element of the vector for stable
15 integration of the vector into the genome by homologous recombination. Alternatively, the vector may contain additional nucleic acid sequences for directing integration by homologous recombination into the genome of the host cell. The additional nucleic acid sequences enable the vector to be integrated into the host cell genome at a precise location in the chromosome. To increase the likelihood of integration at a precise location, the
20 integrational elements should preferably contain a sufficient number of nucleic acids, such as 100 to 1,500 base pairs, preferably 400 to 1,500 base pairs, and most preferably 800 to 1,500 base pairs, which are highly homologous with the corresponding target sequence to enhance the probability of homologous recombination. The integrational elements may be any sequence that is homologous with the target sequence in the genome of the host cell.
25 Furthermore, the integrational elements may be non-encoding or encoding nucleic acid sequences.

For cloning and subcloning purposes, the vector may further comprise an origin of replication enabling the vector to replicate autonomously in a host cell such as a bacterial cell. Examples of bacterial origins of replication are the origins of replication of plasmids
30 pBR322, pUC19, pACYC177, and pACYC184 permitting replication in *E. coli*, and pUB110, pE194, pTA1060, and pAM β 1 permitting replication in *Bacillus*. The origin of replication may be one having a mutation to make its function temperature-sensitive in a *Bacillus* cell (*see, e.g.*, Ehrlich, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1433).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 65 -

6.3.4 Marker genes

To facilitate identification of transformants, the chimeric DNA construct desirably comprises a selectable or screenable marker gene as, or in addition to, a polynucleotide sequence according to the invention. The actual choice of a marker is not crucial as long as it is functional (*i.e.*, selective) in combination with the plant cells of choice. The marker gene and the foreign or endogenous DNA sequence of interest do not have to be linked, since co-transformation of unlinked genes as, for example, described in U.S. Pat. No. 4,399,216 is also an efficient process in plant transformation.

Included within the terms selectable or screenable marker genes are genes that encode a "secretable marker" whose secretion can be detected as a means of identifying or selecting for transformed cells. Examples include markers that encode a secretable antigen that can be identified by antibody interaction, or secretable enzymes that can be detected by their catalytic activity. Secretable proteins include, but are not restricted to, proteins that are inserted or trapped in the cell wall (*e.g.*, proteins that include a leader sequence such as that found in the expression unit of extensin or tobacco PR-S); small, diffusible proteins detectable, *e.g.* by ELISA; and small active enzymes detectable in extracellular solution (*e.g.*, α -amylase, β -lactamase, phosphinothricin acetyltransferase).

6.3.5 Selectable markers

Examples of bacterial selectable markers are the *dal* genes from *Bacillus subtilis* or *Bacillus licheniformis*, or markers that confer antibiotic resistance such as ampicillin, kanamycin, erythromycin, chloramphenicol or tetracycline resistance. Exemplary selectable markers for selection of plant transformants include, but are not limited to, a *hyg* gene which encodes hygromycin B resistance; a neomycin phosphotransferase (*neo*) gene conferring resistance to kanamycin, paromomycin, G418 and the like as, for example, described by Potrykus *et al.* (1985, *Mol. Gen. Genet.* 199:183); a glutathione-S-transferase gene from rat liver conferring resistance to glutathione derived herbicides as, for example, described in EP-A 256 223; a glutamine synthetase gene conferring, upon overexpression, resistance to glutamine synthetase inhibitors such as phosphinothricin as, for example, described WO87/05327, an acetyl transferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* conferring resistance to the selective agent phosphinothricin as, for example, described in EP-A 275 957, a gene encoding a 5-enolshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) conferring tolerance to N-phosphonomethylglycine as, for example, described by Hinchee *et al.* (1988, *Biotech.*, 6:915), a *bar* gene conferring resistance against bialaphos as, for

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 66 -

example, described in WO91/02071; a nitrilase gene such as *bnx* from *Klebsiella ozaenae* which confers resistance to bromoxynil (Stalker *et al.*, 1988, *Science*, **242**:419); a dihydrofolate reductase (DHFR) gene conferring resistance to methotrexate (Thillet *et al.*, 1988, *J. Biol. Chem.*, **263**:12500); a mutant acetolactate synthase gene (ALS), which confers resistance to imidazolinone, sulfonylurea or other ALS-inhibiting chemicals (BP-A-154 204); a mutated anthranilate synthase gene that confers resistance to 5-methyl tryptophan; or a dalapon dehalogenase gene that confers resistance to the herbicide.

6.3.6 Screenable markers

Preferred screenable markers include, but are not limited to, a *uidA* gene encoding a β -glucuronidase (GUS) enzyme for which various chromogenic substrates are known; a β -galactosidase gene encoding an enzyme for which chromogenic substrates are known; an aequorin gene (Prasher *et al.*, 1985, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **126**:1259), which may be employed in calcium-sensitive bioluminescence detection; a green fluorescent protein gene (Niedz *et al.*, 1995 *Plant Cell Reports*, **14**:403); a luciferase (*luc*) gene (Ow *et al.*, 1986, *Science*, **234**:856), which allows for bioluminescence detection; a β -lactamase gene (Sutcliffe, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:3737), which encodes an enzyme for which various chromogenic substrates are known (*e.g.*, PADAC, a chromogenic cephalosporin); an R-locus gene, encoding a product that regulates the production of anthocyanin pigments (red colour) in plant tissues (Dellaporta *et al.*, 1988, in *Chromosome Structure and Function*, pp. 263-282); an α -amylase gene (Ikuta *et al.*, 1990, *Biotech.*, **8**:241); a tyrosinase gene (Katz *et al.*, 1983, *J. Gen. Microbiol.*, **129**:2703) which encodes an enzyme capable of oxidising tyrosine to dopa and dopaquinone which in turn condenses to form the easily detectable compound melanin; or a *xylE* gene (Zukowsky *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1101), which encodes a catechol dioxygenase that can convert chromogenic catechols.

7. Introduction of chimeric construct into plant cells

A number of techniques are available for the introduction of DNA into a plant host cell. There are many plant transformation techniques well known to workers in the art, and new techniques are continually becoming known. The particular choice of a transformation technology will be determined by its efficiency to transform certain plant species as well as the experience and preference of the person practising the invention with a particular methodology of choice. It will be apparent to the skilled person that the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 67 -

particular choice of a transformation system to introduce a chimeric DNA construct into plant cells is not essential to or a limitation of the invention, provided it achieves an acceptable level of nucleic acid transfer. Guidance in the practical implementation of transformation systems for plant improvement is provided by Birch (1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 48: 297-326).

In principle both dicotyledonous and monocotyledonous plants that are amenable to transformation, can be modified by introducing a chimeric DNA construct according to the invention into a recipient cell and growing a new plant that harbours and expresses a polynucleotide according to the invention.

10 Introduction and expression of foreign or chimeric DNA sequences in dicotyledonous (broadleaved) plants such as tobacco, potato and alfalfa has been shown to be possible using the T-DNA of the tumour-inducing (Ti) plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* (See, for example, Umbeck, U.S. Patent No. 5,004,863, and International application PCT/US93/02480). A construct of the invention may be introduced into a plant
15 cell utilising *A. tumefaciens* containing the Ti plasmid. In using an *A. tumefaciens* culture as a transformation vehicle, it is most advantageous to use a non-oncogenic strain of the *Agrobacterium* as the vector carrier so that normal non-oncogenic differentiation of the transformed tissues is possible. It is preferred that the *Agrobacterium* harbours a binary Ti plasmid system. Such a binary system comprises (1) a first Ti plasmid having a virulence
20 region essential for the introduction of transfer DNA (T-DNA) into plants, and (2) a chimeric plasmid. The chimeric plasmid contains at least one border region of the T-DNA region of a wild-type Ti plasmid flanking the nucleic acid to be transferred. Binary Ti plasmid systems have been shown effective to transform plant cells as, for example, described by De Framond (1983, *Biotechnology*, 1:262) and Hoekema *et al.* (1983, *Nature*,
25 303:179). Such a binary system is preferred *inter alia* because it does not require integration into the Ti plasmid in *Agrobacterium*.

Methods involving the use of *Agrobacterium* include, but are not limited to: (a) co-cultivation of *Agrobacterium* with cultured isolated protoplasts; (b) transformation of plant cells or tissues with *Agrobacterium*; or (c) transformation of seeds, apices or
30 meristems with *Agrobacterium*.

Recently, rice and corn, which are monocots, have been shown to be susceptible to transformation by *Agrobacterium* as well. However, many other important monocot

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 68 -

crop plants, including oats, sorghum, millet, and rye, have not yet been successfully transformed using *Agrobacterium*-mediated transformation. The Ti plasmid, however, may be manipulated in the future to act as a vector for these other monocot plants. Additionally, using the Ti plasmid as a model system, it may be possible to artificially construct transformation vectors for these plants. Ti plasmids might also be introduced into monocot plants by artificial methods such as microinjection, or fusion between monocot protoplasts and bacterial spheroplasts containing the T-region, which can then be integrated into the plant nuclear DNA.

In addition, gene transfer can be accomplished by *in situ* transformation by *Agrobacterium*, as described by Bechtold *et al.* (1993, *C.R. Acad. Sci. Paris*, **316**:1194). This approach is based on the vacuum infiltration of a suspension of *Agrobacterium* cells.

Alternatively, the chimeric construct may be introduced using root-inducing (Ri) plasmids of *Agrobacterium* as vectors.

Cauliflower mosaic virus (CaMV) may also be used as a vector for introducing of exogenous nucleic acids into plant cells (U.S. Pat. No. 4,407,956). CaMV DNA genome is inserted into a parent bacterial plasmid creating a recombinant DNA molecule that can be propagated in bacteria. After cloning, the recombinant plasmid again may be cloned and further modified by introduction of the desired nucleic acid sequence. The modified viral portion of the recombinant plasmid is then excised from the parent bacterial plasmid, and used to inoculate the plant cells or plants.

The chimeric nucleic acid construct can also be introduced into plant cells by electroporation as, for example, described by Fromm *et al.* (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **82**:5824) and Shimamoto *et al.* (1989, *Nature* **338**:274-276). In this technique, plant protoplasts are electroporated in the presence of vectors or nucleic acids containing the relevant nucleic acid sequences. Electrical impulses of high field strength reversibly permeabilise membranes allowing the introduction of nucleic acids. Electroporated plant protoplasts reform the cell wall, divide and form a plant callus.

Another method for introducing the chimeric nucleic acid construct into a plant cell is high velocity ballistic penetration by small particles (also known as particle bombardment or microprojectile bombardment) with the nucleic acid to be introduced contained either within the matrix of small beads or particles, or on the surface thereof as, for example described by Klein *et al.* (1987, *Nature* **327**:70). Although typically only a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 69 -

single introduction of a new nucleic acid sequence is required, this method particularly provides for multiple introductions.

Alternatively, the chimeric nucleic acid construct can be introduced into a plant cell by contacting the plant cell using mechanical or chemical means. For example, a nucleic acid can be mechanically transferred by microinjection directly into plant cells by use of micropipettes. Alternatively, a nucleic acid may be transferred into the plant cell by using polyethylene glycol which forms a precipitation complex with genetic material that is taken up by the cell.

There are a variety of methods known currently for transformation of monocotyledonous plants. Presently, preferred methods for transformation of monocots are microprojectile bombardment of explants or suspension cells, and direct DNA uptake or electroporation as, for example, described by Shimamoto *et al.* (1989, *supra*). Transgenic maize plants have been obtained by introducing the *Streptomyces hygroscopicus bar* gene into embryogenic cells of a maize suspension culture by microprojectile bombardment (Gordon-Kamm, 1990, *Plant Cell*, 2:603-618). The introduction of genetic material into aleurone protoplasts of other monocotyledonous crops such as wheat and barley has been reported (Lee, 1989, *Plant Mol. Biol.* 13:21-30). Wheat plants have been regenerated from embryogenic suspension culture by selecting only the aged compact and nodular embryogenic callus tissues for the establishment of the embryogenic suspension cultures (Vasil, 1990, *Bio/Technol.* 8:429-434). The combination with transformation systems for these crops enables the application of the present invention to monocots. These methods may also be applied for the transformation and regeneration of dicots. Transgenic sugarcane plants have been regenerated from embryogenic callus as, for example, described by Bower *et al.* (1996, *Molecular Breeding* 2:239-249).

Alternatively, a combination of different techniques may be employed to enhance the efficiency of the transformation process, *e.g.*, bombardment with *Agrobacterium* coated microparticles (EP-A-486234) or microprojectile bombardment to induce wounding followed by co-cultivation with *Agrobacterium* (EP-A-486233).

8. Production and characterisation of differentiated transgenic plants

8.1 Regeneration

The methods used to regenerate transformed cells into differentiated plants are not critical to this invention, and any method suitable for a target plant can be employed.

- 5 Normally, a plant cell is regenerated to obtain a whole plant following a transformation process.

Regeneration from protoplasts varies from species to species of plants, but generally a suspension of protoplasts is made first. In certain species, embryo formation can then be induced from the protoplast suspension, to the stage of ripening and germination as natural embryos. The culture media will generally contain various amino acids and hormones, necessary for growth and regeneration. Examples of hormones utilised include auxins and cytokinins. It is sometimes advantageous to add glutamic acid and proline to the medium, especially for such species as corn and alfalfa. Efficient regeneration will depend on the medium, on the genotype, and on the history of the culture.

10 If these variables are controlled, regeneration is reproducible. Regeneration also occurs from plant callus, explants, organs or parts. Transformation can be performed in the context of organ or plant part regeneration as, for example, described in *Methods in Enzymology*, Vol. 118 and Klee *et al.* (1987, *Annual Review of Plant Physiology*, **38**:467), which are incorporated herein by reference. Utilising the leaf disk-transformation-regeneration method of Horsch *et al.* (1985, *Science*, **227**:1229, incorporated herein by reference), disks are cultured on selective media, followed by shoot formation in about 2-4 weeks. Shoots that develop are excised from calli and transplanted to appropriate root-inducing selective medium. Rooted plantlets are transplanted to soil as soon as possible after roots appear. The plantlets can be repotted as required, until reaching maturity.

- 25 In vegetatively propagated crops, the mature transgenic plants are propagated by the taking of cuttings or by tissue culture techniques to produce multiple identical plants. Selection of desirable transgenes is made and new varieties are obtained and propagated vegetatively for commercial use.

- In seed propagated crops, the mature transgenic plants can be self-crossed to produce a homozygous inbred plant. The inbred plant produces seed containing the newly introduced foreign gene(s). These seeds can be grown to produce plants that would produce the selected phenotype, *e.g.*, early flowering.
- 30

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 71 -

Parts obtained from the regenerated plant, such as flowers, seeds, leaves, branches, fruit, and the like are included in the invention, provided that these parts comprise cells that have been transformed as described. Progeny and variants, and mutants of the regenerated plants are also included within the scope of the invention, provided that
5 these parts comprise the introduced nucleic acid sequences.

It will be appreciated that the literature describes numerous techniques for regenerating specific plant types and more are continually becoming known. Those of ordinary skill in the art can refer to the literature for details and select suitable techniques without undue experimentation.

10 8.2 Characterisation

To confirm the presence of the polynucleotide of the invention in the regenerating plants, a variety of assays may be performed. Such assays include, for example, "molecular biological" assays well known to those of skill in the art, such as Southern and Northern blotting and PCR; a protein expressed by the polynucleotide of the invention may be
15 assayed for sucrose isomerase activity as for example described herein.

9. *Production of Isomaltulose*

The present invention further relates to a process for the production of isomaltulose, using the polynucleotide or polypeptide sequences described herein or using variants or fragments thereof. The process involves contacting sucrose or a sucrose-containing medium or substrate with at least one member selected from (a) an organism
20 which is transformed with a DNA sequence encoding a protein with sucrose isomerase activity, for example a genetically modified bacterium or plant; (b) an extracellular product or cellular extract from such a cell or organism; and (c) a protein with sucrose isomerase activity in isolated form, under conditions such that the sucrose is at least partly converted
25 by the sucrose isomerase into isomaltulose. Subsequently, the isomaltulose is obtained from the medium or the organism and purified as is known in the art. Methods for the industrial production of isomaltulose, for example using immobilised cells or sucrose isomerase contacted with a medium-containing sucrose, are well known (Cheetham *et al.* 1985, *Biotech. Bioeng.* 27: 471-481; Takazoe, 1989, Palatinose - an isomeric alternative to
30 sucrose. In *Progress in Sweeteners* (Grenby, T.H., ed) Barking: Elsevier, pp. 143-167; and references respectively therein). The present invention improves these methods by

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 72 -

providing novel sucrose isomerases with beneficial properties including a higher efficiency of isomaltulose production.

Furthermore, the present invention reveals for the first time the capacity to produce isomaltulose directly in plants. This is highly advantageous because it avoids the expense of extracting sucrose from plants and providing this as a substrate for conversion to isomaltulose by other organisms, extracts, or isolated enzymes through industrial fermentation. Instead, the sucrose produced by photosynthesis in plants genetically modified as described herein is converted to isomaltulose by sucrose isomerase activity in the plant tissue. The resulting isomaltulose is then harvested using procedures well established for the harvesting of other sugars, particularly sucrose, from plants. The plant materials with stored isomaltulose are first harvested, then crushed to expel the juice containing isomaltulose and/or passed through diffusion apparatus to extract the soluble isomaltulose from the insoluble plant materials. The isomaltulose is then purified by treatments to remove impurities and concentrated by evaporation and crystallisation stages well known to those skilled in the art (Cooke and Scott, 1993, *The Sugar Beet Crop: science into practice*. London: Chapman & Hall; Meade, 1977, *Cane Sugar Handbook*. New York: Wiley, and references respectively therein).

In order that the invention may be readily understood and put into practical effect, particular preferred embodiments will now be described by way of the following non-limiting examples.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

Isolation of sucrose isomerase-encoding polynucleotides using oligonucleotide primers based on regions specified by Mattes et al.

5 This strategy was tested on a known sucrose isomerase expressing bacterium (*Erwinia rhaportici* Accession Number WAC2928), and 30 additional independent bacterial isolates. Degenerate PCR primers were designed based on regions specified by Mattes et al. (*supra*) as conserved regions from their analysis of sucrose isomerase genes known to them.

10 Forward primer consisted of the sequence extending from nucleotides 139-155 of SEQ ID NO: 1, 5'-tgg tgg aa(a,g) ga(g,a) gct gt-3' [SEQ ID NO: 38].

Reverse primer consisted of the sequence extending from nucleotides 625-644 of SEQ ID NO: 1, 5'-tcc cag tta g(g,a)t ccg gct g-3' [SEQ ID NO: 39].

15 Bacterial genomic DNAs were used as templates for PCR. The genomic DNAs were extracted according to Ausubel et al (1989, *supra*). The PCR reaction was carried out in a final volume of 50 µL comprising 100 ng DNA, 5 µL of 10 X PCR buffer (Promega), 2 µL dNTPs (5mM each NTP), forward primer and reverse primer 250 ng each, Taq polymerase 1 µL (Promega). Three parallel PCRs were run by using three different annealing temperatures: 46° C, 50° C or 53° C. After an initial 1 min at 94° C, 35 cycles
20 were performed consisting of 1 min at 94° C, 1min at an annealing temperature and 1 min at 72° C.

After running the PCR products on a 1% agarose gel, the bands within the size range from 0.3 to 1.0 kb were recovered and cloned into pCR[®]2.1 vector using TOPO[™]TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) following the instructions from the kit. Plasmid
25 inserts were sequenced at the Australian Genomic Research Facility, using ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, using universal primers of M13 Reverse or M13 Forward available on the vector. The GenBank database was searched by the FASTA program through ANGIS, using the sequenced DNAs as queries.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 74 -

Using the primers from 'conserved regions' specified by Mattes *et al.* (*supra*), PCR products were amplified from *Erwinia rhapontici* and also from bacteria subsequently found to be negative for sucrose isomerase activity. Patterns of PCR products revealed by agarose gel electrophoresis included: no band from 2 isolates, one band from 3 isolates, and multiple bands from all other bacteria including *Erwinia rhapontici*. The DNAs in 12 bands, including six bands amplified from *Erwinia rhapontici*, were cloned and sequenced. None of the sequenced bands showed significant homology to the sucrose isomerases, including the region of the gene from *Erwinia rhapontici* taught by Mattes *et al.* Most of the sequenced bands showed high similarities to known glucosidase genes.

Accordingly, it was concluded that the conserved sequences specified by Mattes *et al.* were not specific to sucrose isomerases, but were common to other classes of enzymes including glucosidases. As a consequence, these conserved sequences are not of direct use for the cloning of sucrose isomerases without onerous experimentation with PCR conditions and screening by other means to distinguish isomerase clones.

EXAMPLE 2

Functional Screening for Bacteria that Convert Sucrose to Isomaltulose

Bacteria collection and isolation

Bacterial samples were collected from a range of environmental sites selected for their potential to yield novel, sucrose metabolising bacteria. In particular, sites were chosen subject to periodic sucrose availability, which might favour organisms able to convert sucrose to storage isomers such as isomaltulose. Around 100 samples from sites in SouthEast Queensland were collected into MIM liquid culture. MIM is 0.2% isomaltulose (6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructofuranose) plus MM (minimum medium containing 0.5% Na₂PO₄, 0.45% KH₂PO₄, 0.1% NH₄Cl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.005% Ferric Ammonium Citrate and 0.0005% CaCl₂). Following growth on an orbital shaker at 200 rpm for 2 hours at room temperature, 100 μ L samples were streaked onto MSM (MM plus 4% sucrose) agar plates and grown overnight at 28° C. Following this two-stage enrichment, morphologically different colonies were isolated onto separate fresh plates of LB or MSM for further growth (578 colonies in total). After streaking to ensure purity of single-colony isolates, they were transferred in duplicate to both a replica patch plate and a 30 mL universal tube containing 5 mL SLB (LB containing 4% sucrose) for further

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 75 -

functional screening in an assay that preferentially reveals organisms with higher capacity for isomaltulose production.

EXAMPLE 3Sample preparation for aniline/diphenylamine assay

5 The cultures grown overnight in 5 mL SLB were centrifuged at a speed of 10,000 x g for 10 minutes at room temperature. The supernatant was carefully poured off and 2 mL of a 50% sucrose solution in citrate/phosphate buffer (pH6) was added. Cells were gently resuspended and incubated at 28°C in a shaker for 48 hours. Following incubation, 1.5 mL culture was transferred to a fresh Eppendorf tube, boiled for 15 minutes at 100°C
10 and centrifuged at 16,000 x g for 20 minutes at room temperature. Without touching the pellet, the supernatant was saved to a fresh tube for aniline/diphenylamine assay and capillary electrophoresis.

EXAMPLE 4Aniline/diphenylamine assay

15 Samples were spotted evenly around the outside edge of a Whatman #1 filter paper with a positive control (from *Erwinia rhapontici*) and a negative control (from *Escherichia coli*) placed in the center. After the samples were spotted onto the filter paper, they were left to dry for 15 minutes while the color-developing reagent was prepared.

The reagent was prepared as follows:

- 20 a. 4mL Aniline made up to 100mL using A.R. acetone;
b. 4g Diphenylamine made up to 100mL using A.R. acetone;
c. 20mL of 85% Orthophosphoric acid.

Components (a) and (b) were prepared separately in a fume cabinet ensuring complete mixing / dissolving of the aniline/diphenylamine respectively in acetone before
25 they were combined in a glass beaker, after which the acid was added. After initial addition of the acid a cloudy white precipitate forms, which dissolves after vigorous swirling to yield a clear brown solution.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 76 -

The prepared filters were passed through the "developer", ensuring that each filter received even and equal exposure. The filters were then allowed to dry on paper toweling in the fume-hood for 15 minutes, then heated in an 80°C drying oven for 10 minutes. The results (color of spots) were recorded or photographed using a digital camera.

5 If isomaltulose was present, the reaction yielded a yellow to brownish yellow spot due to the 1,6- linked glucosaccharide; whereas glucose yielded a dark grey spot, fructose yielded a silver-grey spot, and sucrose yielded a purple - brown spot due to the 1,2-linkage. The intensity of the color depends on the concentration of the sugars present. Twelve candidates were selected from the 578 colonies as indicated by the
10 aniline/diphenylamine assay test. The identity of the isomaltulose product from the selected isolates was then verified by quantitative analysis using capillary electrophoresis to resolve and identify related metabolites.

EXAMPLE 5

Sample preparation for capillary electrophoresis

15 The ionic materials in the supernatant used for aniline/diphenylamine assay need to be removed before loading to the capillary for further analysis. This was done by passing through a Strong Cation Exchange (Bond Elut-SCX, 1210-2013) and a Strong Anion Exchange (Bond Elut-SAX, 1210-2017) column purchased from Varian. The columns were preconditioned by rinsing with one volume of methanol, followed by one
20 volume of water, with the rinses being forced through the columns with the aid of a syringe.

The bacterial supernatant was diluted 150-fold using sterile Milli-Q (SMQ) water before processing first through the SCX and then the SAX column. One mL of the diluted supernatant was placed in the SCX column. The sample was forced through the column
25 with the aid of a 50-mL syringe. The eluate was collected directly into the SAX column. The sample was similarly forced through with the final eluate collected in a 1.5-mL Eppendorf tube.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 77 -

EXAMPLE 6Capillary electrophoresis

Separation by high performance capillary electrophoresis (HPCE), was performed using a Beckman P/ACE 5000 Series C.E. System utilising a 190 to 380 nm light source from a deuterium lamp along with and a Beckman P/ACE UV Absorbance Detector (254 nm [± 10 nm] filter wheel) for sample detection.

Capillaries were bare, fused silica capillaries, I.D. 50 μm , O.D. 363 μm (Supelco Cat. # 70550-U). Total capillary length was 77 cm, and length inlet to detector window was 69cm. The capillary detector window was made by burning the coating off the capillary using a match, and wiping with methanol.

To achieve maximum reproducibility of migration times, the capillary was re-conditioned every morning and evening using the following rinsing procedure: 2 min with SMQ, 10 min 0.1 M HCl, 2 min SMQ, 10 min 0.1 M NaOH, 2 min SMQ, 15 min 0.5 M ammonia and 2 min SMQ. All solutions were dissolved / diluted in SMQ and filtered through a 0.45 μm Micropore filter.

An alkaline copper sulphate electrolyte with direct detection based on UV absorbance was employed to resolve and detect low concentrations of sucrose and its isomer isomaltulose, in addition to other sugars including glucose and fructose that are expected in cell extracts. Using an electrolyte consisting of 6mM copper (II) sulphate and 500 mM ammonia, pH 11.6, both the separation and the direct UV detection of neutral sugars is achieved based on the chelation reaction of the sugar with copper (II) under alkaline conditions.

The electrolyte buffer (EB) was made fresh at the beginning of each day and degassed for 15min before use. After conditioning, the capillary was rinsed with EB for 15 min. The capillary was also rinsed with EB for 10 minutes between sample separations. Programmed parameters for batch runs are listed in Table 1. A positive and a negative control as described above were included in each sample. In addition, standards (consisting of sucrose and isomaltulose) were run before the first, and after the last samples, so that differences in migration time due to factors such as EB depletion, capillary heating etc. could be measured and corrected.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

TABLE I. Parameters for batch run of capillary electrophoresis

Function	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Comment
EB Rinse	5 min	11	10	Forward, 20psi
Pressure Inject	5 sec	Sample Vial	10	Forward, 20psi
Separate	30 min	12	1	25KV, 254nm
EB Rinse	5 min	13	10	Forward, 20psi

Three isolates named as 349J, 14s and 68J were confirmed as having the ability to convert sucrose into isomaltulose. The diluted supernatants from these three positive isolates were retested after being spiked separately with either 5mM sucrose, 0.5mM isomaltulose, 0.5mM fructose or 0.5mM glucose to verify the identity of peaks in the sample based on comigration with a known sugar.

EXAMPLE 7Bacterial Genomic Library Construction

10 Cosmid vector SuperCos 1 (Stratagene) was used for genomic library construction from an Australian isolate of *Erwinia rhapontici* (Accession Number WAC2928), and bacterial isolates 14S, 68J and 349J. The vector accommodates genomic DNA fragments ranging from 30 to 45 kb.

EXAMPLE 815 Preparation of genomic DNA insert

Because large fragments are required for cloning in the SuperCos 1 vector, the genomic DNA was extracted essentially by method of Priefer *et al.* (1984, Cloning with cosmids. In *Advanced Molecular Genetics* (Pühler, A. and Timmis, K.N., eds) Berlin: Springer-Verlag, pp. 190-201) to obtain high molecular weight (~150 kb) DNA before digestion. The hooked DNA was dissolved in TE buffer at 65° C for 3 hours or at 4° C for 20 2 days without shaking. The molecular size was estimated by checking on a 0.4% agarose gel. In order to clone into the *Bam*H I site of the SuperCos 1 vector, the chromosomal

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 79 -

DNA was partially digested with restriction endonuclease *Sau* 3A. A series of test partial digests was conducted to determine the ideal conditions for obtaining the desired insert size range. Ten µg of genomic DNA in a 135 µL volume reaction using 1X *Sau* 3A buffer was pre-equilibrated at 37° C for 5 minutes. Then, 0.5 units of *Sau* 3A was added, and after 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 minutes, aliquots (15 µL) were removed and the reaction was immediately stopped at 68° C for 20 minutes. The aliquots were loaded on 0.5% agarose gel for electrophoresis. The optimal digestion period was determined for an average fragment size of 50 kb. The reaction was scaled up to 50 µg of genomic DNA in a 675 µL total volume. After digestion, 13 µL of 0.5 M EDTA, pH 8.0 was added to the sample. After a phenol/chloroform extraction, the DNA was precipitated by addition of 1/10 volume of sodium acetate (3M, pH 5.2) and 2.5 volume of ethanol according to Sambrook et al. (1989). The pellet was resuspended in 450 µL 1X CIAP buffer and the DNA was CIAP treated for 60 minutes at 37° C. Another phenol/chloroform extraction was repeated to the CIAP treated DNA. The DNA was finally dissolved in 30 µL TE buffer for ligation.

EXAMPLE 9

Preparation of vector DNA

After 20 µg SuperCos 1 vector was digested by *Xba* I at 37° C for 3 hours, one unit CIAP per µg DNA was added to the reaction and incubated another hour at 37° C. Phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation of the treated DNA using the method described above were performed. The *Xba* I/CIAP treated SuperCos 1 DNA was resuspended in TE buffer and checked on 0.8% agarose gel to see the single linear band with size of 7.6 kb. The vector DNA was further digested with *Bam*H I, extracted with phenol/chloroform, ethanol precipitated, resuspended in TE buffer at 1 µg / µL for ligation.

EXAMPLE 10

Ligation and packaging of DNA

In a 15 µL volume, 2.5 µg *Sau* 3A partially digested bacterial genomic DNA and 1.0 µg SuperCos 1 vector DNA treated with *Xba* I/CIAP/*Bam*H I were heated at 70° C for

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 80 -

5 minutes. Then 2 μ L 10 mM ATP, 2 μ L 10X ligation buffer and 1 μ L T4 DNA ligase (Invitrogen) were added to make up to 20 μ L in total volume. After 4 hours incubation at room temperature, the ligation was put at 4° C overnight. Ligation efficiency was viewed by running 2 μ L reaction against unligated mixture of vector and insert DNAs on a 0.8% agarose gel.

One fourth of the ligation was *in vitro*-packaged according to the manufacturer's instruction (Gigapack III Gold Packaging Extract, Stratagene).

Host cells of *E.coli* NM554 (Stratagene) were grown in LB medium with 0.2% maltose and 10mM MgSO₄ at 37° C with shaking from a single colony to an OD₆₀₀ value of 1.0. The cells were harvested by centrifugation at 2,000 x g at 4° C for 10 minutes, then gently resuspended in 10 mM MgSO₄ to OD₆₀₀ value of 0.5. After 10 μ L packaged cosmid library was mixed with 50 μ L NM554 cells in a 1.5 mL tube, they were incubated at room temperature for 30 minutes, then 400 μ L LB was added to the tube. To allow expression of antibiotic resistance, the cells were incubated at 37° C for another hour with gentle shaking once every 15 minutes. The cells were centrifuged for 30 seconds and gently resuspend in 100 μ L fresh LB broth. Fifty μ L was spread on a LB plate with 50 μ g/mL ampicillin.

EXAMPLE 11

Functional Screening of Cosmid Libraries

After functional screening of 600 colonies from each of the four cosmid libraries, aniline/diphenylamine assay and CE as described above, 4 clones from *Erwinia rhapontici*, 4 clones from 14S, 3 clones from 349J and 3 clones from 68J showed ability of conversion from sucrose to isomaltulose.

EXAMPLE 12

Subcloning and sequencing

Cosmid DNAs from positive colonies were prepared following the method of Sambrook et al (1989). To find the smallest functional fragment containing sucrose isomerase, the subclone insert of cosmid DNA was prepared through partial digestion by *EcoR* I, *Bam*H I or *Hind* III separately. Freshly digested pZerOTM-2 vector (Invitrogen) by *EcoR* I, *Bam*H I or *Hind* III were used for ligation with the inserts. All cloning procedures

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 81 -

such as ligation and transformation into Top 10 *E.coli* strain followed the instructions provided by Invitrogen. Two hundred transformants of each ligation were picked, patched and grown for functional screening by aniline/diphenylamine assay as described above. The functionally positive subclones were further confirmed by CE analysis. Plasmid DNAs were isolated from the CE confirmed positives to check digest pattern on *EcoR* I, *BamH* I or *Hind* III. The digested fragments from cosmid insert were further subcloned into pZerOTM-2 vector, assayed and sized as described above to obtain the functional clones with the smallest inserts for sequencing.

Plasmid inserts were sequenced at the Australian Genomic Research Facility, using ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. For the first round sequencing, universal primers (Sp6, T7, M13 Reverse or M13 Forward) starting the sites available on the pZerOTM-2 vector were used, then custom primers were used for sequence extension. Sequences were conducted and confirmed from both strands of the DNA.

15 EXAMPLE 13

Expression of the Three Sucrose Isomerase Genes in E.coli

Based on the sequences of the genes cloned by functional screening as described above, three pairs of primers were designed for subcloning the three sucrose isomerase genes into expression vector pET 24b. By PCR, non-coding regions and leader sequences were deleted and an artificial start codon was incorporated. Each forward primer: 1) includes a start codon, 2) creates a plant-like context for translation start, 3) incorporates a *BamH* I restriction site for easily cloning and matching open reading frame of the gene. Each reverse primer incorporates a *Kpn* I restriction site and includes a stop codon. The primer base pairs are as follows:

25 *Erwinia rhapontici* forward: 5'-gga tcc aac aat ggc aac cgt tca gca atc aaa tg-3' [SEQ ID NO: 15]

14S forward: 5'-gga tcc aac aat ggc aac cgt tca caa gga aag tg-3' [SEQ ID NO: 17]

68J forward: 5'-gga tcc aac aat ggc aac gaa tat aca aaa gtc c-3' [SEQ ID NO: 13]

30

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 82 -

Erwinia rhapontici reverse: 5'-ata ggt acc tta ctt aaa cgc gtg gat g-3' [SEQ ID NO: 16]

14S reverse: 5'-ata ggt acc tta ccg cag ctt ata cac acc-3' [SEQ ID NO: 18]

5 68J reverse: 5'-ata ggt acc tca gtt cag ctt ata gat ccc-3' [SEQ ID NO: 14]

High fidelity DNA polymerase *pfi* (Stratagene) was used for PCR. The PCR products were directly cloned into pCR[®]2.1 vector using TOPO[™]TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) following the instructions from the kit.

10 The three sucrose isomerase genes in the pCR[®]2.1 vector were cut and cloned into pGEM[®]-3Zf(+) then into pET 24b vector (Novagen) for expression in *E. coli* BL21(DE3) strain. Five mL LB medium with 50 µg /mL kanamycin was used for the BL21(DE3) cell culture. Fifteen cultures per construct were set up initially. Cells were grown at 37° C at 225 rpm shaking. Six to ten cultures per construct, with OD₆₀₀ 1.000 ± 0.005, were selected for further induction. After 0.5 mL was sampled from each culture, IPTG was added to the
15 culture to a final concentration of 1.0 mM. Incubation of the cultures was continued for another 3 hours. The induced cultures only with OD₆₀₀ 1.750±0.005 were further selected for sucrose conversion analysis and protein measurement, allowing analysis of three replicate cultures per construct. From each of the selected IPTG-induced cultures, 1.5 mL was sampled for protein quantification, 0.5 mL for protein SDS-PAGE, 1.0 mL for
20 quantification of conversion efficiency from sucrose into isomaltulose.

EXAMPLE 14

Protein assay

The cells were harvested by centrifugation (3,000 x g, 4° C, 10 min). The cell pellet was resuspended in 50 µL of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, and 2 mM EDTA, then
25 recentrifuged. The cell pellet was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70° C. Cells were suspended in 0.5 mL extraction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM azide, 10 mM β-mercaptoethanol), then lysed by sonication (9 x 15 s pulse at 50 watts from a Branson Sonifier 450 microprobe), and centrifuged (10,000 x g, 4° C, 10 min). The supernatant was filtered through an Acrodisc[®]
30 32 Super[®] 0.45 µm membrane filter unit (GelmanScience).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 83 -

Protein was assayed according to Bradford (1976, *Anal. Biochem.* 72: 248-254) using bovine serum albumin as a standard. Ten μ l protein extraction described above was mixed with 90 μ l 0.15 M NaCl and 1 mL Coomassie brilliant blue solution (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 mL 95% ethanol + 100 mL of 85% phosphoric acid + 850 mL SMQ). A_{595} was determined and the protein content was calculated from the standard curve.

EXAMPLE 15SDS-PAGE

SDS polyacrylamide gels were polymerised and run as described by Laemmli (1970, *Nature* 227: 680-685). Protein samples were heated at 100° C for 5 min in 1x SDS-PAGE sample buffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.005% (v/v) bromophenol blue), centrifuged at 12,000 x g for 1 min and the supernatants were applied to the gels. Each sample was loaded into two adjacent lanes. After running, one lane from the gel was stained in 0.025 % (w/v) Coomassie Blue R-250, destained in 30% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid, then expressed sucrose isomerase was cut from the unstained lane corresponding to the relative migration position of the stained gel lane. The sucrose isomerase protein was eluted from the gel slice by immersion into extraction buffer overnight at 4°C with gentle shaking. The eluted sucrose isomerase was quantified using the protein quantification method described above.

EXAMPLE 16Conversion ratio from sucrose into isomaltulose by sucrose isomerase expressed in *E.coli*

The 1.0mL culture was centrifuged, then resuspended in citrate/phosphate (pH 6.0) buffered 50% sucrose solution and assayed for isomaltulose conversion by CE analysis as described above. Conversion ratio was calculated by sucrose peak area and isomaltulose peak area normalised against standards of known concentration, using the software of Beckman P/ACE 5000 Series C.E. System.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 84 -

EXAMPLE 17Construct DNA preparation

The sucrose isomerase (SI) gene insert in the pET 24b vector was further cloned between the Ubi promoter from the maize *ubi-1* gene (Christensen and Quail, 1996, *Transgen. Res.* 5: 215-218) and the *Agrobacterium nos* terminator (Bevan *et al.*, 1983, *Nature* 304: 183-187) to drive expression in sugarcane cells.

Plasmids with the sucrose isomerase genes (pU3ZErw, pU3Z14s or pU3Z68J) and the *aph A* construct plasmid pEmuKN (as a selectable marker) were isolated by alkaline extraction (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), and dissolved in TE buffer. Plasmid intactness and absence of genomic DNA or RNA were checked by gel electrophoresis and concentration was measured by spectrophotometry. The sucrose isomerase (UbiSI) gene construct and selectable marker construct were co-precipitated onto tungsten microprojectiles and introduced into sugarcane callus, followed by selection for transformed callus, and regeneration of transgenic plants, essentially described by Bower *et al.* (1996, *Molec. Breed.* 2: 239-249).

EXAMPLE 18Particle bombardment

Precipitation reactions were conducted by adding the following at 4° C in turn to a 1.5 mL microfuge tube: 5 µL pEmuKN plasmid DNA (1 mg/mL), 5 µL UbiSI plasmid DNA (1 µg/µL), 50 µL tungsten (Bio-Rad M10, 100 µg/µL), 50 µL CaCl₂ (2.5M), 20 µL spermidine (100 mM free base). The preparation was mixed immediately after addition of each reagent, with minimal delay between addition of CaCl₂ and spermidine. The tungsten was then allowed to settle for 5 minutes on ice, before removal of 100 µL of supernatant and resuspension of the tungsten by running the tube base across a tube rack. Suspensions were used within 15 minutes, at a load of 4 µL/bombardment, with resuspension of the particles immediately before removal of each aliquot. Assuming the entire DNA is precipitated during the reaction, this is equivalent to 1.3 µg DNA/bombardment, on 667 µg tungsten/bombardment.

Embryogenic callus from sugarcane cultivar Q117 was used for bombardment. Particles were accelerated by direct entrainment in a helium gas pulse, through the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 85 -

constriction of a syringe filter holder into the target callus in a vacuum chamber as described by Bower *et al.* (1996, *supra*). The tissue was osmotically conditioned for four hours before and after bombardment. After 48 hours recovery on solid medium without antibiotics, the bombarded callus was transferred to medium with 45 mg/L Geneticin for selection, callus development and plant regeneration.

EXAMPLE 19

Functionality of the transformants in conversion of sucrose

Samples were collected from independent transgenic callus and ground under liquid nitrogen. Also, untransformed Q117 callus and callus transformed with Ubi-*lac* were used as negative controls. The ground tissue was centrifuged at 16,000 x g at 4° C to pellet cell debris. The supernatant was diluted 10 folds in SMQ, then boiled for 20 minutes. After another centrifugation to remove denatured proteins, the supernatant was passed through Bond Elut™ SCX and SAX. CE analysis was performed as described above.

RESULTS AND DISCUSSION RELATING TO THE EXAMPLES

15 Three bacterial strains with sucrose isomerase activity were isolated

An Australian isolate of *Erwinia rhapontici* (Accession Number: WAC 2928) was used as a positive control for isomaltulose production, because this species has previously been shown to produce a sucrose isomerase enzyme that converts sucrose to isomaltulose (Cheetham, 1985, *supra*). From a total of 578 bacteria isolated through the enrichment procedure, three strains yielded yellow colour reaction distinctive for isomaltulose in the aniline/diphenylamine assay, and a novel peak in the CE assay corresponding to the isomaltulose standard and to that of *Erwinia rhapontici* (Figure 1). These strains, designated 14S, 68J and 349J are all Gram-negative bacteria able to use either sucrose or isomaltulose as sole carbon source. All three strains grow well at 22- 30° C, and 68J also grows slowly at 4° C.

Three sucrose isomerase genes were functionally cloned and sequenced

Functional screening of genomic cosmid libraries of *Erwinia rhapontici*, 14S, 349J and 68J in *E.coli* yielded clones able to convert sucrose to isomaltulose (Figure 2).

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 86 -

After several cycles of subcloning into pZerO™-2 vector and functional screening, the smallest functional inserts in pZerO™-2 vector ranged from 3 to 5 kb.

Sequence from *Erwinia rhapontici* (Figure 3) showed a 1899 bp ORF encoding 632 amino acids (Figure 5). First strand sequencing revealed a gene in the 349J subclone with 99% identity to this *Erwinia rhapontici* ORF, so sequencing of 349J was stopped. Sequence from 14S revealed a 1797 bp ORF encoding 598 amino acids. Database searching by FASTA showed that 1305 bp of the SI gene from *Erwinia rhapontici*, and the full length of the SI gene from 14S had been disclosed by Mattes *et al.* (*supra*). Sequence from 68J (Figure 4) indicated a novel SI gene with an ORF of 1797 bp. At the nucleotide level, it has less than 70% identity to known sucrose isomerases, either with or without leader fragment (Table 2). At the amino acid level, the identity to other sucrose isomerases is between 63.4% to 70.6% with leader, or 64.6% to 73.7% without leader. The 68J predicated SI gene product is a protein with 598 amino acids (Figure 6), *Mr* of 69291 and isoelectric point 7.5 due to 78 basic and 69 acidic amino acid residues. Phylogenic analysis of amino acid sequences shows the relatedness between 68J SI gene and known genes. All sucrose isomerase genes and glucosidases share conserved products of the domains for sugar binding. As a result the conserved sequences and corresponding primers described by Mattes *et al.* (*supra*) are not specific for sucrose isomerases and would yield many non-SI genes from different organisms. The SI gene of 68J shows nearly the same level of nucleotide identity to various glucosidases as it does to known SI genes of *Pseudomonas mesoacidophila*.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 88 -

TABLE 2. Comparison between characteristics of 68J, other sucrose isomerases, sucrose isomerase fragments, and a glucosidase

Sequence accession #	Species	Notes	CORE length		Peptide-with-leader		Peptide-without-leader		Nucleotide identity (%)	
			h.p. (aa)	h.p. (aa)	Similarity (%)	Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	With leader	Without leader
UQ 68J		Full length UQ isolate	1797	598						
a45846 Sudz #1	<i>Protaminobacter rubrum</i>	Full length	1890	629	81.1	70.3	83.0	73.3	68.2	69.4
a45854 Sudz #9	<i>Protaminobacter rubrum</i> (variant)	Full length	1803	600	81.5	70.6	83.4	73.7	68.2	69.4
a45856 Sudz #11	<i>Enterobacter</i> species	Full length	1794	597	80.7	68.5	82.6	71.4	67.3	68.5
UQ 281	<i>Erwinia rhapontici</i>	Full length UQ isolate	1899	632	79.6	68.8	82.1	72.0	66.4	67.7
a45858 Sudz # 13	<i>Pseudomonas mesoacidophila</i>	Full length	1782	593	75.5	63.4	76.3	64.6	60.9	62.4
a45860 Sudz #16	<i>Pseudomonas mesoacidophila</i>	Full length	1704	567	No leader sequence		70.4	52.4	---	56.4
a45850 Sudz # 3	<i>Enterobacter</i> species	PCR fragment of Sudz #11 (nonfunctional)	471	157	--	--	89.1*	81.4*	--	75.4*
a45848 Sudz #2	<i>Erwinia rhapontici</i>	N-terminal region of UQ 281 homolog (nonfunctional)	1305	435	84.2*	74.9*	87.0*	78.5*	67.2*	72.4*
Bco16g1	<i>Bacillus cereus</i>	Glucosidase	1677	599	No leader sequence		68.2	48.8	---	53.2

*Comparison between 68J and nonfunctional fragments from incomplete sucrose isomerase genes. Sudz # sequences are disclosed in patent to Studzucker (Maites *et al.*).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Sucrose isomerase from 68J showed the highest conversion efficiency among the tested isomerases

When the SI genes from *Erwinia rhapontici*, 14S and 68J were arranged for expression using the same vector (same promoter, start codon and termination sequences), there was no significant difference in total protein content or in expression level of sucrose isomerases, at around 10% of total protein (Table 3). However, the conversion efficiency from sucrose to isomaltulose by the cloned 68J gene product is 10 times that of the *Erwinia rhapontici* and 18 times that of the 14S gene products (Figure 7). In addition, the sucrose isomerase of 68J generated relatively smaller proportions of glucose and fructose than that of 14S and *Erwinia rhapontici*. All other factors during gene expression and enzyme activity quantification were identical: the same ATG start codon context for gene constructs, the same vector pET 24b, the same host cell strain BL21(DE3), the same culture conditions, the same cell density before and after IPTG induction, the same amount of cells used for sucrose conversion, the same amount of total protein loaded on to SDS-PAGE and the same volume of supernatant with the same total protein content loaded on to CE. The experiment was performed three times with the same outcomes.

The experimental results show high potential of the sucrose isomerase from 68J in industrial applications for isomaltulose production.

TABLE 3. Total protein contents and assumed sucrose isomerase protein contents in *E.coli* cells with a SI gene of *Erwinia rhapontici*, 14S or 68J.[#]

Sucrose isomerase	Total protein content (% dry weight)	Sucrose isomerase content (% total proteins)
<i>Erwinia rhapontici</i>	15.97 ± 1.63	12.2 ± 1.5
14S	15.75 ± 1.38	11.8 ± 0.5
68J	16.12 ± 1.79	12.4 ± 1.2
Control	14.36 ± 2.04	1.9 ± 0.6

[#] Results are means ± standard errors derived from 3 replications.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 89 -

*Including background of approximately 2% proteins that migrated with the sucrose isomerase.

Sugarcane transgenic callus with 68J sucrose isomerase also showed the highest conversion ratio among the tested sucrose isomerase gene constructs

5 Isomaltulose could be found in the cell extracts of transgenic sugarcane callus expressing the sucrose isomerase genes. Three out of three tested 68J transgenic lines showed the isomaltulose peak higher than the sucrose peak on the CE electrograph (Figure 8A). In contrast, three out of seven tested 14S transgenic lines showed the isomaltulose peak lower than the sucrose peak (Figure 8B). Isomaltulose could not be detected in the
10 calli of the other four tested 14S transgenic lines. The transgenic callus with the *Erwinia rhapontici* gene showed even lower isomaltulose levels than the 14S lines (Figure 8C).

These results show for the first time the feasibility of production of isomaltulose by expression of sucrose isomerase in plants, and the high potential of sucrose isomerase 68J for this purpose.

15

The disclosure of every patent, patent application, and publication cited herein is hereby incorporated herein by reference in its entirety.

The citation of any reference herein should not be construed as an admission that such reference is available as "Prior Art" to the instant application

20

Throughout the specification the aim has been to describe the preferred embodiments of the invention without limiting the invention to any one embodiment or specific collection of features. Those of skill in the art will therefore appreciate that, in light of the instant disclosure, various modifications and changes can be made in the particular embodiments exemplified without departing from the scope of the present
25 invention. All such modifications and changes are intended to be included within the scope of the appended claims.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

CLAIMS

1. A method for isolating novel polynucleotides encoding isomaltulose-producing sucrose isomerase enzymes, said method comprising:
- 5 (a) obtaining an environmental sample from a location in which organisms, capable of converting sucrose to isomaltulose, have a selective advantage;
- (b) screening for organisms producing isomaltulose from sucrose; and
- (c) isolating polynucleotides encoding isomaltulose-producing sucrose isomerase enzymes from isomaltulose-producing organisms.
2. The method of claim 1, further comprising selecting or otherwise enriching for dual sucrose- and isomaltulose-metabolising organisms which are capable of using both sucrose and isomaltulose as carbon sources for growth.
3. The method of claim 2, wherein said selection or enrichment comprises growing organisms of said environmental sample on an isomaltulose-containing medium for a time and under conditions sufficient to select or enrich for isomaltulose-metabolising organisms and growing said isomaltulose-metabolising organisms on a sucrose-containing medium for a time and under conditions sufficient to select or enrich for said dual sucrose- and isomaltulose-metabolising organisms.
4. The method of claim 2, wherein said selection or enrichment comprises growing organisms of said environmental sample on a sucrose-containing medium for a time and under conditions sufficient to select or enrich for sucrose-metabolising organisms and growing said sucrose-metabolising organisms on an isomaltulose-containing medium for a time and under conditions sufficient to select or enrich for said dual isomaltulose- and sucrose-metabolising organisms.
5. The method of claim 1, wherein said screening utilises an assay that quantifies isomaltulose production by an organism.
6. The method of claim 5, wherein said assay is an aniline/diphenylamine assay.
7. The method of claim 1, wherein said environmental sample comprises soil or plant matter.
8. The method of claim 1, wherein said environmental sample is obtained from a location that is subject to periodic or constant availability of substantial sucrose concentrations.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 91 -

9. The method of claim 8, wherein said location is selected from a factory involved in processing or storage of sugar-containing plants or plant parts or a field containing remnants of harvested sugar-containing plants.
10. The method of claim 9, wherein said sugar-containing plant is sugar beet or sugarcane.
- 5 11. The method of claim 9, wherein said sugar-containing plant is sugarcane.
12. The method of claim 1, wherein said polynucleotides are isolated using a probe specific for sucrose isomerase-encoding polynucleotides.
13. The method of claim 1, wherein said polynucleotides are isolated using a probe that is capable of hybridising to a nucleotide sequence encoding a sucrose isomerase consensus sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24, or variant thereof.
- 10 14. The method of claim 13, wherein said variant has at least 80% sequence identity to any one of the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24.
15. The method of claim 13, wherein said nucleotide sequence comprises the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36 or nucleotide sequence variant thereof.
- 15 16. The method of claim 15, wherein said nucleotide sequence variant has at least 60% sequence identity to any one of the sequences set forth in SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36.
17. The method of claim 15, wherein said nucleotide sequence variant is capable of hybridising to any one of the sequences identified by SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36 under at least low stringency conditions.
- 20 18. An isolated polypeptide, or a biologically active fragment thereof, or a variant or derivative of these, said polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 2 or 4 comprises a contiguous sequence of amino acids contained within SEQ ID NO: 26 or variant thereof.
- 25 19. The polypeptide of claim 18, wherein said biologically active fragment is at least 6 amino acids in length.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 92 -

20. The polypeptide of claim 18, wherein said biologically active fragment comprises at least one consensus sequence selected from SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 or 24.
21. The polypeptide of claim 18, wherein said variant has at least 75% sequence identity to any one of the sequences set forth in SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, and 26.
- 5 22. The polypeptide of claim 18, wherein said variant comprises the consensus sequence set forth in any one or more of SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24 or variant thereof.
23. The polypeptide of claim 22, wherein said consensus sequence variant has at least 80% sequence identity to any one of the sequences set forth in SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24.
- 10 24. An isolated polynucleotide encoding the polypeptide, fragment, variant or derivative of claim 18.
25. An isolated polynucleotide comprising the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9, or a biologically active fragment thereof, or a polynucleotide variant of these, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 1, or 3
- 15 comprises a contiguous sequence of nucleotides contained within SEQ ID NO: 25 or polynucleotide variant thereof.
26. The polynucleotide of claim 25, wherein said biologically active fragment comprises at least 18 nucleotides.
27. The polynucleotide of claim 25, wherein said polynucleotide variant has at least 60%
- 20 sequence identity to any one of the polynucleotides set forth in SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9.
28. The polynucleotide of claim 25, wherein said polynucleotide variant is capable of hybridising to any one of the polynucleotides identified by SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9 under at least low stringency conditions.
29. The polynucleotide of claim 25, wherein said polynucleotide variant comprises a
- 25 nucleotide sequence encoding the consensus sequence set forth in any one or more of SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24 or variant thereof.
30. The polynucleotide of claim 29, wherein said nucleotide sequence is selected from SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 or 36 or nucleotide sequence variant thereof.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 93 -

31. The polynucleotide of claim 30, wherein said nucleotide sequence variant has at least 60% sequence identity the nucleotide sequence selected from SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 or 36.
32. The polynucleotide of claim 30, wherein said nucleotide sequence variant is capable of hybridising the nucleotide sequence selected from SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 or 36 under at least low stringency conditions.
33. An expression vector comprising said polynucleotide of claim 24 operably linked to a regulatory polynucleotide.
34. An expression vector including a polynucleotide comprising the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9, or a biologically active fragment thereof, or a polynucleotide variant of these, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 1, or 3 comprises a contiguous sequence of nucleotides contained within SEQ ID NO: 25 or polynucleotide variant thereof, wherein the polynucleotide is operably linked to a regulatory polynucleotide.
35. A host cell containing said expression vector of claim 33 or claim 34.
36. The host cell of claim 35, which is a bacterium or other prokaryote.
37. The host cell of claim 35, which is a plant cell or other eukaryote.
38. A plant cell plant containing the expression vector of claim 33 or claim 34, wherein said plant is a species capable of synthesising and/or accumulating sucrose.
39. The plant cell of claim 38, wherein said plant is selected from sugarcane or sugar beet.
40. The plant cell of claim 38, wherein said plant is sugarcane.
41. A method of producing a polypeptide, or a biologically active fragment thereof, or a variant or derivative of these, in recombinant form, said polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 2 or 4 comprises a contiguous sequence of amino acids contained within SEQ ID NO: 26 or variant thereof, said method comprising:

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 94 -

- culturing a host cell containing the expression vector of claim 33 such that said recombinant polypeptide, fragment, variant or derivative is expressed from said polynucleotide; and
 - isolating the said recombinant polypeptide, fragment, variant or derivative.
- 5 42. A method of producing a biologically active fragment of a polypeptide or of a variant or derivative thereof, said polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 2 or 4 comprises a contiguous sequence of amino acids contained within SEQ ID NO: 26 or variant thereof, said method comprising:
- 10 - detecting sucrose isomerase activity associated with a fragment of a polypeptide according to any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or of a variant or derivative thereof, which indicates that said fragment is a said biologically active fragment.
43. A method of producing a biologically active fragment of a polypeptide or of a variant or derivative thereof, said polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 2 or 4 comprises a contiguous sequence of amino acids contained within SEQ ID NO: 26 or variant thereof, said method comprising:
- 15 - introducing into a cell a polynucleotide from which a fragment of a polypeptide according to any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or of a variant or derivative thereof, can be produced; and
- 20 - detecting sucrose isomerase activity, which indicates that said fragment is a said biologically active fragment.
44. A method of producing a polypeptide variant of a parent polypeptide comprising the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or biologically active fragment thereof, said method comprising:
- 25 - producing a modified polypeptide whose sequence is distinguished from the parent polypeptide by substitution, deletion or addition of at least one amino acid; and
- 30 - detecting sucrose isomerase activity associated with the modified polypeptide, which indicates that that said modified polypeptide is a said polypeptide variant.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 95 -

45. A method of producing a polypeptide variant of a parent polypeptide comprising the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or biologically active fragment thereof, said method comprising:
- 5 - producing a polynucleotide from which a modified polypeptide can be produced, said modified polypeptide having sequence that is distinguished from the parent polypeptide by substitution, deletion or addition of at least one amino acid;
 - introducing said polynucleotide into a cell; and
 - detecting sucrose isomerase activity, which indicates that said modified polypeptide is a said polypeptide variant.
- 10 46. A method for producing isomaltulose from sucrose, said method comprising contacting sucrose or a sucrose-containing substrate with the polypeptide, fragment, variant or derivative of claim 18, or with the host cell of claim 33 or claim 34, for a time and under conditions sufficient to produce isomaltulose.
- 15 47. An antigen-binding molecule that is immuno-interactive with the polypeptide, fragment, variant or derivative of claim 18.
48. The antigen-binding molecule of claim 47, which is immuno-interactive with an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 or 24 or a variant of said sequence having at least 80% sequence identity thereto.
- 20 49. A method for detecting a specific polypeptide or polynucleotide, comprising detecting the sequence of:
- (c) SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, or biologically active fragment thereof at least 6 amino acids in length, or variant of these, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 2 or 4 comprises a contiguous sequence of amino acids contained within SEQ ID NO: 26 or variant thereof; or
 - 25 (d) a polynucleotide encoding (a).
- 30 50. The method of claim 49, wherein the sequence of (b) is selected from SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9, or a biologically active fragment thereof at least 18 nucleotides in length, or a polynucleotide variant of these, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 1, or 3 comprises a contiguous sequence of nucleotides contained within SEQ ID NO: 25 or polynucleotide variant thereof.

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 96 -

51. A method of detecting a sucrose isomerase in a sample, comprising:
- contacting the sample with the antigen-binding molecule of claim 47; and
 - detecting the presence of a complex comprising said antigen-binding molecule and a polypeptide, or a biologically active fragment thereof, or a variant or derivative of these, in said contacted sample, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10.
52. A method for detecting a sucrose isomerase in a sample, comprising:
- detecting expression in a cell of a polynucleotide encoding a polypeptide, or a biologically active fragment thereof, or a variant or derivative of these, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10, with the proviso that said biologically active fragment of SEQ ID NO: 2 or 4 comprises a contiguous sequence of amino acids contained within SEQ ID NO: 26 or variant thereof.
53. The method of claim 52, wherein expression is detected using a probe specific for sucrose isomerase-encoding polynucleotides.
54. The method of claim 52, wherein expression is detected using a probe that is capable of hybridising to a nucleotide sequence encoding a sucrose isomerase consensus sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24, or variant thereof.
55. The method of claim 54, wherein said variant has at least 80% sequence identity to any one of the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 and 24.
56. The method of claim 54, wherein said nucleotide sequence comprises the sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36 or nucleotide sequence variant thereof.
57. The method of claim 56, wherein said nucleotide sequence variant has at least 60% sequence identity to any one of the sequences set forth in SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36.
58. The method of claim 56, wherein said nucleotide sequence variant is capable of hybridising to any one of the sequences identified by SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36 under at least low stringency conditions.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

- 97 -

59. A probe comprising a nucleotide sequence which is capable of hybridising to at least a portion of a nucleotide sequence encoding SEQ ID NO: 2, 4, 8 and 10 under at least low stringency conditions.
60. A probe comprising a nucleotide sequence which is capable of hybridising to at least a portion of SEQ ID NO: 1, 3, 7 and 9 under at least low stringency conditions.
61. A method of isolating a sucrose isomerase from a sample, comprising:
- contacting the sample with the antigen-binding molecule of claim 47 to form a complex comprising the sucrose isomerase and the antigen-binding molecule; and
 - separating the sucrose isomerase from the complex.
62. A transformed plant cell containing the expression vector of claim 33 or claim 34.
63. The plant cell of claim 62, wherein said plant is a species capable of synthesising and/or accumulating sucrose.
64. The plant cell of claim 62, wherein said plant is selected from sugarcane or sugar beet.
65. The plant cell of claim 62, wherein said plant is sugarcane.
66. A differentiated plant comprising plant cells containing the expression vector of claim 33 or claim 34.
67. A method of producing isomaltulose, comprising
- cultivating a differentiated plant comprising plant cells containing the expression vector of claim 33 or claim 34; and
 - harvesting isomaltulose from said cultivated plant.
68. Isomaltulose harvested from a differentiated plant comprising plant cells containing the expression vector of claim 33 or claim 34.

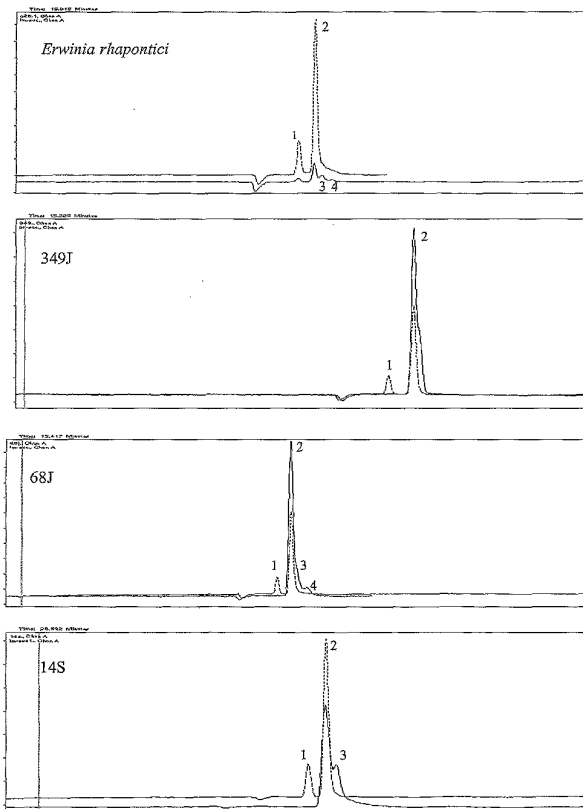


FIGURE 1

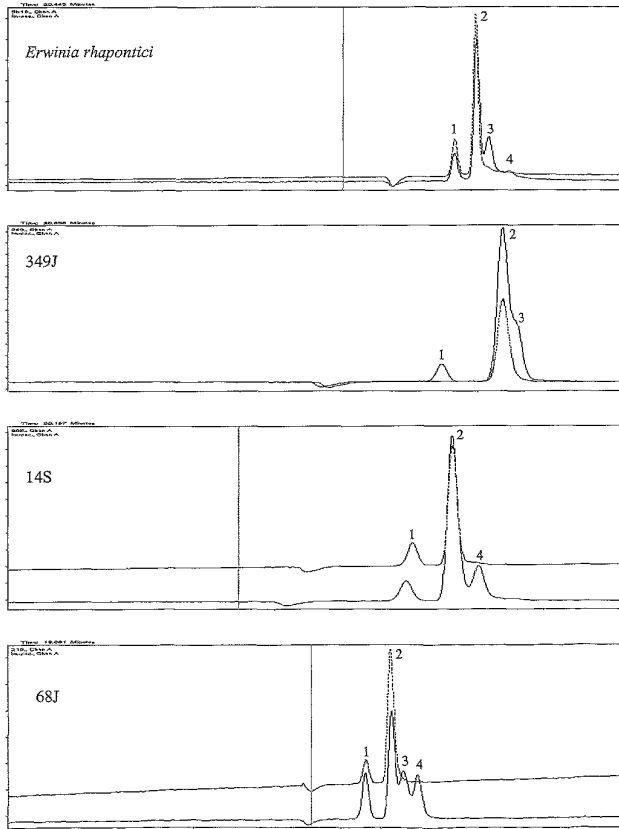


FIGURE 2

WO 02/18603

3/8

PCT/AU01/01084

```

1 ATGTCCTCTC AAGAATTGAA AGGGGCTGTC GCTATTTTTC TTGCAACCAC 50
51 TTTTTCCTGCC ACATCCTATC AGGCTGCGAG TGCCGGGCCA GATACCCGCC 100
101 CCTCACTCAC CGTTCAGCAA TCAAATGCCC TGCCACACATG GTGGAAGCAG 150
151 GCTGTTTTTT ATCAGGTATA TCCAGGCTCA TTTAAAGATA CGAATGGGGA 200
201 TGGCAITGGG GATTTAAACG GTATTATTGA GAATTTAGAC TATCTGAAGA 250
251 AACTGGGTAT TGATGCGATT TGGATCAATC CACATTACGA TTCCCGGAAT 300
301 ACGGATAAATG GTTATGACAT CCGGGATTAC CGTAAGATAA TGAAAGAATA 350
351 CGGTACGATG GAAGACTTTG ACCGCTTTAT TTCAGAAATG AAGAAACGCA 400
401 ATATGCGTTT GATGATTGAT ATTGTTATCA ACCACACCAG CGATCAGCAT 450
451 GCGTGGTTTG TTCAGAGCAA ATCGGGTAAG AACACCCCTT ACAGGGACTA 500
501 TTACTTCTGG CGTGACGGTA AGGATGGCCA TGCCCCCAAT AACTATCCCT 550
551 CCTTCTCGG TGGCTCAGCC TGGGAAAAG ACGATAAATC AGGCAGTAT 600
601 TACCTCCATT ACTTTGCCAA ACAGCAACCC GACCTCAACT GGGCAATACC 650
651 CAAAGTCCGT CAAGACCTGT ATGACATGCT CCGCTTCTGG TTGATATAAG 700
701 GCGTTTTTGG TTTACGCTTT GATACCGTTG CCACCTATTC AAAAATCCCG 750
751 AACTTCCCTG ACCTTAGCCA ACAGCAGTTA AAAAATTTTC CCGAGGAATA 800
801 TACTAAAGGT CCTAAAATC ACGACTACGT GAATGAAATG AACAGAGAAG 850
851 TATTATCCCA CTATGATATC GCCACTGCGG GGGAAATATT TGGGTTCTCT 900
901 CTGGATAAAT CGATTAAGTT TTTCCGATCGC CGTAGAATG AATTAAATAT 950
951 AGCGTTTACG TTTGATCTGA TCAGACTCGA TCGTGATGCT GATGAAAGAT 1000
1001 GCGCGCGAAA AGACTGGACC CTTTCGCAAT TCCGAAAATG TGTGATAAG 1050
1051 GTTGAACAAA CGGCAGGAGA GTATGGGTGG AATGCGCTTT TCTTAGACAA 1100
1101 TCACGACAAAT CCGCGCGCGG TTCTCACTT TGGTGATGAT CGACCACAA 1150
1151 GCGCGAGCA TGCGCGGAAA GCACTGGCAA CATTGACGCT GACCCAGCGT 1200
1201 GCAACGCGGT TTATCTATCA GGGTTCAGAA CTCGGTATGA CCAATTAATC 1250
1251 CTTTAAAAAA ATCGATGATT TCGATGATGT AGAGGTGAAA GGTTTTGGC 1300
1301 AAGACTACGT TGAAACAGGC AAAGTGAAG CTCAGGAATT CCTTCMNAAC 1350
1351 TTAGCCCAA CCAAGCCGTA TAACAGCAGA ACCCCCTCC AGTGGGATGC 1400
1401 AAGCAAAAT GCGGGCTTTA CCAAGCGAAC CCCTTGCTTA AAAATCAATC 1450
1451 CCAATTAATA AGAAATCAAC AGCGCAGATC AGATTAACA TCCAAATTC 1500
1501 GTATTTAACT ATTATAGAAA GCTCATTAAC ATTCGCCACG ACATCCCTGC 1550
1551 CTTAACCTAC GGCAGTTATA TTGATTTAGC TCCTGACAA CAAATCAGTCT 1600
1601 ATGCTTACAC TCGAACGTTT GCGCTGAAA AATATCTTGT GGTCAATTAAT 1650
1651 TTTAAAGAAG AAGTGAATGA CTACACCCCTG CCTGGGGATT TATCCATCAA 1700
1701 TAAGGTGATT ACTGAAAACA ACAGTCAAC TATTGTGAAT AAAAATGAGC 1750
1751 TAGAAGATCC TCGTGGGGCT ACAAGCGTTT GTAGCCCTT CCAAGGCTCAA 1800
1801 AAAAGGCCCTG GCGACCCGGG TTACTCTGCT GCCCATTCGA TTCGTTCTTT 1850
1851 GCCCGGTTT TTCGCTCAT ACAGGGCGA CATCCACGCG TTTAGTAA 1899

```

FIGURE 3

WO 02/18603

4/8

PCT/AU01/01084

```

1 ATGTTTCTTA ATGGATTTAA GACAGTTATT GCTCTGACTA TGGCAAGCTC 50
51 GTTTTATCTT GCCGCCAGCC CGTTAACTAA GCCATCGACC CCTATTGCCG 100
101 CAACGAATAT ACAAAAATCC GCTGATTTTC CCATTTGGTG GAAACAGGCA 150
151 GTATTTTACC AGATTTATCC CCGCTCATTT AARGATAGCA ATGGTGATGG 200
201 TATCCGGCGAT ATCCCGGTA TCATTGAGAA ACTGGACTAT TTAATAATGC 250
251 TGGGAGTTGA TGCTATCTGG ATAAACCCGC ACTATGAGTC TCCTAACACC 300
301 GACAAATGGT ACGATAITAG TGATTATCGT AAAATCATGA AGGAGTACGG 350
351 CAGCAATGGCT GACTTTGACC GTCTGGTTGC CGAAATGAAT AAACGTGGTA 400
401 TGGCCCTGAT GATTGATATT GTTATCAATC ATACCAGCGA TCGCACCCG 450
451 TGGTTTCTGC AGAGCCCTTC AGSTAAAGAT AATCCTTACC GCGACTATTA 500
501 TTTCTGGCGT GATGGTAAAC AGGACACGGC TCCCAATAAC TATCCCTCTT 550
551 TCTTTGGCGG TTCAGCCTGG CAACTGGATA AACAGACTGA CCAGTATTTA 600
601 CTGCACTATT TTGCACCACA GCAGCCGGAT CTGAAGTGGG ATAACCCAAA 650
651 AGTTCCGGCT GAACCTCTAG ATATTCTCGC TTTCTGGCTG GATAAAGGGG 700
701 TATCCGGACT ACGTTTIGAT ACCGTGGCTA CTTTCTCCA AATTCTTGGC 750
751 TTCCCGGACC TGTCAAAGC GCAGCTGAAG AATTTTGGCG AAGCTTATAC 800
801 TGAGGGGCGG AATATTCTA AATATATCCA TGAATGAAC CGCCAGGTAC 850
851 TGTCTAAATA TAATGTTGCC ACCGTGGTG AAATCTTCGG TGTGCCAGTG 900
901 AGTGCATATG CCGATTATTT TGACCGCGG CGTGAAGAAC TCAATATTCG 950
951 TTTCACTTTT GATTGATCA GGCTCGATC TTATCCCGAT CAGCGCTGGC 1000
1001 GTCGTAAACC ATGGACATTA AGCCAGTTTC GTCAAGTTAT CTCTCAGACT 1050
1051 GACCGTGGCC CCGGTGAATT TGGCTGGAAC GCCTTTTPCC TTGATAACCA 1100
1101 TGATAACCCG CGCCAGGTCT CACACTTTGG TGACGACAGC CCACAAATGGC 1150
1151 GCGAACGCTC GCGAAAAGCA CTGGCAGCGC TGCCTGCTGAC GCAGCGTGGC 1200
1201 ACCCCGTTTA TCTTTCAGGG GCGCGAGTTG GGAATGACTA ATTACCCCTT 1250
1251 TAAAAATATA GAGGAATTTG ATGATATTGA GGTAAAGGC TTCTGGAACG 1300
1301 ACTATGTAGC CAGCGGAAAA GTAAACGCTG CTGAATTTTT ACAGGAGGTT 1350
1351 CGCATGACCA GCCCGGATAA CAGCCGAACA CCAATGCAGT GGAACGACTC 1400
1401 TGTAAATGCC GGATTCACCC AGGCCAAACC CTGGTTTCAC CTCAATCCCA 1450
1451 ACTATAAGCA AATCAATGCC GCCAGGNGG TGAATAAACC CGACTCGGTA 1500
1501 TTCAGTACT ACCGTCAACT GATCAACCTG CGTCAACAGA TCCCGGCACT 1550
1551 GACCAATGGT GAATACCGTG ATCTOGATCC GCAGAATAAC CAGGCTCTATG 1600
1601 CCTATACCCG TATACTGGAT AATGAAAAT ATCTGGTGGT AGTTAATTTT 1650
1651 AAACCTGAGC AGCTGCATTA CGCTCTGCCA GATAATCTGA CTATTGCCAG 1700
1701 CACTCTGCTG GAAAATGTC ACCAACCTC ACTGCAAGAA AATGCCCTCA 1750
1751 CGCTGACTCT TGCTCCGTGG CAAGCCGGGA TCTATAAGCT GAATCGA 1797

```

FIGURE 4

WO 02/18603

5/8

PCT/AU01/01084

```

1  MSSQELKAAV  AIFLATTFSA  TSYQACSAGP  DTAPSLTVQQ  SNALPTWWKQ  50
51 AVFYQVYPRS  FKDTNGDGIG  DLNGIIEMLD  YLKKLGIDAI  WINPHYDSPN  100
101 TDNGYDIRDY  RKIMKEYGTM  EDFDRLISEM  KKRNMRLMID  IVINHTSDQH  150
151 AWFVQSKSGK  NNPYRDYYFW  RDGKDGHAPN  NYPSFFGGSA  WEKDDKSGQY  200
201 YLHYPAKQQP  DLNWDNPKVR  QDLYDMLRFW  LDKGVXGLRF  DTVATYSKIP  250
251 NFPDLSQQQL  KNFAEETKGG  PKIHDIYNEM  NREVLSHYDI  ATAGEIFGVP  300
301 LDKSIKFPDR  RRNELNIAFT  FDLIRLDRDA  DERWRRKDMT  LSQPFKIVDK  350
351 VDQTAGEYGW  NAFFLDNHDN  PRAVSHFGDD  RPQWRHAHA  ALATLTLTQR  400
401 ATPFIYQGSE  LGMTNYPFKK  IDDFDDVEVK  GFWQDYVETG  KVKAEEFLXN  450
451 VRQTSRDNSR  TPFQWDASKN  AGFTSGTPWL  KINPNYKEIN  SADQINNPN  500
501 VFNYYRKLIN  IRHDIPALTY  GSYIDLAPDN  NSVYAYTRTF  GAEKYLVVIN  550
551 FKEEVMHYTL  PGDLSINKVI  TENNSHTIVN  KNDVEDPRGA  TSVCSPPQAQ  600
601 KRPGDPGYSA  AHSIRFLPRF  FASYRGLIHA  FK*  632

```

FIGURE 5

WO 02/18603

6/8

PCT/AU01/01084

```
1  MFLNGFKTVI  ALTMASFFYL  AASPLTKPST  PIAATNIQKS  ADFPIWWKQA  50
51 VFYQIYPRSF  KDSNGDGIGD  IPGIIKLDY  LKMLGVDAIW  INPHYSEPT  100
101 DNGYDISDYR  KIMKEYGSMA  DFDRLVAEMN  KRGMRLMIDI  VINHTSDRHR  150
151 WFWQSRSGKD  NPYRDYYFWR  DGKQGQAPNN  YPSFFGGSAA  QLDKQTDQYY  200
201 LHYFAPQQFD  LNWDNPKVRA  ELYDILRFL  DKGVSGLRFD  TVATPSKIPG  250
251 FPDLSKAQLK  NFABAYTEGP  NIHKYIHEMN  RQVLSKYNVA  TAGEIFGVV  300
301 SAMPDYFDRR  REELNIAFTF  DLIRLDYYP  QRWRKRWTL  SQFRQVISQT  350
351 DRAAGEFGWN  AFFLDNHDNP  RQVSHFGDDS  PQRWRSRKA  LATLLLTQRA  400
401 TPFIFQGAEL  GMTNYPFKNI  EEFDDIEVKG  FWNQYVAGSK  VNAEFLQEV  450
451 RMTSRDNRST  PMQWNSVNA  GFTQCKPWFH  LNPYKQINA  ARXVKNPDSV  500
501 FSYRQLINL  RHQIPALPSG  EYRDLDPQNN  QVYAYTRILD  NEKYLVVVNF  550
551 KPEQLHYALP  DNLTIASLL  ENVHQPSLQE  NASTLTLAPW  QAGIYKLN*  598
```

FIGURE 6

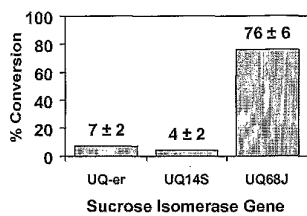


FIGURE 7

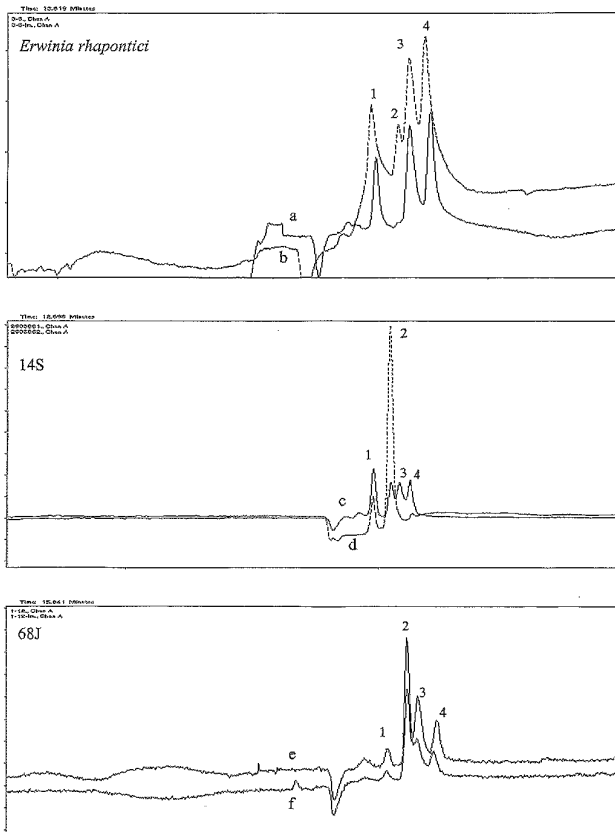


FIGURE 8

WO 02/18603

1

PCT/AU01/01084

SEQUENCE LISTING

<110> The University of Queensland (All designated States, except U.S.)
 Birch, Robert (U.S. only)

<120> Novel polypeptides and polynucleotides and uses therefor

<130> Sucrose isomerases

<140> Not yet assigned

<141> 2001-08-29

<150> AU EQ9788/00

<151> 2000-08-29

<160> 39

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1899

<212> DNA

<213> Erwinia rhapsontici

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1896)

<223>

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(108)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (109)..(1899)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (707)..(707)

<223> n = unknown nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1347)..(1347)

<223> n = unknown nucleotide

<400> 1

atg tcc tct caa gaa ttg aaa gcg gct gtc gct att ttt ctt gca acc	48
Met Ser Ser Gln Glu Leu Lys Ala Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr	
-35 -30 -25	

act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc ggg cca gat acc	96
Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr	
-20 -15 -10 -5	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

2

PCT/AU01/01084

gcc ccc tca ctc acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg 144
 Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
 -1 1 5 10

aag cag gct gtt ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg 192
 Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 15 20 25

aat ggg gat ggc att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac 240
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp
 30 35 40

tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac 288
 Tyr Leu Lys Lys Leu Thr Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 45 50 55 60

gat tcg cag aat acg gat aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag 336
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
 65 70 75

ata atg aaa gaa tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca 384
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
 80 85 90

gaa atg aag aaa cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac 432
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn
 95 100 105

cac acc agc gat cag cat cgc tgg ttt gtt cag agc aaa tgc ggt aag 480
 His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys
 110 115 120

aac aac ccc tac agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat gcc 528
 Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly
 125 130 135 140

cat gcc ccc aat aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa 576
 His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu
 145 150 155

aaa gac gat aaa tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag 624
 Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
 160 165 170

caa ccc gac ctc aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat 672
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
 175 180 185

gac atg ctc cgc ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tnt ggt tta cgc ttt 720
 Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Xaa Gly Leu Arg Phe
 190 195 200

gat acc gtt gcc acc tat tca aaa atc cag aac ttc cct gac ctt agc 768
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser
 205 210 215 220

caa cag cag tta aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa 816
 Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys
 225 230 235

att cac gac tac gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat 864
 Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603	3			PCT/AU01/01084
	240	245	250	
gat atc gcc act gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg 912				
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser	255	260	265	
att aag ttt ttc gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg 960				
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	270	275	280	
ttt gat ctg atc aga ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga 1008				
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg	285	290	295	300
aaa gac tgg acc ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac 1056				
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp	305	310	315	
caa acg gca gga gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac 1104				
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	320	325	330	
gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg 1152				
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	335	340	345	
gcg gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca tbg acg ctg acc cag cgt 1200				
Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	350	355	360	
gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat 1248				
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	365	370	375	
ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt 1296				
Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe	385	390	395	
tgg caa gac tac gtt gaa aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt 1344				
Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu	400	405	410	
can aac gta cgc caa acc agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag 1392				
Thr Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	415	420	425	
tgg gat gca agc aaa aat gcg ggc ttt acc agc gga acc cct tgg tta 1440				
Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu	430	435	440	
aaa atc aat ccc aat tat aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aac 1488				
Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn	445	450	455	460
aat cca aat tcc gta ttt aac tat tat aga aag ctc att aac att cgc 1536				
Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg	465	470	475	
cac gac atc cct gcc tta acc tac ggc agt tat att gat tta gct cct 1584				
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Ala Pro	480	485	490	
gac aac aat tca gtc tat gct tac act cga acg ttt ggc gct gaa aaa 1632				

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

4

```

Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Phe Gly Ala Glu Lys
   495                               500           505
tat ctt gtg gtc att aat ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg   1680
Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu
   510                               515           520
cct ggg gat tta tcc atc aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac   1728
Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His
   525                               530           535           540
act att gtg aat aaa aat gac gta gaa gat cct cgt ggg gct aca agc   1776
Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Val Glu Asp Pro Arg Gly Ala Thr Ser
   545                               550           555
gtt tgt agc ccc ttc cag gct caa aaa agg cct ggc gac ccg ggt tac   1824
Val Cys Ser Pro Phe Gln Ala Gln Lys Arg Pro Gly Asp Pro Gly Tyr
   560                               565           570
bct gct gcc cat tcg att cgg ttc ttg ccc cgg ttt ttc gct tca tac   1872
Ser Ala Ala His Ser Ile Arg Phe Leu Pro Arg Phe Phe Ala Ser Tyr
   575                               580           585
egg ggc gac atc cac gcg ttt aag taa   1899
Arg Gly Asp Ile His Ala Phe Lys
   590                               595

```

```

<210> 2
<211> 632
<212> PRT
<213> Erwinia rhapsontici

<220>
<221> misc_feature
<222> (200)..(200)
<223> The 'Xaa' at location 200 stands for Tyr, Cys, Ser, or Phe.

<220>
<221> misc_feature
<222> (707)..(707)
<223> n = unknown nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1347)..(1347)
<223> n = unknown nucleotide

<400> 2
Met Ser Ser Gln Glu Leu Lys Ala Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr
  -35                               -30           -25

Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr
  -20                               -15           -10           -5

Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
   -1  1                               5           10

Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603 7 PCT/AU01/01084

525 530 535 540

Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Val Glu Asp Pro Arg Gly Ala Thr Ser
545 550 555

Val Cys Ser Pro Phe Gln Ala Gln Lys Arg Pro Gly Asp Pro Gly Tyr
560 565 570

Ser Ala Ala His Ser Ile Arg Phe Leu Pro Arg Phe Phe Ala Ser Tyr
575 580 585

Arg Gly Asp Ile His Ala Phe Lys
590 595

<210> 3
<211> 1791
<212> DNA
<213> Erwinia rhapsodica

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1788)
<223>

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(1791)
<223>

<220>
<221> misc_feature
<222> (599)..(599)
<223> n = unknown nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1239)..(1239)
<223> n = unknown nucleotide

<400> 3
acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg aag cag gct gtt 48
Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val
1 5 10 15

ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg aat ggg gat ggc 96
Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly
20 25 30

att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac tat ctg aag aaa 144
Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys
35 40 45

ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac gat tcg cgg aat 192
Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603	8	PCT/AU01/01084
50	55	60
acg gat aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag ata atg aaa gaa 240 Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu 65 70 75 80		
tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca gaa atg aag aaa 288 Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys 85 90 95		
cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac cac acc agc gat 336 Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn His Thr Ser Asp 100 105 110		
cag cat cgc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag aac aac ccc tac 384 Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys Asn Asn Pro Tyr 115 120 125		
agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc cat gcc ccc aat 432 Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly His Ala Pro Asn 130 135 140		
aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa aaa gac gat aaa 480 Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu Lys Asp Asp Lys 145 150 155		
tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag caa ccc gac ctc 528 Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln Gln Pro Asp Leu 165 170 175		
aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat gac atg ctc cgc 576 Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr Asp Met Leu Arg 180 185 190		
ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tnt ggt tta cgc ttt gat acc gtt gcc 624 Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Xaa Gly Leu Arg Phe Asp Thr Val Ala 195 200 205		
acc tat tca aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc caa cag cag tta 672 Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser Gln Gln Gln Leu 210 215 220		
aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa att cac gac tac 720 Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys Ile His Asp Tyr 225 230 235 240		
gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat gat atc gcc act 768 Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr Asp Ile Ala Thr 245 250 255		
gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg att aag ttt ttc 816 Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser Ile Lys Phe Phe 260 265 270		
gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata cgc ttt acg ttt gat ctg atc 864 Asp Arg Arg Asp Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe Asp Leu Ile 275 280 285		
aga ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga aaa gac tgg acc 912 Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg Lys Asp Trp Thr 290 295 300		
ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac caa acg gca gga 960		

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

9

Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp Gln Thr Ala Gly	
305	310 315 320
gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac gac aat ccc cgc	1008
Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg	
	325 330 335
gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg cgc gag cat gcg	1056
Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp Arg Glu His Ala	
	340 345 350
gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt gca acg ccg ttt	1104
Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe	
	355 360 365
atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat ccc ttt aaa aaa	1152
Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys	
	370 375 380
atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt tgg caa gac tac	1200
Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr	
	385 390 395 400
ggt gaa aca gcc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt can aac gta cgc	1248
Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu Thr Asn Val Arg	
	405 410 415
caa acc agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag tgg gat gca agc	1296
Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser	
	420 425 430
aaa aat gcg gcc ttt acc agc gga acc cct tgg tta aaa atc aat ccc	1344
Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro	
	435 440 445
aat tat aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aac aat cca aat tcc	1392
Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser	
	450 455 460
gta ttt aac tat tat aga aag ctc att aac att cgc cac gac atc cct	1440
Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro	
	465 470 475 480
gcc tta acc tac gcc agt tat att gat tta gct cct gac aac aat tca	1488
Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Ala Pro Asp Asn Asn Ser	
	485 490 495
gtc tat gct tac act cga acg ttt gcc gct gaa aaa tat ctt gtg gtc	1536
Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Phe Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val	
	500 505 510
att aat ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg cct ggg gat tta	1584
Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu	
	515 520 525
tcc atc aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac act att gtg aat	1632
Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn	
	530 535 540
aaa aat gac gta gaa gat cct cgt ggg gct aca agc gtt tgt agc ccc	1680
Lys Asn Asp Val Glu Asp Pro Arg Gly Ala Thr Ser Val Cys Ser Pro	
	545 550 555 560
ttc cag gct caa aaa agg cct gcc gac ccg ggt tac tct gct gcc cat	1728

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

PCT/AU01/01084

10

```

Phe Gln Ala Gln Lys Arg Pro Gly Asp Pro Gly Tyr Ser Ala Ala His
      565                               570                               575

tcg att cgg ttc ttg ccc cgg ttt ttc gct tca tac agg ggc gac atc   1776
Ser Ile Arg Phe Leu Pro Arg Phe Phe Ala Ser Tyr Arg Gly Asp Ile
      580                               585                               590

cac gcg ttt aag taa                                           1791
His Ala Phe Lys
      595

<210> 4
<211> 596
<212> EMT
<213> Erwinia rhapsontici

<220>
<221> misc_feature
<222> (200)..(200)
<223> The 'Xaa' at location 200 stands for Tyr, Cys, Ser, or Phe.

<220>
<221> misc_feature
<222> (599)..(599)
<223> n = unknown nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1239)..(1239)
<223> n = unknown nucleotide

<400> 4
Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val
 1                               5                               10                               15

Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly
 20                               25                               30

Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys
 35                               40                               45

Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn
 50                               55                               60

Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu
 65                               70                               75                               80

Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys
 85                               90                               95

Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn His Thr Ser Asp
 100                              105                              110

Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys Asn Asn Pro Tyr
 115                              120                              125

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

11

PCT/AU01/01084

Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly His Ala Pro Asn
 130 135 140

Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu Lys Asp Asp Lys
 145 150 155 160

Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln Gln Pro Asp Leu
 165 170 175

Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr Asp Met Leu Arg
 180 185 190

Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Xaa Gly Leu Arg Phe Asp Thr Val Ala
 195 200 205

Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser Gln Gln Gln Leu
 210 215 220

Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys Ile His Asp Tyr
 225 230 235 240

Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr Asp Ile Ala Thr
 245 250 255

Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser Ile Lys Phe Phe
 260 265 270

Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe Asp Leu Ile
 275 280 285

Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg Lys Asp Trp Thr
 290 295 300

Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp Gln Thr Ala Gly
 305 310 315 320

Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg
 325 330 335

Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp Arg Glu His Ala
 340 345 350

Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe
 355 360 365

Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys
 370 375 380

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

12

PCT/AU01/01084

Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr
 385 390 395 400
 Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu Thr Asn Val Arg
 405 410 415
 Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser
 420 425 430
 Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro
 435 440 445
 Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser
 450 455 460
 Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro
 465 470 475 480
 Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Ala Pro Asp Asn Asn Ser
 485 490 495
 Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Phe Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val
 500 505 510
 Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu
 515 520 525
 Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn
 530 535 540
 Lys Asn Asp Val Glu Asp Pro Arg Gly Ala Thr Ser Val Cys Ser Pro
 545 550 555 560
 Phe Gln Ala Gln Lys Arg Pro Gly Asp Pro Gly Tyr Ser Ala Ala His
 565 570 575
 Ser Ile Arg Phe Leu Pro Arg Phe Phe Ala Ser Tyr Arg Gly Asp Ile
 580 585 590
 His Ala Phe Lys
 595

<210> 5
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> *Erwinia zhapontici*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

13

PCT/AU01/01084

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(108)
 <223>

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(108)
 <223>

<400> 5
 atg tcc tct caa gaa ttg aaa gcg gct gtc gct att ttt ctt gca acc 48
 Met Ser Ser Gln Glu Leu Lys Ala Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc ggg cca gat acc 96
 Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr
 20 25 30
 gcc ccc tca ctc 108
 Ala Pro Ser Leu
 35

<210> 6
 <211> 36
 <212> PFT
 <213> Erwinia rhapontici

<400> 6
 Met Ser Ser Gln Glu Leu Lys Ala Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr
 20 25 30
 Ala Pro Ser Leu
 35

<210> 7
 <211> 1797
 <212> DNA
 <213> Bacterial isolate 68J

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1794)
 <223>

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(99)
 <223>

<220>

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

14

PCT/AU01/01084

```

<221> mat_peptide
<222> (100)..(1797)
<223>

<220>
<221> misc_feature
<222> (1478)..(1478)
<223> n = unknown nucleotide
_||

<400> 7
atg ttt ctt aat gga ttt aag aca gtt att gct ctg act atg gca agc 48
Met Phe Leu Asn Gly Phe Lys Thr Val Ile Ala Leu Thr Met Ala Ser
-30 -25 -20

tcg ttt tat ctt gcc gcc agc ccg tta act aag cca tcg acc cct att 96
Ser Phe Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Leu Thr Lys Pro Ser Thr Pro Ile
-15 -10 -5

gcc gca acg aat ata caa aag tcc gct gat ttt ccc att tgg tgg aaa 144
Ala Ala Thr Asn Ile Gln Lys Ser Ala Asp Phe Pro Ile Trp Trp Lys
-1 1 5 10 15

cag gca gta ttt tac cag att tat ccc cgc tca ttt aaa gat agc aat 192
Gln Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Ser Asn
20 25 30

ggg gat ggt atc gcc gat att ccc ggt atc att gag aaa ctg gac tat 240
Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Pro Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr
35 40 45

tta aaa atg ctg gga gtt gat gct atc tgg ata aac ccg cac tat gag 288
Leu Lys Met Leu Gly Val Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Glu
50 55 60

tct cct aac acc gac aat ggt tac gat att agt gat tat cgt aaa atc 336
Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr Arg Lys Ile
65 70 75

atg aag gag tac gcc agc atg gct gac ttt gac cgt ctg gtt gcc gaa 384
Met Lys Glu Tyr Gly Ser Met Ala Asp Phe Asp Arg Leu Val Ala Glu
80 85 90 95

atg aat aaa cgt ggt atg cgc ctg atg att gat att gtt atc aat cat 432
Met Asn Lys Arg Gly Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn His
100 105 110

acc agc gat cgt cac cgc tgg ttt gtg cag agc cgt tca ggt aaa gat 480
Thr Ser Asp Arg His Arg Trp Phe Val Gln Ser Arg Ser Gly Lys Asp
115 120 125

aat cct tac cgc gac tat tat ttc tgg cgt gat ggt aaa cag gga cag 528
Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Gln Gly Gln
130 135 140

gct ccc aat aac tat ccc tct ttc ttt gcc ggt tca gcc tgg caa ctg 576
Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Leu
145 150 155

gat aaa cag act gac cag tat tat ctg cac tat ttt gca cca cag cag 624
Asp Lys Gln Thr Asp Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Pro Gln Gln
160 165 170 175

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

15

PCT/AU01/01084

cgc gat ctg aac tgg gat aac cca aaa gtt cgg gct gaa ctc tac gat Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Ala Glu Leu Tyr Asp 180 185 190	672
att ctg cgt ttc tgg ctg gat aaa ggc gta tcc gga cta cgt ttt gat Ile Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe Asp 195 200 205	720
acc gtg gct act ttc tcc aaa att cct ggc ttc cgc gac ctg tca aaa Thr Val Ala Thr Phe Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asp Leu Ser Lys 210 215 220	768
gcg cag ctg aag aat ttt gcc gaa gct tat act gag ggg cgc aat att Ala Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Glu Gly Pro Asn Ile 225 230 235	816
cat aaa tat atc cat gaa atg aac cgc cag gta ctg tct aaa tat aat His Lys Tyr Ile His Glu Met Asn Arg Gln Val Leu Ser Lys Tyr Asn 240 245 250 255	864
ggt gcc acc gct ggt gaa atc ttc ggt gtg cca gtg agt gct atg cgc Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Val Ser Ala Met Pro 260 265 270	912
gat tat ttt gac cgg cgg cgt gaa gaa ctc aat att gct ttc acc ttt Asp Tyr Phe Asp Arg Arg Arg Glu Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe 275 280 285	960
gat ttg atc agg ctc gat cgt tat ccc gat cag cgc tgg cgt cgt aaa Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Tyr Pro Asp Gln Arg Trp Arg Arg Lys 290 295 300	1008
cca tgg aca tta agc cag ttt cgt caa gtt atc tct cag act gac cgt Pro Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Ser Gln Thr Asp Arg 305 310 315	1056
gcc gcc ggt gaa ttt ggc tgg aac gcc ttt ttc ctt gat aac cat gat Ala Ala Gly Glu Phe Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp 320 325 330 335	1104
aac cgc cgc cag gtc tca cac ttt ggt gac gac agc cca caa tgg cgc Asn Pro Arg Gln Val Ser His Phe Gly Asp Asp Ser Pro Gln Trp Arg 340 345 350	1152
gaa cgc tgc gca aaa gca ctg gca acg ctg ctg ctg acg cag cgt gcc Glu Arg Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Thr Gln Arg Ala 355 360 365	1200
acg cgc ttt atc ttt cag ggg cgc gag ttg gga atg act aat tac ccc Thr Pro Phe Ile Phe Gln Gly Ala Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro 370 375 380	1248
ttt aaa aat ata gag gaa ttt gat gat att gag gtt aaa gcc ttc tgg Phe Lys Asn Ile Glu Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp 385 390 395	1296
aac gac tat gta gcc agc gga aaa gta aac gct gct gaa ttt tta cag Asn Asp Tyr Val Ala Ser Gly Lys Val Asn Ala Ala Glu Phe Leu Gln 400 405 410 415	1344
gag gtt cgc atg acc agc cgc gat aac agc cga aca cca atg cag tgg Glu Val Arg Met Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Met Gln Trp 420 425 430	1392

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

16

PCT/AU01/01084

```

aac gac tct gtt aat gcc gga ttc acc cag ggc aaa ccc tgg ttt cac 1440
Asn Asp Ser Val Asn Ala Gly Phe Thr Gln Gly Lys Pro Trp Phe His
      435      440      445

ctc aat ccc aac tat aag caa atc aat gcc gcc agg gng gtg aat aaa 1488
Leu Asn Pro Asn Tyr Lys Gln Ile Asn Ala Ala Arg Xaa Val Asn Lys
      450      455      460

ccc gac tgg gta ttc agt tac tac cgt caa ctg atc aac ctg cgt cac 1536
Pro Asp Ser Val Phe Ser Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Asn Leu Arg His
      465      470      475

cag atc ccg gca ctg acc agt ggt gaa tac cgt gat ctc gat ccg cag 1584
Gln Ile Pro Ala Leu Thr Ser Gly Glu Tyr Arg Asp Leu Asp Pro Gln
      480      485      490      495

aat aac cag gtc tat gcc tat acc cgt ata ctg gat aat gaa aaa tat 1632
Asn Asn Gln Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ile Leu Asp Asn Glu Lys Tyr
      500      505      510

ctg gtg gta gtt aat ttt aaa cct gag cag ctg cat tac gct ctg cca 1680
Leu Val Val Val Asn Phe Lys Pro Glu Gln Leu His Tyr Ala Leu Pro
      515      520      525

gat aat ctg act att gcc agc agt ctg ctg gaa aat gtc cac caa cca 1728
Asp Asn Leu Thr Ile Ala Ser Ser Leu Leu Glu Asn Val His Gln Pro
      530      535      540

tca ctg caa gaa aat gcc tcc acg ctg act ctt gct ccg tgg caa gcc 1776
Ser Leu Gln Glu Asn Ala Ser Thr Leu Thr Leu Ala Pro Trp Gln Ala
      545      550      555

ggg atc tat aag ctg aac tga 1797
Gly Ile Tyr Lys Leu Asn
560      565

<210> 8
<211> 598
<212> PRT
<213> Bacterial isolate 68J

<220>
<221> misc_feature
<222> (460)..(460)
<223> The 'Xaa' at location 460 stands for Glu, Gly, Ala, or Val.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1478)..(1478)
<223> n = unknown nucleotide

<400> 8
Met Phe Leu Asn Gly Phe Lys Thr Val Ile Ala Leu Thr Met Ala Ser
      -30      -25      -20

Ser Phe Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Leu Thr Lys Pro Ser Thr Pro Ile
      -15      -10      -5

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

17

PCT/AU01/01084

Ala Ala Thr Asn Ile Gln Lys Ser Ala Asp Phe Pro Ile Trp Trp Lys
 -1 1 5 10 15

Gln Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Ser Asn
 20 25 30

Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Pro Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr
 35 40 45

Leu Lys Met Leu Gly Val Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Glu
 50 55 60

Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr Arg Lys Ile
 65 70 75

Met Lys Glu Tyr Gly Ser Met Ala Asp Phe Asp Arg Leu Val Ala Glu
 80 85 90 95

Met Asn Lys Arg Gly Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn His
 100 105 110

Thr Ser Asp Arg His Arg Trp Phe Val Gln Ser Arg Ser Gly Lys Asp
 115 120 125

Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Gln Gly Gln
 130 135 140

Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Leu
 145 150 155

Asp Lys Gln Thr Asp Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Pro Gln Gln
 160 165 170 175

Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Ala Glu Leu Tyr Asp
 180 185 190

Ile Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe Asp
 195 200 205

Thr Val Ala Thr Phe Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asp Leu Ser Lys
 210 215 220

Ala Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Glu Gly Pro Asn Ile
 225 230 235

His Lys Tyr Ile His Glu Met Asn Arg Gln Val Leu Ser Lys Tyr Asn
 240 245 250 255

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

18

PCT/AU01/01084

Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Val Ser Ala Met Pro
260 265 270

Asp Tyr Phe Asp Arg Arg Arg Glu Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe
275 280 285

Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Tyr Pro Asp Gln Arg Trp Arg Arg Lys
290 295 300

Pro Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Ser Gln Thr Asp Arg
305 310 315

Ala Ala Gly Glu Phe Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp
320 325 330 335

Asn Pro Arg Gln Val Ser His Phe Gly Asp Asp Ser Pro Gln Trp Arg
340 345 350

Glu Arg Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Thr Gln Arg Ala
355 360 365

Thr Pro Phe Ile Phe Gln Gly Ala Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro
370 375 380

Phe Lys Asn Ile Glu Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp
385 390 395

Asn Asp Tyr Val Ala Ser Gly Lys Val Asn Ala Ala Glu Phe Leu Gln
400 405 410 415

Glu Val Arg Met Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Met Gln Trp
420 425 430

Asn Asp Ser Val Asn Ala Gly Phe Thr Gln Gly Lys Pro Trp Phe His
435 440 445

Leu Asn Pro Asn Tyr Lys Gln Ile Asn Ala Ala Arg Xaa Val Asn Lys
450 455 460

Pro Asp Ser Val Phe Ser Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Asn Leu Arg His
465 470 475

Gln Ile Pro Ala Leu Thr Ser Gly Glu Tyr Arg Asp Leu Asp Pro Gln
480 485 490 495

Asn Asn Gln Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ile Leu Asp Asn Glu Lys Tyr
500 505 510

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

19

PCT/AU01/01084

Leu Val Val Val Asn Phe Lys Pro Glu Gln Leu His Tyr Ala Leu Pro
515 520 525

Asp Asn Leu Thr Ile Ala Ser Ser Leu Leu Glu Asn Val His Gln Pro
530 535 540

Ser Leu Gln Glu Asn Ala Ser Thr Leu Thr Leu Ala Pro Trp Gln Ala
545 550 555

Gly Ile Tyr Lys Leu Asn
560 565

<210> 9
<211> 1698
<212> DNA
<213> Bacterial isolate 68J

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1695)
<223>

<220>
<221> misc_feature
<222> (1379)..(1379)
<223> n = unknown nucleotide

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(1698)
<223>

<400> 9
gca acg aat ata caa aag tcc gct gat ttt ccc att tgg tgg aaa cag 48
Ala Thr Asn Ile Gln Lys Ser Ala Asp Phe Pro Ile Trp Trp Lys Gln
1 5 10 15

gca gta ttt tac cag att tat ccc cgc tca ttt aaa gat agc aat ggt 96
Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Ser Asn Gly
20 25 30

gat ggt atc ggc gat att ccc ggt atc att gag aaa ctg gac tat tta 144
Asp Gly Ile Gly Asp Ile Pro Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu
35 40 45

aaa atg ctg gga gtt gat gct atc tgg ata aac ccg cac tat gag tct 192
Lys Met Leu Gly Val Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Glu Ser
50 55 60

cct aac acc gac aat ggt tac gat att agt gat tat cgt aaa atc atg 240
Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr Arg Lys Ile Met
65 70 75 80

aag gag tac ggc agc atg gct gac ttt gac cgt ctg gtt gcc gaa atg 288
Lys Glu Tyr Gly Ser Met Ala Asp Phe Asp Arg Leu Val Ala Glu Met
85 90 95

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

20

PCT/AU01/01084

aat aaa cgt ggt atg cgc ctg atg att gat att gtt atc aat cat acc 336
 Asn Lys Arg Gly Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn His Thr
 100 105 110

agc gat cgt cac cgc tgg ttt gtg cag agc cgt tca ggt aaa gat aat 384
 Ser Asp Arg His Arg Trp Phe Val Gln Ser Arg Ser Gly Lys Asp Asn
 115 120 125

cct tac cgc gac tat tat ttc tgg cgt gat ggt aaa cag gga cag gct 432
 Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Gln Gly Gln Ala
 130 135 140

ccc aat aac tat ccc tct ttc ttt ggc ggt tca gcc tgg caa ctg gat 480
 Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Leu Asp
 145 150 155 160

aaa cag act gac cag tat tat ctg cac tat ttt gca cca cag cag ccg 528
 Lys Gln Thr Asp Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Pro Gln Gln Pro
 165 170 175

gat ctg aac tgg gat aac cca aaa gtt cgg gct gaa ctc tac gat att 576
 Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Ala Glu Leu Tyr Asp Ile
 180 185 190

ctg cgt ttc tgg ctg gat aaa ggc gta tcc gga cta cgt ttt gat acc 624
 Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe Asp Thr
 195 200 205

gtg gct act ttc tcc aaa att cct ggc ttc cgg gac ctg tca aaa cgg 672
 Val Ala Thr Phe Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asp Leu Ser Lys Ala
 210 215 220

cag ctg aag aat ttt gcc gaa gct tat act gag ggg cgg aat att cat 720
 Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Glu Gly Pro Asn Ile His
 225 230 235 240

aaa tat atc cat gaa atg aac cgc cag gta ctg tct aaa tat aat gtt 768
 Lys Tyr Ile His Glu Met Asn Arg Gln Val Leu Ser Lys Tyr Asn Val
 245 250 255

gcc acc gct ggt gaa atc ttc ggt gtg cca gtg agt gct atg cgg gat 816
 Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Val Ser Ala Met Pro Asp
 260 265 270

tat ttt gac cgg cgg cgt gaa gaa ctc aat att gct ttc acc ttt gat 864
 Tyr Phe Asp Arg Arg Arg Glu Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe Asp
 275 280 285

ttg atc agg ctc gat cgt tat ccc gat cag cgc tgg cgt cgt aaa cca 912
 Leu Ile Arg Leu Asp Arg Tyr Pro Asp Gln Arg Trp Arg Arg Lys Pro
 290 295 300

tgg aca tta agc cag ttt cgt caa gtt atc tct cag act gac cgt gcc 960
 Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Ser Gln Thr Asp Arg Ala
 305 310 315 320

gcc ggt gaa ttt ggc tgg aac gcc ttt ttc ctt gat aac cat gat aac 1008
 Ala Gly Glu Phe Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn
 325 330 335

ccg cgc cag gtc tca cac ttt ggt gac gac agc cca caa tgg cgc gaa 1056
 Pro Arg Gln Val Ser His Phe Gly Asp Asp Ser Pro Gln Trp Arg Glu

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603 21 PCT/AU01/01084

340 345 350

cgc tcg gca aaa gca ctg gca acg ctg ctg ctg acg cag cgt gcc acg 1104
 Arg Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Thr Gln Arg Ala Thr
 355 360 365

ccg ttt atc ttt cag ggg gcg gag ttg gga atg act aat tac ccc ttt 1152
 Pro Phe Ile Phe Gln Gly Ala Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe
 370 375 380

aaa aat ata gag gaa ttt gat gat att gag gtt aaa ggc ttc tgg aac 1200
 Lys Asn Ile Glu Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp Asn
 385 390 395 400

gac tat gta gcc agc gga aaa gta aac gct gct gaa ttt tta cag gag 1248
 Asp Tyr Val Ala Ser Gly Lys Val Asn Ala Ala Glu Phe Leu Gln Glu
 405 410 415

gtt cgc atg acc agc cgc gat aac agc cga aca cca atg cag tgg aac 1296
 Val Arg Met Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Met Gln Trp Asn
 420 425 430

gac tct gtt aat gcc gga ttc acc cag ggc aaa ccc tgg ttt cac ctc 1344
 Asp Ser Val Asn Ala Gly Phe Thr Gln Gly Lys Pro Trp Phe His Leu
 435 440 445

aat ccc aac tat aag caa atc aat gcc gcc agg gng gtg aat aaa ccc 1392
 Asn Pro Asn Tyr Lys Gln Ile Asn Ala Ala Arg Xaa Val Asn Lys Pro
 450 455 460

gac tcg gta ttc agt tac tac cgt caa ctg atc aac ctg cgt cac cag 1440
 Asp Ser Val Phe Ser Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Asn Leu Arg His Gln
 465 470 475 480

atc ccg gca ctg acc agt ggt gaa tac cgt gat ctc gat ccg cag aat 1488
 Ile Pro Ala Leu Thr Ser Gly Glu Tyr Arg Asp Leu Asp Pro Gln Asn
 485 490 495

aac cag gtc tat gcc tat acc cgt ata ctg gat aat gaa aaa tat ctg 1536
 Asn Gln Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ile Leu Asp Asn Glu Lys Tyr Leu
 500 505 510

gtg gta gtt aat ttt aaa cct gag cag ctg cat tac gct ctg cca gat 1584
 Val Val Val Asn Phe Lys Pro Glu Gln Leu His Tyr Ala Leu Pro Asp
 515 520 525

aat ctg act att gcc agc agt ctg ctg gaa aat gtc cac caa cca tca 1632
 Asn Leu Thr Ile Ala Ser Ser Leu Leu Glu Asn Val His Gln Pro Ser
 530 535 540

ctg caa gaa aat gcc tcc acg ctg act ctt gct ccg tgg caa gcc ggg 1680
 Leu Gln Glu Asn Ala Ser Thr Leu Thr Leu Ala Pro Trp Gln Ala Gly
 545 550 555 560

atc tat aag ctg aac tga 1698
 Ile Tyr Lys Leu Asn
 565

<210> 10
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Bacterial isolate 68J

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

22

PCT/AU01/01084

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (460)..(460)
<223> The 'Xaa' at location 460 stands for Glu, Gly, Ala, or Val.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1379)..(1379)
<223> n = unknown nucleotide

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

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

23

PCT/AU01/01084

Val Ala Thr Phe Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asp Leu Ser Lys Ala
210 215 220

Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Glu Gly Pro Asn Ile His
225 230 235 240

Lys Tyr Ile His Glu Met Asn Arg Gln Val Leu Ser Lys Tyr Asn Val
245 250 255

Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Val Ser Ala Met Pro Asp
260 265 270

Tyr Phe Asp Arg Arg Arg Glu Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe Asp
275 280 285

Leu Ile Arg Leu Asp Arg Tyr Pro Asp Gln Arg Trp Arg Arg Lys Pro
290 295 300

Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Ser Gln Thr Asp Arg Ala
305 310 315 320

Ala Gly Glu Phe Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn
325 330 335

Pro Arg Gln Val Ser His Phe Gly Asp Asp Ser Pro Gln Trp Arg Glu
340 345 350

Arg Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Thr Gln Arg Ala Thr
355 360 365

Pro Phe Ile Phe Gln Gly Ala Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe
370 375 380

Lys Asn Ile Glu Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp Asn
385 390 395 400

Asp Tyr Val Ala Ser Gly Lys Val Asn Ala Ala Glu Phe Leu Gln Glu
405 410 415

Val Arg Met Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Met Gln Trp Asn
420 425 430

Asp Ser Val Asn Ala Gly Phe Thr Gln Gly Lys Pro Trp Phe His Leu
435 440 445

Asn Pro Asn Tyr Lys Gln Ile Asn Ala Ala Arg Xaa Val Asn Lys Pro

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

25

PCT/AU01/01084

<212> PRT
 <213> Bacterial isolate 68J

<400> 12
 Met Phe Leu Asn Gly Phe Lys Thr Val Ile Ala Leu Thr Met Ala Ser
 1 5 10 15
 Ser Phe Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Leu Thr Lys Pro Ser Thr Pro Ile
 20 25 30
 Ala

<210> 13
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' oligonucleotide primer for
 amplification of 68J isolate

<400> 13
 ggatccaaca atggcaacga atatacaaaa gtcc 34

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' oligonucleotide primer for
 amplification of 68J isolate

<400> 14
 ataggtacct cagttcagct tatagatccc 30

<210> 15
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' oligonucleotide primer for
 amplification of *Erwinia rhapontici* (Accession No WAC2928)

<400> 15
 ggatccaaca atggcaaccg ttcagcaatc aaatg 35

<210> 16
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' oligonucleotide primer for
 amplification of *Erwinia rhapontici* (Accession No WAC2928)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

26

PCT/AU01/01084

<400> 16
 ataggtacct tacttaaacy cgtggatg 28

<210> 17
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' oligonucleotide primer for
 amplification of 14S isolate

<400> 17
 ggatccaaca atggcaaccy ttcacaagga aagtg 35

<210> 18
 <211> 30<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' oligonucleotide primer for
 amplification of 14S isolate

<400> 18
 ataggtacct taccgcagct tatacacacc 30

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Sucrose isomerase consensus
 sequence

<400> 19
 Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg
 1 5

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Sucrose isomerase consensus
 sequence

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = any amino acid

<400> 20
 Glu Val Lys Gly Phe Trp Xaa Asp Tyr Val

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

27

PCT/AU01/01084

1 5 10

<210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Sucrose isomerase consensus sequence

<400> 21

Arg Pro Gln Trp Arg Glu
 1 5

<210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Sucrose isomerase consensus sequence

<400> 22

Ser Pro Gln Trp Arg Glu
 1 5

<210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Sucrose isomerase consensus sequence

<400> 23

Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp
 1 5 10

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Sucrose isomerase consensus sequence

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X = any amino acid

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

28

PCT/AU01/01084

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X = any amino acid

<400> 24
Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Xaa Xaa Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp
1 5 10 15

<210> 25
<211> 594
<212> DNA
<213> Erwinia rhapsontici

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(594)
<223>

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> n = unknown nucleotide

<400> 25
tac gtt gaa aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt can aac gta 48
Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu Thr Asn Val
1 5 10 15

cgc caa acc agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag tgg gat gca 96
Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala
20 25 30

agc aaa aat gcg ggc ttt acc agc gga acc cct tgg tta aaa atc aat 144
Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn
35 40 45

ccc aat tat aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aac aat cca aat 192
Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn
50 55 60

tcc gta ttt aac tat tat aga aag ctc att aac att cgc cac gac atc 240
Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg His Asp Ile
65 70 75 80

cct gcc tta acc tac ggc agt tat att gat tta gct cct gac aac aat 288
Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Ala Pro Asp Asn Asn
85 90 95

tca gtc tat gct tac act cga acg ttt ggc gct gaa aaa tat ctt gtg 336
Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Phe Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val
100 105 110

gtc att aat ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg cct ggg gat 384
Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Trp Leu Pro Gly Asp
115 120 125

tta tcc atc aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac act att gtg 432
Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His Thr Ile Val

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

29

PCT/AU01/01084

```

130          135          140
aat aaa aat gac gta gaa gat cct cgt ggg gct aca agc gtt tgt agc 480
Asn Lys Asn Asp Val Glu Asp Pro Arg Gly Ala Thr Ser Val Cys Ser
145          150          155          160
ccc ttc cag gct caa aaa agg cct ggc gac cgg ggt tac tct gct gcc 528
Pro Phe Gln Ala Gln Lys Arg Pro Gly Asp Pro Gly Tyr Ser Ala Ala
165          170          175
cat tgg att cgg ttc ttg ccc cgg ttt ttc gct tca tac agg ggc gac 576
His Ser Ile Arg Phe Leu Pro Arg Phe Phe Ala Ser Tyr Arg Gly Asp
180          185          190

atc cac gcg ttt aag taa 594
Ile His Ala Phe Lys
195

<210> 26
<211> 197
<212> PRT
<213> Erwinia rhapsontici

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> n = unknown nucleotide

<400> 26
Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu Thr Asn Val
1 5 10 15
Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala
20 25 30
Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn
35 40 45
Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn
50 55 60
Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg His Asp Ile
65 70 75 80
Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Ala Pro Asp Asn Asn
85 90 95
Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Phe Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val
100 105 110
Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp
115 120 125

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

30

PCT/AU01/01084

Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His Thr Ile Val
 130 135 140

Asn Lys Asn Asp Val Glu Asp Pro Arg Gly Ala Thr Ser Val Cys Ser
 145 150 155 160

Pro Phe Gln Ala Gln Lys Arg Pro Gly Asp Pro Gly Tyr Ser Ala Ala
 165 170 175

His Ser Ile Arg Phe Leu Pro Arg Phe Phe Ala Ser Tyr Arg Gly Asp
 180 185 190

Ile His Ala Phe Lys
 195

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Erwinia rhapontici

<400> 27
 gatctgatca gactcgatcg t 21

<210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Erwinia rhapontici

<400> 28
 gagtgaaag gtttttgca agactacgtt 30

<210> 29
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Erwinia rhapontici

<400> 29
 cgaccacaat ggcgcgag 18

<210> 30
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Erwinia rhapontici

<400> 30
 cccaataact atccctcctt cttcgggtggc tcagcctgg 39

<210> 31
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Erwinia rhapontici

<400> 31
 cagttattacc tccattactt tgccaaacag caaccggacc tcaactgg 48

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

31

PCT/AU01/01084

<210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Bacterial isolate 68J

 <400> 32
 gatctgatca gactcgatcg t 21

 <210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Bacterial isolate 68J

 <400> 33
 gaggtgaaag gtttttgca agactacgtt 30

 <210> 34
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Bacterial isolate 68J

 <400> 34
 cgaccacaat ggcgcgag 18

 <210> 35
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Bacterial isolate 68J

 <400> 35
 cccaataact atccctcctt cttcggtggc tcagcctgg 39

 <210> 36
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Bacterial isolate 68J

 <400> 36
 cagtattacc tccattaactt tgccaaacag caaccgacc tcaactgg 48

 <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Synthetic

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = any amino acid

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

32

PCT/AU01/01084

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = defined amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = defined amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X = any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X = any amino acid

<400> 37

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 38
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Synthetic

<400> 38
 tgggtggaarg argctgt

17

<210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Synthetic

<400> 39

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18603

33

PCT/AU01/01084

tcccagttag rtccgctg

19

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【手続補正書】

【提出日】平成14年9月23日(2002.9.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

イソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードする新規なポリヌクレオチドを単離する方法であって、

(a) スクロースをイソマルチュロースに変換できる生物が選択的に有利性を持つ場所から環境試料を採取する工程、

(b) スクロースからイソマルチュロースを生産する生物をスクリーニングする工程、及び

(c) スクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドに特異的なプローブ又はスクロース・イソメラーゼ酵素に特異的な抗原結合分子を用いて、イソマルチュロースを生産する生物からイソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドを単離する工程であり、このプローブが少なくとも低度の厳格性条件下でスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするが同じ条件下でグルコシダーゼをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズしないものであり、この抗原結合分子がスクロース・イソメラーゼ酵素と免疫相互作用をするがグルコシダーゼとは免疫相互作用をしないものである工程、

を含む方法。

【請求項2】

該ポリヌクレオチドが、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24のいずれか一つに記載されたスクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列に相当する又はそれに相補的な核酸配列から本質的に成るプローブを用いて単離されるものである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

該ヌクレオチド配列が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36のいずれか一つに記載された配列、又はそのヌクレオチド配列変異型を含むものである、請求項2記載の方法。

【請求項4】

該ヌクレオチド配列変異型が配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36に記載された配列のいずれか一つに少なくとも70%の配列同一性を有するものである、請求項3記載の方法。

【請求項5】

該ヌクレオチド配列変異型が配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36により同定された配列のいずれか一つと少なくとも低度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項3記載の方法。

【請求項6】

該ポリヌクレオチドが配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23又は配列番号：24から選択されるアミノ酸配列と特異的に免疫相互作用する抗原結合分子を用いて単離されるものである、請求項1記載の方法。

【請求項7】

増殖のための炭素源としてスクロースとイソマルチュロースの両方を利用できるスクロース代謝及びイソマルチュロース代謝の二重代謝性の生物を選択し又はそれ以外の方法で濃縮する工程をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

該選択又は濃縮の工程が、イソマルチュロースを代謝する生物を選択し又は濃縮するのに十分な時間及び条件の下で該環境試料の生物をイソマルチュロース含有培地上で成長させる工程、及びスクロース代謝及びイソマルチュロース代謝の二重代謝性の生物を選択し又は濃縮するのに十分な時間及び条件の下で該イソマルチュロースを代謝する生物をスクロース含有培地上で成長させる工程を含むものである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

該選択又は濃縮工程が、スクロースを代謝する生物を選択し又は濃縮するのに十分な時間及び条件の下で該環境試料の生物をスクロース含有培地上で成長させる工程、及びスクロース代謝及びイソマルチュロース代謝の二重代謝性の生物を選択し又は濃縮するのに十分な時間及び条件の下で該スクロースを代謝する生物をイソマルチュロース含有培地上で成長させる工程を含むものである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

該スクリーニング工程が生物によるイソマルチュロース生産を定量する検定法を利用するものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

該検定法がアニリン/ジフェニルアミン検定である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

該環境試料が土壌又は植物物質を含むものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

該環境試料がかなりのスクロース濃度の周期的又は定常的利用可能性を有する場所から得られるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

該場所が糖含有植物又は植物部分の処理又は貯蔵を必要とする工場又は収穫された糖含有植物の遺物を含む畑から選択されるものである、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

該糖含有植物が砂糖大根又はサトウキビである、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

該糖含有植物がサトウキビである、請求項 14 記載の方法。

【請求項 17】

(a) 配列番号：8 又は配列番号：10 に記載されたアミノ酸配列、又は
(b) 少なくとも 20 アミノ酸長の生物活性のある (a) の断片、又は
(c) それに少なくとも 75% の配列同一性を有する (a) の変異型、又は
(d) (a) ~ (c) のいずれか一つの誘導体、
を含む単離された該ポリペプチド。

【請求項 18】

該生物活性断片が配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 又は配列番号：24 から選択される少なくとも一つのコンセンサス配列を含むものである、請求項 17 記載のポリペプチド。

【請求項 19】

該変異型が配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 又は配列番号：24 のいずれか一つ以上に記載されたコンセンサス配列を含むものである、請求項 17 記載のポリペプチド。

【請求項 20】

該コンセンサス配列変異型が配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 又は配列番号：24 に記載された配列のいずれか一つに少なくとも 80% の配列同一性を有するものである、請求項 19 記載のポリペプチド。

【請求項 2 1】

請求項 1 8 記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 2】

(i) 配列番号： 7 及び配列番号： 9 に記載されたヌクレオチド配列、又は
(i i) 少なくとも 2 4 ヌクレオチド長の生物活性のある (i) の断片、又は
(i i i) それに少なくとも 7 0 % の配列同一性を有する (i) のポリヌクレオチド変異型、
を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 3】

該ポリヌクレオチド変異型が、配列番号： 7 及び配列番号： 9 により同定されたポリヌクレオチドのいずれか一つと少なくとも中程度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項 2 2 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

該ポリヌクレオチド変異型が、配列番号： 1 9、配列番号： 2 0、配列番号： 2 1、配列番号： 2 2、配列番号： 2 3 及び配列番号： 2 4 のいずれか一つ以上に記載されたコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列を含むものである、請求項 2 2 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 5】

該ヌクレオチド配列が、配列番号： 2 7、配列番号： 2 8、配列番号： 2 9、配列番号： 3 0、配列番号： 3 1、配列番号： 3 2、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、配列番号： 3 5 又は配列番号： 3 6、又はそのヌクレオチド配列変異型から選択されるものである、請求項 2 4 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 6】

該ヌクレオチド配列変異型が、配列番号： 2 7、配列番号： 2 8、配列番号： 2 9、配列番号： 3 0、配列番号： 3 1、配列番号： 3 2、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、配列番号： 3 5 又は配列番号： 3 6 から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するものである、請求項 2 5 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 7】

該ヌクレオチド配列変異型が、配列番号： 2 7、配列番号： 2 8、配列番号： 2 9、配列番号： 3 0、配列番号： 3 1、配列番号： 3 2、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、配列番号： 3 5 又は配列番号： 3 6 から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも中程度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項 2 5 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 8】

調節ポリヌクレオチドに機能しうるように連結した請求項 2 1 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 2 9】

(i) 配列番号： 7 及び配列番号： 9 に記載されたヌクレオチド配列、又は
(i i) 少なくとも 2 4 ヌクレオチド長の生物活性を有する (i) の断片、又は
(i i i) それに少なくとも 7 0 % の配列同一性を有する (i) のポリヌクレオチド変異型、
を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 3 0】

請求項 2 8 又は請求項 2 9 の該発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 3 1】

細菌又は他の原核細胞である、請求項 3 0 記載の宿主細胞。

【請求項 3 2】

植物細胞又は他の真核細胞である請求項 3 0 記載の宿主細胞。

【請求項 3 3】

請求項 2 8 又は請求項 2 9 の発現ベクターを含む植物細胞であって、該植物がスクロースを合成及び / 又は蓄積できるスピーシーズである細胞。

【請求項 34】

該植物がサトウキビ又は砂糖大根から選択されるものである、請求項 33 記載の植物細胞。

【請求項 35】

該植物がサトウキビである、請求項 33 記載の植物細胞。

【請求項 36】

(a) 配列番号：8 又は配列番号：10 に記載されたアミノ酸配列、又は
(b) 少なくとも 20 アミノ酸長の生物活性を有する (a) の断片、又は
(c) それに少なくとも 75% の配列同一性を有する (a) の変異型、又は
(d) (a) 又は (b) の誘導体、

を含む組換えポリペプチドを生産する方法であって、該方法が

- 該組換え型のポリペプチドが該ポリヌクレオチドから発現されるように請求項 28 記載の発現ベクターを含む宿主細胞を培養する工程、及び

- 該組換えポリペプチドを単離する工程、

を含むものである方法。

【請求項 37】

(a) 配列番号：8 又は配列番号：10 に記載されたアミノ酸配列、又は
(b) それに少なくとも 75% の配列同一性を有する (a) の変異型、又は (c) (a)
から (b) までの誘導体、

を含むポリペプチドの生物活性断片を生産する方法であって、

- 該ポリペプチドの断片と関連するスクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該断片が該生物活性断片であることを示す工程、

を含むものである方法。

【請求項 38】

(a) 配列番号：8 又は配列番号：10 に記載されたアミノ酸配列、又は
(b) それに少なくとも 75% の配列同一性を有する (a) の変異型、又は
(c) (a) から (b) までの誘導体、

を含むポリペプチドの生物活性断片を生産する方法であって、

- 該ポリペプチドの断片がそれから生じ得るポリヌクレオチドを細胞に導入する工程、及び

- スクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該断片が該生物活性断片であることを示す工程

を含むものである方法。

【請求項 39】

配列番号：8 又は配列番号：10 に記載された配列を含む親ポリペプチドのポリペプチド変異型、又はその少なくとも 20 アミノ酸長の生物活性断片を生産する方法であって、

- その配列が少なくとも一つのアミノ酸の置換、欠失又は付加により親ポリペプチドから識別される改変ポリペプチドを作成する工程、及び

- 該改変ポリペプチドと関連するスクロース・イソメラーゼ活性を検出して、該改変ポリペプチドが該ポリペプチド変異型であることを示す工程、

を含む方法。

【請求項 40】

配列番号：8 又は配列番号：10 に記載された配列を含む親ポリペプチドのポリペプチド変異型、又はその少なくとも 20 アミノ酸長の生物活性断片を生産する方法であって、

- 改変されたポリペプチドがそれから生産され得るポリヌクレオチドを作成する工程であって、該改変されたポリペプチドが少なくとも一つのアミノ酸の置換、欠失又は付加によりその親ポリペプチドから識別される配列を持つものである工程、

- 該ポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程、及び

- スクロース・イソメラーゼ活性を検出して、該改変ポリペプチドが該ポリペプチド変異型であることを示す工程、

を含む方法。

【請求項 4 1】

スクロースからイソマルチュロースを生産する方法であって、スクロース又はスクロース含有基質を、イソマルチュロースを生産するのに十分な時間及び条件の下で、請求項 1 8 記載のポリペプチド、又は請求項 3 0 記載の宿主細胞と接触させる工程を含む方法。

【請求項 4 2】

(a) 配列番号： 8 又は配列番号： 1 0 に記載されたアミノ酸配列、又は
(b) それに少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する (a) の変異型、又は
(c) (a) 又は (b) の誘導体、
を含むポリペプチドと特異的に免疫相互作用を行なう抗原結合分子。

【請求項 4 3】

配列番号： 1 9、配列番号： 2 0、配列番号： 2 1、配列番号： 2 2、配列番号： 2 3 又は配列番号： 2 4 から選択されるアミノ酸配列と特異的に免疫相互作用を行なう、請求項 4 2 記載の抗原結合分子。

【請求項 4 4】

スクロース・イソメラーゼと免疫相互作用をするがグルコシダーゼと免疫相互作用をしない抗原結合分子。

【請求項 4 5】

スクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドの存在について核酸を精査するプローブであって、少なくとも低度の厳格性条件下でスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするが同じ条件下でグルコシダーゼをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズしないヌクレオチド配列を含むプローブ。

【請求項 4 6】

配列番号： 1 9、配列番号： 2 0、配列番号： 2 1、配列番号： 2 2、配列番号： 2 3 及び配列番号： 2 4 のいずれか一つに記載されたスクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列に相当する又はそれに相補的な核酸配列から本質的に成る、請求項 4 5 記載のプローブ。

【請求項 4 7】

該ヌクレオチド配列が配列番号： 2 7、配列番号： 2 8、配列番号： 2 9、配列番号： 3 0、配列番号： 3 1、配列番号： 3 2、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、配列番号： 3 5 及び配列番号： 3 6 のいずれか一つに記載された配列又はそのヌクレオチド配列変異型を含むものである、請求項 4 6 記載のプローブ。

【請求項 4 8】

該ヌクレオチド配列変異型が配列番号： 2 7、配列番号： 2 8、配列番号： 2 9、配列番号： 3 0、配列番号： 3 1、配列番号： 3 2、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、配列番号： 3 5 及び配列番号： 3 6 に記載された配列のいずれか一つに少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するものである、請求項 4 7 記載のプローブ。

【請求項 4 9】

該ヌクレオチド配列変異型が配列番号： 2 7、配列番号： 2 8、配列番号： 2 9、配列番号： 3 0、配列番号： 3 1、配列番号： 3 2、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、配列番号： 3 5 及び配列番号： 3 6 により同定された配列のいずれか一つと少なくとも中程度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項 4 7 記載のプローブ。

【請求項 5 0】

下記の配列

(a) 配列番号： 8 又は配列番号： 1 0、又は少なくとも 2 0 アミノ酸長のそれらの生物活性断片、又はそれに少なくとも 7 5 % の配列同一性を有するこれらの変異型、又は
(b) (a) をコードするポリヌクレオチド、
を検出する工程を含む、特定のポリペプチド又はポリヌクレオチドを検出する方法。

【請求項 5 1】

(b) の配列が配列番号： 7 又は配列番号： 9、又は少なくとも 2 4 ヌクレオチド長のそ

これらの生物活性断片、又はそれに少なくとも70%の配列同一性を有するこれらのポリヌクレオチド変異型から選択されるものである、請求項50記載の方法。

【請求項52】

(a) 配列番号：8又は配列番号：10に記載されたアミノ酸配列、又は

(b) それに少なくとも75%の配列同一性を有する(a)の変異型、又は

(c) (a)又は(b)の誘導體、

を含むポリペプチドと特異的に免疫相互作用をする抗原結合分子を用いて該特異的ポリペプチドが検出されるものである、請求項50記載の方法。

【請求項53】

該特異的ポリペプチドが、スクロース・イソメラーゼと免疫相互作用をするがグルコシダーゼと免疫相互作用をしない抗原結合分子を用いて検出されるものである、請求項50記載の方法。

【請求項54】

該特異的ポリペプチドが、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23又は配列番号：24から選択されるアミノ酸配列と特異的に免疫相互作用をする抗原結合分子を用いて検出されるものである、請求項50記載の方法。

【請求項55】

該特異的ポリヌクレオチドが、少なくとも低度の厳格性条件下でスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするが同じ条件下でグルコシダーゼをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズしないヌクレオチド配列を含むプローブを用いて検出されるものである、請求項50記載の方法。

【請求項56】

該特異的ポリヌクレオチドが、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24のいずれか一つに記載されたスクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列に相当する又はそれに相補的な核酸配列から本質的に成るプローブを用いて検出されるものである、請求項50記載の方法。

【請求項57】

該ヌクレオチド配列が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36のいずれか一つに記載された配列又はそのヌクレオチド配列変異型を含むものである、請求項56記載の方法。

【請求項58】

該ヌクレオチド配列変異型が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36に記載された配列のいずれか一つと少なくとも70%の配列同一性を有するものである、請求項56記載の方法。

【請求項59】

該ヌクレオチド配列変異型が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36により同定された配列のいずれか一つと少なくとも中程度の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項56記載の方法。

【請求項60】

試料中のスクロース・イソメラーゼを検出する方法であって、

- 該試料を請求項42又は請求項44記載の抗原結合分子と接触させる工程、及び
- 該接触試料中で、ポリペプチドと該抗原結合分子からなる複合体の存在を検出する工程、

を含み、該ポリペプチドが

(a) 配列番号：8又は配列番号：10に記載されたアミノ酸配列、又は

(b) 少なくとも20アミノ酸長の生物活性を有する(a)の断片、又は

(c) それに少なくとも75%の配列同一性を有する(a)の変異型、又は
(d) (a)から(c)までのいずれか一つの誘導体、
を含むものである方法。

【請求項61】

試料中のスクロース・イソメラーゼを検出する方法であって、

(a) 配列番号：8又は配列番号：10に記載されたアミノ酸配列、又は
(b) 少なくとも20アミノ酸長の生物活性を有する(a)の断片、又は
(c) それに少なくとも75%の配列同一性を有する(a)の変異型、又は
(d) (a)から(c)までのいずれか一つの誘導体、

を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの該試料中での発現を検出する工程を
含む方法。

【請求項62】

発現が少なくとも低度の厳格性条件下でスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌク
レオチドにハイブリダイズするが同じ条件下でグルコシダーゼをコードするポリヌクレオ
チドにハイブリダイズしないヌクレオチド配列を含むプローブを用いて検出されるもので
ある、請求項61記載の方法。

【請求項63】

発現が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号
：23及び配列番号：24のいずれか一つに記載されたスクロース・イソメラーゼのコン
センサス配列をコードするヌクレオチド配列に相当する又はそれに相補的な核酸配列から
本質的に成るプローブを用いて検出されるものである、請求項61記載の方法。

【請求項64】

該ヌクレオチド配列が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：
30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：
35及び配列番号：36のいずれか一つに記載された配列又はそのヌクレオチド配列変異
型を含むものである、請求項63記載の方法。

【請求項65】

該ヌクレオチド配列変異型が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列
番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列
番号：35及び配列番号：36に記載された配列のいずれか一つに少なくとも70%の配
列同一性を有するものである、請求項64記載の方法。

【請求項66】

該ヌクレオチド配列変異型が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列
番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列
番号：35及び配列番号：36により同定される配列のいずれか一つに少なくとも中程度
の厳格性条件下でハイブリダイズできるものである、請求項64記載の方法。

【請求項67】

配列番号：8又は配列番号：10をコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部に少な
くとも中程度の厳格性条件下でハイブリダイズできる少なくとも24ヌクレオチド長のヌ
クレオチド配列を含むプローブ。

【請求項68】

配列番号：7又は配列番号：9の少なくとも一部に少なくとも中程度の厳格性条件下でハ
イブリダイズできる少なくとも24ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含むプローブ。

【請求項69】

下記の工程

- 請求項42又は請求項44記載の抗原結合分子と試料を接触させてスクロース・イソ
メラーゼと該抗原結合分子とからなる複合体を形成させる工程、及び
 - 該複合体からスクロース・イソメラーゼを分離する工程
- を含む、試料からスクロース・イソメラーゼを単離する方法。

【請求項70】

請求項 28 又は請求項 29 記載の発現ベクターを含む形質転換された植物細胞。

【請求項 71】

該植物がスクロースを合成及び/又は蓄積できるスピーシーズである、請求項 70 記載の植物細胞。

【請求項 72】

該植物がサトウキビ又は砂糖大根から選択されるものである、請求項 70 記載の植物細胞。

【請求項 73】

該植物がサトウキビである、請求項 70 記載の植物細胞。

【請求項 74】

請求項 28 又は請求項 29 に記載された発現ベクターを含む植物細胞を含む分化した植物。

【請求項 75】

- 請求項 28 又は請求項 29 に記載された発現ベクターを含む植物細胞を含む分化した植物を栽培する工程、及び

- 該栽培した植物からイソマルチュロースを収穫する工程、
を含む、イソマルチュロースを生産する方法。

【請求項 76】

請求項 28 又は請求項 29 に記載された発現ベクターを含む植物細胞を含む分化した植物から収穫したイソマルチュロース。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

発明の概要

本発明に至る研究において、エルウィニア・ラポンティキ（登録番号 W A C 2 9 2 8 ）から並びに 30 個の独立した且つスクロース・イソメラーゼに陰性の単離細菌から、マッテスらにより開示された保存アミノ酸配列に基づく縮重オリゴヌクレオチドを用いて、PCR によりスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドを増幅した。PCR の増幅によりほとんどの試験細菌から複数の DNA 産物が得られた。しかしながら、これらの産物はスクロース・イソメラーゼをコードすることが見出されなかった。エルウィニア・ラポンティキから増幅された 6 個の産物を含む 12 個のそれぞれの PCR 産物についての核酸配列分析は、いずれの DNA 産物もスクロース・イソメラーゼ遺伝子に明確な配列 同一性 を示さないことを明らかにした。その代わりに、大半のこれらの産物は既知のグルコシダーゼ遺伝子に高い配列 同一性 を示した。従って、マッテスらの保存配列はスクロース・イソメラーゼに特異的なものではないが、グルコシダーゼを含む他のクラスの酵素に共通していると結論された。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

従って、本発明の一側面において、イソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードする新規なポリヌクレオチドを単離する方法であって、

(a) スクロースをイソマルチュロースに変換できる生物を有利に選択できる場所から環境試料を得る工程、

(b) スクロースからイソマルチュロースを生産する生物についてスクリーニングする工

程、及び

(c) スクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドに特異的なプローブ又はスクロース・イソメラーゼ酵素に特異的な抗原結合分子を用いて、イソマルチュロースを生産する生物からイソマルチュロースを生産するスクロース・イソメラーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドを単離する工程であって、このプローブが少なくとも低度の厳格性条件下でスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするが同じ条件下でグルコシダーゼをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズしないものであり、この抗原結合分子がスクロース・イソメラーゼ酵素と免疫相互作用を行なうがグルコシダーゼとは免疫相互作用を行なわないものである工程、を含む方法を提供する。

このポリヌクレオチドは、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24のいずれか一つに記載されたスクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列に相当する又はそれに相補的な核酸配列又はそれに少なくとも80%の配列同一性を有することが好ましいその変異型から本質的に成るプローブを用いて単離されることが好ましい。

このヌクレオチド配列は配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36のいずれか一つに記載された配列又はそれに少なくとも60%の配列同一性を有することが好ましいそのヌクレオチド配列変異型を含むことが好ましい。このヌクレオチド配列変異型は、少なくとも低度の厳格性条件下で配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36により同定される配列のいずれか一つとハイブリダイズできることが好ましい。

このポリヌクレオチドは、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23又は配列番号：24から選択されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する該配列の変異型と特異的に免疫相互作用を行なう抗原結合分子を用いて単離されることが好ましい。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

本発明の他の側面において、単離されたポリペプチドであって、

(a) 配列番号：8又は配列番号：10に記載されたアミノ酸配列、又は
(b) 少なくとも20アミノ酸長の、生物活性な(a)の断片、又は
(c) それと少なくとも75%の配列同一性を有する(a)の変異型、又は
(d) (a)～(c)のいずれか一つの誘導体、
を含むポリペプチドが提供される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

該変異型は、配列番号：8又は配列番号：10に示されるアミノ酸配列のいずれか一つに対して少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%並びにさらにより好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有することが好ましい。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0015
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0015】

他の側面において、本発明は上で大まかに記載したポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。該ポリヌクレオチドは、

(i) 配列番号：7及び配列番号：9に記載されたヌクレオチド配列、又は
(ii) 少なくとも24ヌクレオチド長の、生物活性な(a)の断片、又は
(iii) それに少なくとも70%の配列同一性を有する(a)のポリヌクレオチド変異型、
を含むことが好ましい。

【手続補正7】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0016
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0016】

一実施態様において、該ポリヌクレオチド変異型は、配列番号：7及び配列番号：9に示されるポリヌクレオチドのいずれか一つに対して少なくとも80%及びさらにより好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する。

【手続補正8】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0017
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0017】

他の実施態様において、該ポリヌクレオチド変異型は、少なくとも低度の厳格性の条件下で、好ましくは少なくとも中程度の厳格性の条件下で、より好ましくは高度の厳格性の条件下で、配列番号：7又は配列番号：9により同定されるポリヌクレオチドのいずれか一つにハイブリダイズできる。

【手続補正9】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0018
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0018】

該ポリヌクレオチド変異型は、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24のいずれか一つ以上に示されるコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列を含むことが好ましい。

【手続補正10】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0020
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0020】

一実施態様において、該ヌクレオチド配列の変異型は、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35及び配列番号：36に示される配列のいずれか一つに対して少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%及びさらにより好ましくは少

なくとも90%の配列同一性を有する。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

本発明は上で大まかに記載した組換えのポリペプチドを生産する方法であって、

- 該組換えポリペプチドが該ポリヌクレオチドから発現されるように、上で大まかに記載した発現ベクターを含む宿主細胞を培養する工程、及び
 - 該組換えポリペプチドを単離する工程
- を含む方法をも特徴とする。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

他の側面において、本発明は上で大まかに記載したポリペプチドの生物活性のある断片を生産する方法であって、

- 配列番号：8又は配列番号：10に記載のポリペプチドの断片と関連したスクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該断片が生物活性のある断片であることを示す工程、
- を含む方法を提供する。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

さらなる側面において、本発明は上で大まかに記載した生物活性のある断片を生産する方法であって、

- 配列番号：8又は配列番号：10に記載のポリペプチドの断片がそれから生産され得るポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程、及び
 - スクロース・イソメラーゼ活性を検出し、該断片が該生物活性のある断片であることを示す工程、
- を含む方法を提供する。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

更なる側面において、本発明は配列番号：8又は配列番号：10に記載された配列又はそれらの生物活性断片を含む、親ポリペプチドのポリペプチド変異型を生産する方法であって、

- 少なくとも一アミノ酸の置換、欠失又は付加によりその配列が該親ポリペプチドから識別される改変されたポリペプチドを生産する工程、及び
 - 該改変されたポリペプチドと関連するスクロース・イソメラーゼ活性を検出し、改変された該ポリペプチドが該ポリペプチド変異型であることを示す工程、
- を含む方法を提供する。

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

さらなる側面において、本発明は、配列番号：8又は配列番号：10に記載された配列、又はそれらの生物活性断片を含む、親ポリペプチドのポリペプチド変異型を生産する方法であって、

- 上述の改変されたポリペプチドがそれから生産され得るポリヌクレオチドを生産する工程、

- 該ポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程、及び

- スクロース・イソメラーゼ活性を検出し、改変された該ポリペプチドが該ポリペプチド変異型であることを示す工程、

を含む方法を意図する。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

本発明の他の側面にしたがって、スクロースからイソマルチュロースを生産する方法であって、イソマルチュロースを生産するのに十分な時間及び条件の下で、スクロース又はスクロースを含有する基質を上に大まかに記載したポリペプチドと又は上に大まかに記載した宿主細胞と接触させる工程を含む方法が提供される。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

他の側面において、本発明は、本発明のポリペプチドと特異的に免疫相互作用する抗原結合分子に関する。

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

さらに別の側面においては、本発明はスクロース・イソメラーゼと免疫相互作用をするがグルコシダーゼとは免疫相互作用をしない抗原結合分子を提供する。

該抗原結合分子は、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24に記載のアミノ酸配列のいずれか一つと免疫相互作用するものであることが好ましい。

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

本発明の他の側面は特異的なポリペプチド又はポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) 配列番号：8又は配列番号：10、又は長さが少なくとも20アミノ酸のそれらの生物活性断片、又はそれらに少なくとも75%の配列同一性を有するものの変異型、又は

(b) (a)をコードするポリヌクレオチドの配列を検出する工程を含む方法を提供する。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

好ましい実施態様においては、(b)の配列は、配列番号：7又は配列番号：9、又は長さが少なくとも24ヌクレオチドのそれらの生物活性断片、又はそれらに少なくとも70%の配列同一性を有するこれらのポリヌクレオチド変異型から選択される。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

さらに別の側面では、本発明はスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドの存在について核酸を調査するプローブであって、少なくとも低度の厳格性条件下でスクロース・イソメラーゼをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするが同じ条件下でグルコシダーゼをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズしないヌクレオチド配列を含むプローブを提供する。

このプローブは、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23及び配列番号：24のいずれか一つに記載されたスクロース・イソメラーゼのコンセンサス配列をコードするヌクレオチド配列に相当する又はそれに相補的な核酸配列から本質的に成ることが好ましい。

本発明の更なる側面は、少なくとも低度の厳格性の条件下で、好ましくは少なくとも中程度の厳格性条件下で、そしてより好ましくは高度の厳格性条件下で、配列番号：8及び配列番号：10をコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部にハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含むプローブを提供する。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

好ましい実施態様において、該プローブは少なくとも低度の厳格性の条件下で配列番号：7及び配列番号：9の少なくとも一部にハイブリダイズできるヌクレオチド配列を含む。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

「生物活性のある断片」又は「生物活性断片」は全長の親ポリペプチドの断片であって、

親ポリペプチドの活性を保持するものを意味する。従って、生物活性のある断片はスクロースをイソマルチュロースに変換するスクロース・イソメラーゼ活性を含む。別の一実施態様では、生物活性のある断片は以下に定義されるような免疫相互作用をする断片である。本明細書で用いられるとき、「生物活性のある断片」という用語は、例えば、上記の活性を含む、少なくとも8、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも20、更により好ましくは少なくとも30の連続アミノ酸の欠失変異型及び小ペプチドを含む。この型のペプチドは標準的な組換え核酸技術の適用を通して得られうる又は従来の液相若しくは固相の合成技術を用いて合成されうる。例えば、ニコルソンにより編集されブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズにより出版された「合成ワクチン」という表題の刊行物に含まれるアゼルトンとシェパードによる「ペプチド合成」という表題の9章に記載される溶液合成又は固相合成が参照されうる。または、ペプチドは、エンドLys-C、エンドArg-C、エンドGlu-C及びスタフィロコッカスのV8-プロテアーゼなどのプロテイナーゼを用いた本発明のポリペプチドの消化により生じ得る。該消化断片は例えば高速液体クロマトグラフィー（HPLC）技術により精製され得る。

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

「誘導体」とは、修飾により、例えば当分野で理解されるように他の化学部分と結合する若しくは錯体形成することにより又は翻訳後修飾技術により、該基本の配列から誘導されたポリペプチドを意味する。「誘導体」という用語は、機能的に等価な分子を生ずる付加又は欠失などの親配列に対して為された改変もその語句の範囲内に含む。従って、誘導体という用語はスクロース・イソメラーゼ活性を有する分子を包含する。

【手続補正25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

「免疫相互作用する断片」は、配列番号：8又は配列番号：10に記載されたポリペプチドの断片であって、該ポリペプチド又はその変異型若しくは誘導体に特異的に結合する要素の生産を含む免疫応答を誘発するものを意味する。本明細書で用いられるとき、「免疫相互作用をする断片」という用語は、抗原決定基又はエピトープを含む、例えば、少なくとも6、好ましくは少なくとも8、より好ましくは少なくとも20の連続アミノ酸の欠失変異型及び小ペプチドを含む。このような幾つかの断片は互いに連結しうる。

【手続補正26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

二つ以上のポリヌクレオチド又はポリペプチドの間の配列関係を記載するために用いられる用語には、「参照配列」、「比較窓」、「配列同一性」、「配列同一性の百分率」及び「実質的な同一性」が含まれる。「参照配列」はその長さが少なくとも12であるが、度々15から18であり、しばしば少なくとも25のヌクレオチド及びアミノ酸残基を含む単量体単位である。二つのポリヌクレオチドはそれぞれ(1)二つのポリヌクレオチド間で同類の配列(即ち、完全なポリヌクレオチド配列の一部のみ)及び(2)二つのポリヌ

クレオチド間で相違する配列を含みうるので、二つ（又はそれ以上）のポリヌクレオチドの間の配列比較は通常「比較窓」の上の二つのポリヌクレオチドの配列を比較し、局部領域の配列類似性を同定し比較することにより実施する。「比較窓」は、二つの配列が最適に整列された後に配列が連続する位置の同数の参照配列と比較される少なくとも6つの連続する位置、一般的に約50から約100、より一般的には約100から約150の概念上の分節を指す。該比較窓は二つの配列の最適な整列について参照配列（付加又は欠失を含まない）と比較して約20%未満の付加又は欠失（即ち空白）を含みうる。比較窓を整列させるための配列の最適整列は、アルゴリズム（米国ウィスコンシン州サイエンス・ドライブ・マディソン575のジェネティックス・コンピュータ・グループ社のウィスコンシン・ジェネティックス・ソフトウェア・パッケージ・リリース7.0におけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA）のコンピュータによる実行により又は調査及び選択される任意の種々の方法により作成される最良の整列（即ち、該比較窓にわたる最高百分率の類似性をもたらす）により行われうる。例えば、アルチュルら、1997、*Nucl. Acids Res.* 25:3389により開示されるプログラムのBLASTファミリーも参照されうる。配列分析の詳細な論議は、オーズベルらの19.3単元、「分子生物学の最新プロトコル」、ジョン・ウィレイ&ソンス社、1994~1998、15章に見出され得る。

【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

本明細書で用いられる「配列同一性」という用語は、配列がヌクレオチドごとに又はアミノ酸ごとに比較窓の上で同一である程度を指す。従って、「配列同一性の百分率」は、比較窓の上で二つの最適に整列した配列を比較し、適合位置の数を得るために同一な核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）又は同一なアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys及びMet）が両配列に存在する位置の数を決定し、この適合位置の数を比較窓の位置の総数（即ち、窓の大きさ）で割り、その結果に100を乗じて配列同一性の百分率を得ることにより計算される。本発明の目的上、「配列同一性」は、該ソフトウェアに添付される参照マニュアルで用いられる標準的なデフォルトを用いたDNASISコンピュータプログラム（ウィンドウズ用2.5版、米国カリフォルニア州南サンフランシスコのヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング社から入手できる）により計算された「適合百分率」を意味すると理解される。

「類似性」とは、以下の表Bに定義される同一な又は同類置換を構成するアミノ酸の百分率数を指す。類似性はGAPなどの配列比較プログラムを用いて決定されうる（デベラウクスら、1984、*Nucleic Acids Research* 12, 387-395）。この方法において、本明細書で引用されるものと類似の長さの又は実質的に異なる長さの配列が該整列内への空所の挿入により比較されうる。このような空所は、例えば、GAPにより用いられる比較アルゴリズムにより決定される。

【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

「厳格性条件（stringent conditions）」は温度及びイオンの条件を指し、その条件下では高頻度の相補的塩基を有するヌクレオチド配列のみがハイブリダイズする。要求される厳格性は、ヌクレオチド配列依存性であり、ハイブリダイゼーショ

96、497～504、505～512、513～520、521～528、529～536、537～544、545～552、553～560、及び559～566の残基が含まれるが、これらに限定されない。この型の好ましい実施態様において、生物活性のある断片は配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23又は配列番号：24から選択される少なくとも一つのスクロース・イソメラーゼ共通配列を含む。

【手続補正30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

一般的に、変異型は、例えば、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10に示されるポリペプチド又はそれらの生物活性のある断片に対して少なくとも60%、より適切には少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の類似性を有するものである。変異型は、例えば、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：8及び配列番号：10に示されるポリペプチド又はそれらの生物活性のある断片と、少なくとも60%、より適切には少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、更により好ましくは少なくとも95%の配列同一性を示すことが好ましい。この点において、比較の窓は該ポリペプチド又は該生物活性のある断片のおよそ全長にわたることが好ましい。

【手続補正31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0177

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0177】3.3 ポリヌクレオチド変異型

一般的に、本発明のポリヌクレオチド変異型は、同一サイズ（「比較窓」）の参照ポリヌクレオチド配列と比較して、又は該整列が当分野で知られるコンピュータ類似性プログラムにより実施された整列配列と比較した場合、少なくとも60%、より適切には少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、並びにより好ましくは少なくとも90%の配列同一性を示す領域を含む。適切な変異型を構成するものは従来技術により決定される。例えば、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7及び配列番号：9のいずれか一つのポリヌクレオチドを、本発明の単離された天然プロモーターの先に調製された変異型又は非変異型の無作為突然変異誘発（例えばトランスポゾン突然変異誘発）、オリゴヌクレオチドにより媒介される（若しくは部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発及びカセット突然変異誘発を用いて突然変異させることができる。

【手続補正32】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0276

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0276】

マッテスら（上掲）により特定された「保存領域」から得たプライマーを用いて、PCR産物をエルウィニア・ラポンティキから及び後にスクロース・イソメラーゼ活性が陰性であることが見出された細菌類からも増幅した。アガロースゲル電気泳動により明らかにされたPCR産物のパターンは、2単離物からはゼロ、3単離物から1本のバンド、そしてエルウィニア・ラポンティキを含む他の細菌全てから複数のバンドを含んでいた。エルウィニア・ラポンティキから増幅された6本のバンドを含む12本のバンド中のDNAをク

ローニングし、配列決定した。マッテスらにより教示されたエルウィニア・ラポンティキから得た遺伝子の領域を含め、配列決定されたバンドはいずれもスクロース・イソメラーゼへの明確な同一性を示さなかった。配列決定されたバンドのほとんどは既知のグルコシダーゼ遺伝子に高い同一性を示した。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/01084
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12N 15/61, C12N 15/31C12N 9/90, C13K 13/00, A01H 1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPAT, CHEMABS, MEDLINE: sucrose isomerase, sucrose glycosyltransferase, isomaltulose, palatinose, ECS.4.99.11		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Park YK <i>et al.</i> , "Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase," <i>Biotechnology Letters</i> , July 1992, 14(7):547-551 whole of document	1-17
X	Tsuyuki K <i>et al.</i> , "Isolation and characterization of isomaltulose- and trehalulose- producing bacteria from Thailand soil", <i>Journal of General and Applied Microbiology</i> , 1992, 38*483-490 whole of document	1-17
X	Miyata Y <i>et al.</i> , "Isolation and Characterisation of <i>Pseudomonas mesoacidophila</i> Producing Trehalulose," <i>Bioscience Biotechnology and Biochemistry</i> , 1992, 56(10):1680-1681 whole of document	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"B"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search: 24 October 2001		Date of mailing of the international search report: 30 OCT 2001
Name and mailing address of the ISA/AU: AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WOODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer: GARETH COOK Telephone No.: (02) 6283

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/01084
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01/60993 A1 (Institute of Molecular Agrobiolgy) 23 August 2001 whole of document	1-17
X	US 5 985 622 A (Mattes <i>et al</i>) 16 November 1999 whole of document	18-46, 49-68
P, X	WO 01/59135 A1 (IPK, Institut Für Pflanzengenetik Und Kulturpflanzenforschung) 16 August 2001 whole of document	18-46, 49-68

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/01084
Box I 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.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos : 47 to 49 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: It is impossible to determine if an antigen-binding molecule known in the prior art is capable of binding with the polypeptide of the current application without physically testing it. There is also no requirement in the claims that the antigen-binding molecule is being used in a manner associated with the current invention or binds specifically with a polypeptide of the invention.
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	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.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/AU01/01084

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	5 985 622	AU	11544/95	EP	740 706	NO	950194
		AU	15349/95	FI	950187	US	5 786 140
		BR	9500271	FI	962891112 329	WO	95/20047
		CA	2 140 613	JP	7250693	DE	4 447 472
WO	01/59135	AU	35460/01	DE	10 045 113		
END OF ANNEX							

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/90	C 1 2 P 19/24	4 B 0 6 4
C 1 2 P 19/24	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 31/00	V 4 C 0 5 7
G 0 1 N 31/00	G 0 1 N 33/53	M 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N 33/573	C 1 2 N 5/00	C

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2B030 AA02 AD08 CA17
 2G042 AA01 BD19 DA08 FB02
 4B024 AA08 AA11 BA80 CA02 CA09 DA01
 4B050 CC03 DD02 LL05
 4B063 QA01 QA18 QQ44 QR55 QS35
 4B064 AF03 CA10 CA19 CC24 DA01 DA10
 4B065 AA88 AB01 BA02 CA20
 4C057 AA16 AA19 BB03
 4H045 AA11 AA30 CA11 DA75 EA50