



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PKT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-56061

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA Y POLINUCLEOTIDO QUE
CODIFICA LA MISMA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____
SUNTORY HOLDINGS LIMITED

DOMICILIO _____
OSAKA, JAPON

74. APODERADO _____
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

304

1

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PETITORIO SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 10-056061-00000-0000 Fecha: 2010-05-11 16:25:37 Dep: 2030 DIR.NUEVASOR Tra: 11 PATENTE/II Eve: 378 FASENACIONALI Act: 411 PRESENTACION Folios: 182	
FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL			
SOLICITUD DE:			
1 ☒ Patente de Invención. ☒ Capítulo I. ☐ Patente de Modelo de Utilidad. ☐ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: SUNTORY HOLDINGS LIMITED Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón. Dirección: 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japón Domicilio: Osaka, Japón		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.644</u> T.P. <u>23.555</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Eiichiro ONO c/o SUNTORY HOLDINGS LIMITED, Research Center, 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japón 2. Akio NOGUCHI c/o SUNTORY HOLDINGS LIMITED, Research Center, 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japón 3. Yuko FUKUI c/o SUNTORY HOLDINGS LIMITED, Research Center, 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japón 4. Masako MIZUTANI c/o SUNTORY HOLDINGS LIMITED, Research Center, 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japón		
5 PCT (86)	Solicitud Internacional No. <u>PCT/JP2008/067613</u> Fecha: <u>29 de septiembre de 2008</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2009/047992 A1</u> Fecha: <u>16 de abril de 2009</u>		
6 Título (54)	<u>UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA Y POLINUCLEÓTIDO QUE CODIFICA LA</u> <u>MISMA</u>		
7 Clasificación Internacional (51)	<u>C12N 015/000</u>		
8 Prioridad	(33) País de Origen JP JP	(32) Fecha 12 de octubre de 2007 17 de marzo de 2008	(31) Número de Solicitud 2007-267050 2008-067185

9

Comprobante de pago No.: 10-4,301
Comprobante de pago No.: 10-34,501

Fecha: 18 de enero de 2010
Fecha: 04 de mayo de 2010

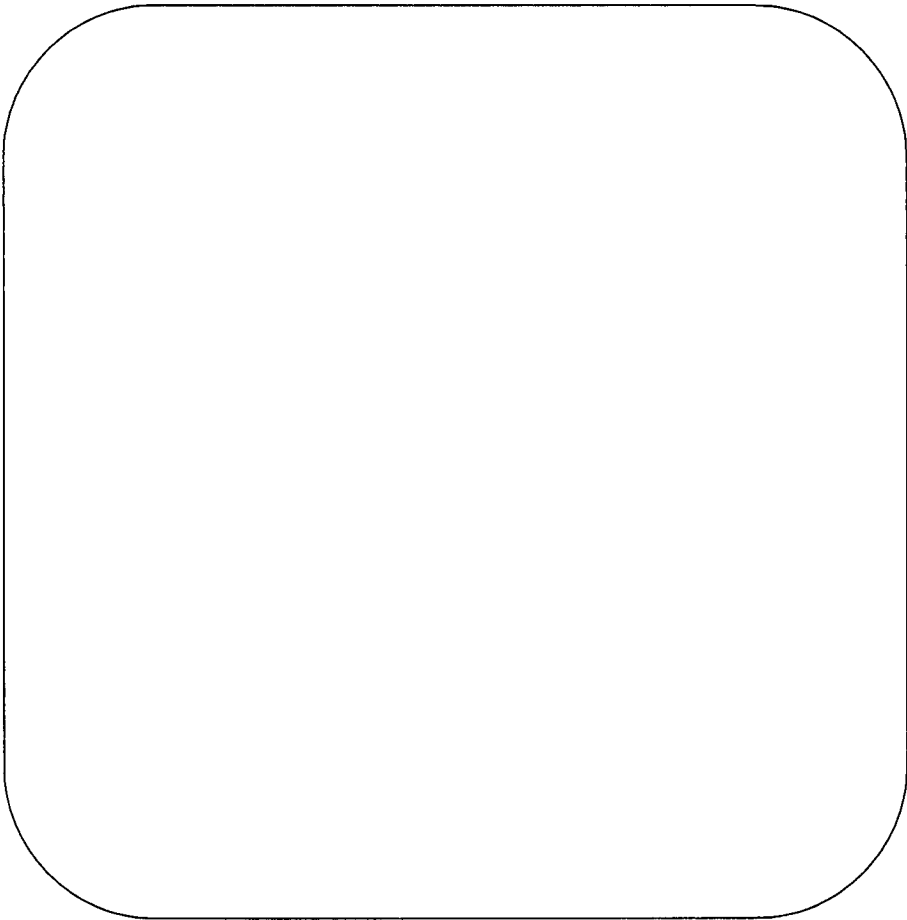
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 7 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$182.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia de Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/047992 A1

Descripción:

Páginas 30 en el idioma original

Páginas 51 en español

Reivindicaciones: Número (s) 17

Figuras: Número (s) 6

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación de la inscripción del cambio de nombre del solicitante
SUNTORY LIMITED por SUNTORY HOLDINGS LIMITED

5. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

FP 2008-029:00 5
(608:099:0)
個%144:4
10-00667
MT

PODER ESPECIAL

SPECIFIC POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (e)/I (we), the undersigned

SUNTORY HOLDINGS LIMITED

domiciliado (s) en/of 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japan

por el presente nombramos a- Luz Clemencia de Páez T.P.A. 23.555, Nidia Osorio T.P.A. No. 73.366, Oscar Correa T.P.A 71.027, Edna Sarmiento T.P.A. No. 65.794 and Jorge Chávarro T.P.A. No. 40.190, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestros apoderados, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, para presentar la solicitud de fase nacional en Colombia de la solicitud PCT/JP2008/067613 denominada UDP UGROHIL TRANSFERASA Y POLINUCLEÓTIDOS QUE LA CODIFICAN y para continuar con el trámite de este asunto hasta su culminación, incluyendo la facultad de presentar y llevar hasta su culminación una acción de nulidad contra la decisión que ponga fin al trámite administrativo de la solicitud de patente.

Los apoderados quedan facultados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

We hereby appoint Luz Clemencia de Páez T.P.A. 23.555, Nidia Osorio T.P.A. No. 73.366, Oscar Correa T.P.A 71.027, Edna Sarmiento T.P.A. No. 65.794 and Jorge Chávarro T.P.A. No. 40.190, domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, as our attorneys, the former as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, to file the national application in Colombia for the PCT patent application No. JP2008/067613 namely UDP-GLUCURONYL TRANSFERASE AND POLYNUCLEOTIDE ENCODING THE SAME and to continue with the prosecution of this matter until its completion, including the power to file and prosecute until a final decision is reached in the nullity action filed against the decision finalizing the administrative proceeding of the patent application.

The attorneys may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this

March 23, 2010

en/in Osaka, Japan

por/by Kazushi Takemoto, Executive General Manager Intellectual Property Department

Firma/Signature

K. Takemoto

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of

Kazushi Takemoto

is authentic, that the signatory currently acts in the position of
Executive General Manager Intellectual
Property Department

of the company

SUNTORY HOLDINGS LIMITED,

a company currently existing and organized under the laws of Japan,

that the address is

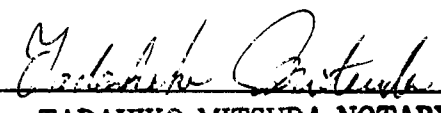
1-40, Dejimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japan,

and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in Tokyo, Japan

On April 14, 2010


TADAHIKO MITSUDA, NOTARY

APOSTILLE

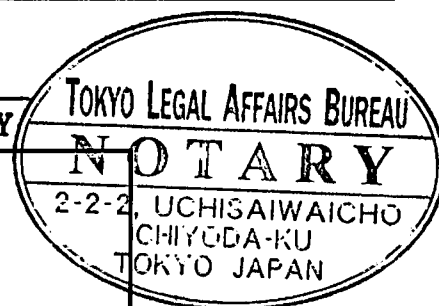
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

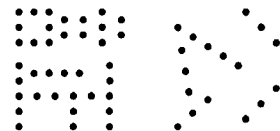
1. Country:
This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

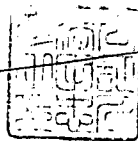
5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature

.....





嘱託人サントリーホールディングス株式会社知的財産部長竹本一志の代理人沼野倫子は、本公証人に対し、嘱託人が別添文書に署名したことを自認している旨陳述した。



よって、これを認証する。

平成22年 4 月 14 日、本公証人役場において
東京都千代田区内幸町2丁目2番2号
東京法務局所属

公証人
Notary

満田忠夫



TADAHIKO MITSUDA

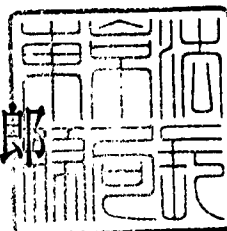
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成22年 4 月 14 日

東京法務局長

山舗 弥一郎



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
This public document
2. has been signed by TADAHIKO MITSUDA
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of TADAHIKO MITSUDA, NOTARY

Certified

5. at Tokyo
6. APR 14 2010
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 10-NQ 001595
9. Seal/stamp:
10. Signature



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE
For the Minister for Foreign Affairs

TRADUCCIÓN OFICIAL 132/2010 DE UN DOCUMENTO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL AUTORIZADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976, POR EL CUAL **SUNTORY HOLDINGS LIMITED**, DOMICILIADA EN 1-40, DOJIMAHAMA 2-CHOME, KITA-KU, OSAKA-SHI, OSAKA 530-8203, JAPÓN OTORGA PODER ESPECIAL A LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, TPA 23.555, NIDIA OSORIO TPA 73.366, OSCAR CORREA TPA 71.027, EDNA SARMIENTO TPA 65.794 Y JORGE CHÁVARRO TPA 40.190 PARA PRESENTAR LA SOLICITUD DE FASE NACIONAL EN COLOMBIA PCT/JP2008/067613, DENOMINADA UDP GLUCORONIL TRANSFERASA Y POLINUCLEÓTIDOS QUE LA CODIFICAN Y PARA CONTINUAR CON EL TRÁMITE DE ESTE ASUNTO HASTA SU CULMINACIÓN, INCLUYENDO LA FACULTAD DE PRESENTAR Y LLEVAR HASTA SU CULMINACIÓN UNA ACCIÓN DE NULIDAD CONTRA LA DECISIÓN QUE PONGA FIN AL TRÁMITE ADMINISTRATIVO DE LA SOLICITUD DE PATENTE.

DADO Y FIRMADO HOY 23 DE MARZO DE 2010 EN OSAKA, JAPÓN POR KAZUSHI TAKEMOTO, GERENTE GENERAL EJECUTIVO DEL DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INTELECTUAL. FIRMA ILEGIBLE.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito notario certifica que la firma que antecede de KAZUSHI TAKEMOTO es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de gerente general ejecutivo del departamento de propiedad intelectual de la compañía SUNTORY HOLDINGS LIMITED, una sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo con las leyes del JAPÓN, que la dirección de dicha compañía es 1-40, DOJIMAHAMA 2-CHOME,

Eduardo Calado Noguera

Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

KITA-KU, OSAKA-SHI, OSAKA 530-8203, Japón y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe. Dado y firmado en Tokio, Japón el 14 de abril de 2010.

FIRMADO: TADAHIKO MITSUDA, NOTARIO

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO, NOTARIO, 2-2-2, UCHISAIWAICHO, CHIYODA-KU, TOKIO, JAPÓN

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: JAPÓN
2. Este documento público ha sido firmado por TADAHIKO MITSUDA
3. quien actúa en su calidad de NOTARIO DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO
4. lleva el sello/estampilla de TADAHIKO MITSUDA, NOTARIO

CERTIFICADO

5. En TOKIO
6. el 14 de abril de 2010
7. Por el Ministerio de Asuntos Exteriores
8. 10 No. 001595
9. Sello/estampilla: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPÓN
10. Firma: KAZUTOYO OYABE, a nombre del Ministro de Relaciones Exteriores

ECN\ECN\ID-170393\WPCL002G

COLO-17511-841-001-8

Bogotá, 4 de mayo de 2010.

Eduardo Calado Noguera

Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

374

10
14
F-2008.0.
6409-2C

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

domiciliado(s) en

declaro(amoc) bajo juramento ser único(z) y verdadero(z) inventor(es)

claro(amoc) así mismo que cedo(amoc) y transfiero(erimos), sin limitación, a favor de la sociedad

constituida y existente de conformidad con las leyes de

domiciliada en

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

1- Eiichiro ONO

2- Akio NOGUCHI

3- Yuko FUKUI

4- Masako MIZUTANI

of

c/o SUNTORY HOLDINGS LIMITED, Research Center, 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503 Japan

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

UDP-GLUCURONYL TRANSFERASE AND POLYNUCLEOTIDE ENCODING THE SAME

state as well, that assign, without reservations or limitations in favor of

SUNTORY HOLDINGS LIMITED

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of Japan

domiciled in

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan

all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this Mar 28, 2010
en/in Osaka, Japan

por/by Eiichiro ONO

Firma/Signature Eiichiro Ono

Dado y firmado hoy/Given and signed this Mar 28, 2010
en/in Osaka, Japan

por/by Akio NOGUCHI

Firma/Signature Akio Noguchi

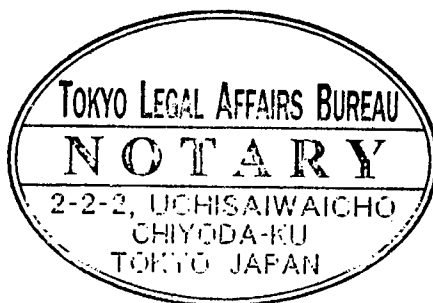
12

Registration No. 626 , 20 10

NOTARIAL CERTIFICATE

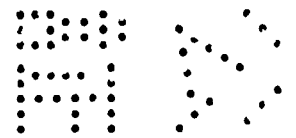
I, the undersigned Notary, do hereby certify that Tomoko NUMANO, an agent of Eiichiro ONO, Akiyo NOGUCHI, Yuko FUKUI and Masako MIZUTANI who have been authorized to sign the attached document has stated in my presence that Eiichiro ONO, Akiyo NOGUCHI, Yuko FUKUI and Masako MIZUTANI acknowledged themselves to have signed the attached document, and that their signatures are true and genuine.

Dated: on this 14th day of April, 2010.



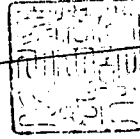
41 11 7
Tadahiko Mitsuda
TADAHIKO MITSUDA
NOTARY

認 証



13

嘱託人小笠原一郎、野口秋雄、福井祐子及び水谷正子の代理人沼野倫子は、本公証人に対し、嘱託人が別添文書に署名したことを自認している旨陳述した。



よって、これを認証する。

平成22年 4 月 14 日、本公証人役場において
東京都千代田区内幸町2丁目2番2号
東京法務局所属

公 証 人
Notary

満田忠久

TADAHIKO MITSUDA

証 明

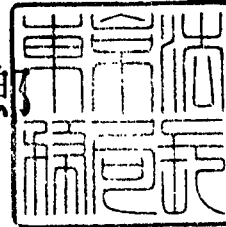


上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成22年 4 月 14 日

東京法務局長

山舗 弥一郎



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
This public document
2. has been signed by TADAHIKO MITSUDA
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of TADAHIKO MITSUDA, NOTARY
- Certified
5. at Tokyo
6. APR 14 2010
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 10-Nº 001597
9. Seal/stamp:
10. Signature



K. Oyabe

Lazutoyo OYABE
For the Minister for Foreign Affairs

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 05.04/10a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de cesión mediante el cual 1. Eiichiro ONO; 2. Akio NOGUCHI; 3. Yuko FUKUI; 4. Masako MIZUTANI, domiciliados en c/o SUNTORY HOLDINGS LIMITED, Research Center, 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japón, declaran bajo juramento ser únicos y verdaderos inventores de la invención: "UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA Y POLINUCLÉOTIDO QUE CODIFICA LA MISMA" y declaran así mismo que ceden y transfieren, sin limitación, a favor de **SUNTORY HOLDINGS LIMITED**, una sociedad constituida y existente de conformidad con las leyes de Japón, domiciliada en 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japón, todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente correspondiente en la República de Colombia.

Dado y firmado en Osaka, Japón el 28 de marzo de 2010 por Eiichiro ONO.

Firma Firma Ilegible

Dado y firmado en Osaka, Japón el 28 de marzo de 2010 por Akio NOGUCHI.

Firma Firma Ilegible

Dado y firmado en Osaka, Japón el 28 de marzo de 2010 por Yuko FUKUI.

Firma Firma Ilegible


DIEGO F. VARGAS Z.
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 ESPAÑOL - INGLÉS INGLÉS - ESPAÑOL
 RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
 MINISTERIO DE JUSTICIA¹

Dado y firmado en Osaka, Japón el 8 de abril de 2010 por Masako MIZUTANI.

Firma Firma Ilegible

Registro No.626 de 2010

CERTIFICADO NOTARIAL

Yo, el suscrito Notario, por el presente certifico que Tomoko NUMANO, agente de Eiichiri ONO, Akio NOGUCHI, Yuko FUKUI y Masako MIZUTANI, quienes están autorizados para firmar el adjunto documento, ha declarado en mi presencia que Eiichiro ONO, Akio NOGUCHI, Yuko FUKUI y Masako MIZUTANI reconocieron ellos mismos haber firmado el adjunto documento y que sus firmas son auténticas y verdaderas.

Fecha: hoy 14 de abril de 2010.

Firma ilegible

TADAHIKO MITSUDA
NOTARIO

Sello: Oficina de Asuntos Legales de Tokio
NOTARIO
2-2-2 UCHISAIWAICHO,
CHIYODA-KU,
TOKIO, JAPÓN

(Anexo)

TEXTO EN JAPONÉS

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: JAPÓN

Este documento público


DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

- 2. ha sido firmado por TADAHIKO MITSUDA
- 3. actuando en calidad de Notario de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio
- 4. lleva el sello/estampilla de TADAHIKO MITSUDA, NOTARIO

Certificado

- 5. en Tokio
- 6. APR 14 2010
- 7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores
- 8. 10 - No. 001597
- 9. Sello/estampilla
- 10. Firma:



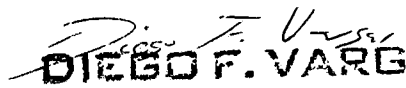
Firma Ilegible

Kazutoyo OYABE

Por el Ministro de Relaciones Exteriores

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-170174\WPCL002H\COLO 17511-841-001-8


DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年4月16日 (16.04.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/047992 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07H 17/07 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 13/09 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

府三島郡島本町若山台 1-1-1 サントリー株式会社 研究センター内 Osaka (JP). 水谷 正子 (MIZUTANI, Masako) [JP/JP]; 〒6158503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1 サントリー株式会社 研究センター内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2008/067613

(74) 代理人: 小俣 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040023 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日:

2008 年 9 月 29 日 (29.09.2008)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CI, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HP, HU, IL, IN, IS, IE, IG, IM, IN, KR, KE, KG, LA, LC, LE, LF, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MI, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VH, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2007-267050
2007 年 10 月 12 日 (12.10.2007) JP
特願 2006-067135 2006 年 3 月 17 日 (17.03.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 40 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): AFIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, ME, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TF), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NI, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小笠 栄一郎 (ONO, Eiichiro) [JP/JP]; 〒6158503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1 サントリー株式会社 研究センター内 Osaka (JP). 野口 秋雄 (NOGUCHI, Akio) [JP/JP]; 〒6158503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1 サントリー株式会社 研究センター内 Osaka (JP). 福井 祐子 (FUKUI, Yuko) [JP/JP]; 〒6158503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1 サントリー株式会社 研究センター内 Osaka (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: UDP-GLUCURONYL TRANSFERASE AND POLYNUCLEOTIDE ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: UDP-β-グルクロン酸転移酵素およびそれをコードするポリヌクレオチド

(57) Abstract: It is intended to provide a novel UDP-glucuronyl transferase and a polynucleotide encoding the same (for example, a polynucleotide containing a polynucleotide comprising one nucleotide sequence selected from the group consisting of a nucleotide sequence between positions 1 to 1359 of SEQ ID NO: 4, a nucleotide sequence between positions 1 to 1365 of SEQ ID NO: 10, a nucleotide sequence between positions 1 to 1371 of SEQ ID NO: 12, and a nucleotide sequence between positions 1 to 1371 of SEQ ID NO: 22; or a polynucleotide containing a polynucleotide encoding a protein having one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 5, 11, 13, and 23), etc. This provides a novel UDP-glucuronyl transferase with broad substrate specificity.

(57) 要約: 本発明は、新たなUDP-β-グルクロン酸転移酵素、およびそれをコードするポリヌクレオチド (例えば、配列番号: 4 で表される塩基配列の第 1 番目~第 1359 番目の塩基配列、配列番号: 10 で表される塩基配列の第 1 番目~第 1365 番目の塩基配列、配列番号: 12 で表される塩基配列の第 1 番目~第 1371 番目の塩基配列、及び配列番号: 22 で表される塩基配列の第 1 番目~第 1371 番目の塩基配列からなる群から選択される 1 つの塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド; または配列番号: 5、11、13 及び 23 からなる群から選択される 1 つのアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド) などを提供する。これにより、基質特異性の広い、新たなUDP-β-グルクロン酸転移酵素が提供される。

WO 2009/047992 A1

DESCRIPTION

UDP-GLUCURONYL TRANSFERASE AND POLYNUCLEOTIDE ENCODING THE SAME

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a UDP-glucuronosyltransferase, a polynucleotide encoding the same, a vector containing the same, a transformant, and so on.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Polyphenolic plant secondary metabolites including flavonoids and lignans with a rich dietary experience have attracted attention as functional materials over the years due to their functional properties represented by their antioxidative activities, and are already commercially available as health foods. For example, quercetin (flavonoid), OTPP (flavonoid), sesamin (lignan), etc. are representative materials for health foods.

The biosynthetic pathway of flavonoids in plant cells has been studied since old times. Biosynthetic enzymes that catalyze the metabolic pathway and genes encoding the enzymes are isolated, leading to a better understanding of their molecular mechanisms.

On the other hand, knowledge is insufficient on how the plant secondary metabolites would be metabolized to exhibit their functions, after their in vivo uptake.

It is known that glycosylation of plant secondary metabolites is generally catalyzed by an enzyme belonging to the superfamily called UDP-glycosyltransferase (UGT), irrespective of types of sugars (glucose, rhamnose, glucuronic acid, galactose, etc.). Further in the studies of sesamin, the secondary metabolites are shown to be present in vivo as glucuronides via catechol metabolites. It is thus considered that the glucuronides would play a part in developing the in vivo functions of plant secondary metabolites.

It is confirmed that four monoglucuronides are present as the metabolites of quercetin in mammals (Q-3-GlcA, Q-7-GlcA, Q-3'-GlcA and Q-4'-GlcA) (Literature 1: Day, AJ et al. Free Radic. Res. 35, 941-952, 2001, Literature 2: Moon, J. H. et al. Free Radical Biology & Medicine 30, 1274-1285, 2001, Literature 3: O'Leary, K. A.

et al. Biochemical Pharmacology 65, 479-491, 2003, and Literature 4: van der Woude, H. et al. Chem. Res. Toxicol. 17, 1520-1530, 2004); in order to understand these functions in vivo, it is necessary to obtain a sufficient amount of compounds to examine their activities. However, any appropriate UDP-glucuronosyltransferase showing a broad substrate specificity is unknown so far, and it was actually impossible to chemically synthesize a binding site-specific reaction product.

The radix of Labiatae Scutellaria baicalensis is called skullcap or "wogon" in Japanese, and it is known that 7-glucuronides of highly antioxidative flavones are accumulated therein. According to the borderline of pharmaceuticals to non-pharmaceuticals, the radix of Scutellaria baicalensis is classified into the pharmaceuticals (Literature 5: Gao, Z. et al. Biochimica et Biophysica Acta 1472, 643-650, 1999). To date, Sb7GAT is purified from Labiatae Scutellaria baicalensis as flavone 7-glucuronosyltransferase; this enzyme acts only on flavones with substituents such as hydroxyl group at the ortho position of the 7-OH flavones (baicalein, scutellarein, etc.) but does not act on apigenin and luteolin which are the major flavones and further not on quercetin which is one of flavonols (Literature 6: Nagashima S. et al., Phytochemistry 53, 533-538, 2000). A gene corresponding to this Sb7GAT is registered in GenBank (Accession No. AB042277) but its function remains unconfirmed.

On the other hand, it is known that flavone 7-glucuronides which are more diverse than skullcap or "wogon" are accumulated in Perilla frutescens a red-leaf variety with a dietary experience (Literature 7: Yamazaki, M. et al. Phytochemistry 62, 987-998, 2003).

Literatures:

1. Day, A. J. et al., Free Radic. Res., 35, 941-952, 2001
2. Moon, J. H. et al., Free Radical Biology & Medicine, 30, 1274-1285, 2001
3. O'Leary, K. A. et al., Biochemical Pharmacology, 65, 479-491, 2003
4. van der Woude, H. et al., Chem. Res. Toxicol., 17, 1520-1530, 2004
5. Gao, Z. et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1472, 643-650, 1999
6. Nagashima S. et al., Phytochemistry, 53, 533-538, 2000.
7. Yamazaki, M. et al., Phytochemistry, 62, 987-998, 2003

DISCLOSURE OF THE INVENTION

PROBLEMS TO BE SOLVED BY THE INVENTION

Under these circumstances, it has been desired to identify a novel UDP-glucuronosyltransferase having a broader substrate specificity and a gene encoding the same.

5 MEANS OF SOLVING THE PROBLEM

The present invention has been made in view of the foregoing circumstances and provides the following UDP-glucuronosyltransferases and polynucleotides encoding the same, as well as vectors bearing the same, transformants, and so on.

(1) A polynucleotide of any one of (a) through (f) below:

10 (a) a polynucleotide comprising a polynucleotide consisting of one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide
15 sequence represented by SEQ ID NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22;

(b) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein having one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23;

20 (c) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein consisting of an amino acid sequence with deletion, substitution, insertion and/or addition of 1 to 15 amino acids in one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and having a UDP-glucuronosyltransferase activity;

25 (d) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein having an amino acid sequence having a homology of at least 80% to one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23 and having a UDP-glucuronosyltransferase activity;

(e) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that
30 hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide
35 sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID

NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22, and has a UDP-glucuronosyltransferase activity; and,

5 (f) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of a polynucleotide encoding a protein consisting of one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and has a UDP-glucuronosyltransferase activity.

10 (2) The polynucleotide according to (1) above, which is any one of (g) through (j) below:

(g) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein consisting of an amino acid sequence with deletion, substitution, insertion and/or addition of not greater than 10 amino acids (i.e. 0-10 amino acids) in one amino acid
15 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and having a UDP-glucuronosyltransferase activity;

(h) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein having an amino acid sequence having a homology of at least 90% to one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and
20 having a UDP-glucuronosyltransferase activity;

(i) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under high stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide
25 sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22, and has a UDP-glucuronosyltransferase
30 activity; and,

(j) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under high stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of a polynucleotide encoding a protein consisting of one amino acid sequence selected from the group
35 consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and has a UDP-glucuronosyltransferase

activity.

(3) The polynucleotide according to (1) above, which comprises a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4.

5 (4) The polynucleotide according to (1) above, which comprises a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10.

(5) The polynucleotide according to (1) above, which comprises a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the
10 nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12.

(6) The polynucleotide according to (1) above, which comprises a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22.

(7) The polynucleotide according to (1) above, which comprises a
15 polynucleotide encoding the protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5.

(8) The polynucleotide according to (1) above, which comprises a polynucleotide encoding the protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 11.

20 (9) The polynucleotide according to (1) above, which comprises a polynucleotide encoding the protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 13.

(10) The polynucleotide according to (1) above, which comprises a polynucleotide encoding the protein consisting of the amino acid sequence
25 represented by SEQ ID NO: 23.

(11) The polynucleotide according to any one of (1) to (10) above, which is a DNA.

(12) A protein encoded by the polynucleotide according to any one of (1) to (11) above.

30 (13) A vector comprising the polynucleotide according to any one of (1) to (11) above.

(14) A transformant, wherein the polynucleotide according to any one of (1) to (11) above is introduced.

(15) A transformant, wherein the vector according to (13) above is
35 introduced.

(16) A method for producing the protein of claim 12, which comprises using the transformant according to (14) or (15) above.

(17) A method for producing a glucuronide, which comprises forming the glucuronide from UDP-glucuronic acid and a flavonoid using the protein according to (12) above as a catalyst.

ADVANTAGEOUS EFFECT OF THE INVENTION

The polynucleotide of the present invention is useful for the production of a novel UDP-glucuronosyltransferase by introducing the polynucleotide into, e.g., a transformant. In a preferred embodiment of the invention, the UDP-glucuronosyltransferase has a broad substrate specificity and an activity of glucuronidation of diverse glycosyl acceptor substrates.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

FIG. 1 shows alignments of the amino acid sequences of AmUGTcg10 derived from *Antirrhinum majus*, SIUGT derived from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yalusimensis*, PfUGT50 derived from *Perilla frutescens* a red-leaf variety and Sb7GAT derived from *Scutellaria baicalensis*.

FIG. 2 shows the results of analysis on the specificity of glycosyl acceptor substrates for PfUGT50.

FIG. 3 shows the results of analysis on the specificity of glycosyl acceptor substrates for SIUGT.

FIG. 4 shows the results of analysis on the specificity of glycosyl acceptor substrates for AmUGTcg10.

FIG. 5 shows the results of analysis on the specificity of glycosyl acceptor substrates for SIUGT23.

FIG. 6 shows the results of LC-MS analysis on the products in the reaction solution of SIUGT and SC1, wherein the arrows denote the products.

FIG. 7 shows the results of MS analysis on the products in the reaction of SC1 and SIUGT1.

FIG. 8 shows the results of LC analysis on the products in the reaction of quercetin and SIUGT1.

Sequence Listing Free Text:

SEQ ID NO: 1 synthetic DNA
SEQ ID NO: 2 synthetic DNA
SEQ ID NO: 6 synthetic DNA
SEQ ID NO: 7 synthetic DNA
5 SEQ ID NO: 8 synthetic DNA
SEQ ID NO: 9 synthetic DNA
SEQ ID NO: 14 synthetic DNA
SEQ ID NO: 15 synthetic DNA
SEQ ID NO: 16 synthetic DNA
10 SEQ ID NO: 17 synthetic DNA
SEQ ID NO: 18 synthetic DNA
SEQ ID NO: 19 synthetic DNA
SEQ ID NO: 20 synthetic DNA
SEQ ID NO: 21 synthetic DNA
15 SEQ ID NO: 24 synthetic DNA
SEQ ID NO: 25 synthetic DNA

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

Hereinafter, the UDP-glucuronosyltransferases of the invention, the
20 polynucleotide encoding the same, the vector bearing the same, the transformant and
so on are described in detail.

1. Polynucleotide of the invention

First, the present invention provides (a) a polynucleotide (specifically a
25 DNA, hereinafter sometimes merely referred to as "DNA") comprising a
polynucleotide consisting of one nucleotide sequence selected from the group
consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide
sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to
1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide
30 sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID
NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide
sequence represented by SEQ ID NO: 22; and (b) a polynucleotide comprising a
polynucleotide encoding a protein having one amino acid sequence selected from the
group consisting of SEQ ID NOS: 5, 11, 13 and 23. The DNA targeted in the
35 present invention is not limited only to the DNA encoding

UDP-glucuronosyltransferase described above but also includes other DNAs encoding a protein functionally equivalent to this protein. The functionally equivalent protein is, for example, (c) a protein consisting of an amino acid sequence with deletion, substitution, insertion and/or addition of 1 to 15 amino acids in one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and having a UDP-glucuronosyltransferase activity. Such a protein includes a protein consisting of one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23 wherein 1 to 15, 1 to 14, 1 to 13, 1 to 12, 1 to 11, 1 to 10, 1 to 9, 1 to 8, 1 to 7, 1 to 6 (1 to several), 1 to 5, 1 to 4, 1 to 3, 1 to 2 or 1 amino acid(s) is/are deleted, substituted, inserted and/or added and having the UDP-glucuronosyltransferase activity. In general, the number of deletions, substitutions, insertions, and/or additions is preferably smaller. Such proteins include a protein having an amino acid sequence having a homology of approximately 80% or higher, 81% or higher, 82% or higher, 83% or higher, 84% or higher, 85% or higher, 86% or higher, 87% or higher, 88% or higher, 89% or higher, 90% or higher, 91% or higher, 92% or higher, 93% or higher, 94% or higher, 95% or higher, 96% or higher, 97% or higher, 98% or higher, 99% or higher, 99.1% or higher, 99.2% or higher, 99.3% or higher, 99.4% or higher, 99.5% or higher, 99.6% or higher, 99.7% or higher, 99.8% or higher, or 99.9% or higher, to one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and having the UDP-glucuronosyltransferase activity. As the homology percentage described above is higher, the protein is preferred in general.

As used herein, the term "UDP-glucuronosyltransferase activity" refers to an activity of catalyzing the reaction that involves the glucuronidation of hydroxyl groups in flavonoids, stilbenes, lignans, etc. (glucuronidation of, e.g., a flavone at the position 7-OH) to form glucuronides.

The UDP-glucuronosyltransferase activity can be assayed by reacting, for example, UDP-glucuronic acid with a glycosyl acceptor substrate (e.g., a flavone) in the presence of an enzyme to be assayed and analyzing the reaction product by HPLC (cf., EXAMPLES described below for more details).

The present invention further includes (e) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide

sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22, and has the

5 UDP-glucuronosyltransferase activity; and (f) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of a polynucleotide encoding a protein consisting of one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and

10 has the UDP-glucuronosyltransferase activity.

As used herein, the "polynucleotide" refers to a DNA or RNA.

As used herein, the term "polynucleotide that hybridizes under stringent conditions" refers to, for example, a polynucleotide obtained by colony hybridization, plaque hybridization, Southern hybridization or the like, using as a

15 probe all or part of a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to

20 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22 or a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of a polynucleotide encoding one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23. The

25 hybridization method may be a method described in, for example, Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997, etc.

As used herein, the "stringent conditions" may be any of low-stringent

30 conditions, medium-stringent conditions or high-stringent conditions. The "low-stringent conditions" are, for example, 5x SSC, 5x Denhardt's solution, 0.5% SDS, 50% formamide and 32°C. The "medium-stringent conditions" are, for example, 5x SSC, 5x Denhardt's solution, 0.5% SDS, 50% formamide and 42°C. The "high-stringent conditions" are, for example, 5x SSC, 5x Denhardt's solution,

35 0.5% SDS, 50% formamide and 50°C. Under these conditions, as the temperature

is higher, a DNA with higher homology is expected to be obtained efficiently at higher temperature, although multiple factors are involved in the hybridization stringency including temperature, probe concentration, probe length, ionic strength, time, salt concentration and the like. Those skilled in the art may realize similar stringency by appropriately selecting these factors.

When a commercially available kit is used for hybridization, for example, Allphos Direct Labeling Reagents (manufactured by Amersham Pharmacia) can be used. In this case, according to the attached protocol, a membrane is incubated with a labeled probe overnight, the membrane is washed with a primary wash buffer containing 0.1% (w/v) SDS at 55°C and the hybridized DNA can then be detected.

Other polynucleotides that can be hybridized include DNAs having a homology of approximately 60% or higher, approximately 70% or higher, 71% or higher, 72% or higher, 73% or higher, 74% or higher, 75% or higher, 76% or higher, 77% or higher, 78% or higher, 79% or higher, 80% or higher, 81% or higher, 82% or higher, 83% or higher, 84% or higher, 85% or higher, 86% or higher, 87% or higher, 88% or higher, 89% or higher, 90% or higher, 91% or higher, 92% or higher, 93% or higher, 94% or higher, 95% or higher, 96% or higher, 97% or higher, 98% or higher, 99% or higher, 99.1% or higher, 99.2% or higher, 99.3% or higher, 99.4% or higher, 99.5% or higher, 99.6% or higher, 99.7% or higher, 99.8% or higher or 99.9% or higher, to a DNA encoding one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12 and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22, or one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, as calculated by homology search software, such as FASTA and BLAST using default parameters.

Homology between amino acid sequences or nucleotide sequences can be determined by using algorithm BLAST by Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873, 1993). Programs called BLASTN and BLASTX based on BLAST algorithm have been developed (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol., 215: 403, 1990). When a nucleotide sequence is sequenced using BLASTN, the parameters are, for example, score = 100 and word length = 12. When an amino acid sequence is sequenced using BLASTX,

the parameters are, for example, score = 50 and word length = 3. When BLAST and Gapped BLAST programs are used, default parameters for each of the programs are employed.

The polynucleotide of the invention described above can be acquired by
5 known genetic engineering means or known synthetic means.

2. Protein of the invention

In a further embodiment, the present invention also provides the protein encoded by any one of the polynucleotides (a) through (f) described above. The
10 protein of the invention which is preferred is a protein consisting of an amino acid sequence with deletion, substitution, insertion and/or addition of 1 to 15 amino acids in one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and having a UDP-glucuronosyltransferase activity. Such a protein includes a protein consisting of an amino acid sequence wherein amino acid residues
15 with the number described above are deleted, substituted, inserted and/or added in one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23 and having the UDP-glucuronosyltransferase activity. The protein also includes a protein having the amino acid sequence having the homology described above to one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID
20 NOs: 5, 11, 13 and 23 and having the UDP-glucuronosyltransferase activity. These proteins may be obtained by using site-directed mutagenesis described in Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997, Nuc. Acids Res., 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nuc. Acids Res., 13, 4431 (1985),
25 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985), etc.

The deletion, substitution, insertion and/or addition of one or more amino acid residues in an amino acid sequence of the protein of the invention means that one or a plurality of amino acid residues are deleted, substituted, inserted and/or
30 added at one or a plurality of positions in the same amino acid sequence. Two or more types of deletion, substitution, insertion and addition may occur concurrently.

Examples of amino acid residues which are mutually substitutable are given below. Amino acid residues in the same group are mutually substitutable.

Group A: leucine, isoleucine, norleucine, valine, norvaline, alanine,
35 2-aminobutanoic acid, methionine, o-methylserine, t-butylglycine, t-butylalanine and

cyclohexylalanine; Group B: aspartic acid, glutamic acid, isoaspartic acid, isoglutamic acid, 2-aminoadipic acid and 2-aminosuberic acid; Group C: asparagine and glutamine; Group D: lysine, arginine, ornithine, 2,4-diaminobutanoic acid and 2,3-diaminopropionic acid; Group E: proline, 3-hydroxyproline and
 5 4-hydroxyproline; Group F: serine, threonine and homoserine; and Group G: phenylalanine and tyrosine.

The protein of the present invention may also be produced by chemical synthesis methods such as the Fmoc method (fluorenylmethyloxycarbonyl method) and the tBoc method (t-butyloxycarbonyl method). In addition, peptide
 10 synthesizers available from Advanced ChemTech, Perkin Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corp., etc. may also be used for the chemical synthesis.

Herein, the protein of the invention is a UDP-glucuronosyltransferase. The term "UDP-glucuronosyltransferase" catalyzes the reaction of transferring the
 15 glucuronyl group from UDP-glucuronic acid as a glycosyl donor onto a glycosyl acceptor substrate to form the glucuronide and UDP. In the present invention, the glycosyl acceptor substrate is, for example, a flavonoid, a stilbene and a lignan.

The flavonoid includes flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, flavone C-glycosides, aurones, catechins, and the like. Among them, examples of the
 20 flavones include baicalein, scutellarein, apigenin, luteolin, tricetin, diosmetin, chrysoeriol, etc. Examples of the flavonols include quercetin, myricetin, kaempferol, etc. An example of the flavanones is naringenin. Examples of the isoflavones are genistein, daidzein and formononetin. Examples of the flavone C-glycosides include vitexin, isovitexin and orientin. An example of the aurones is
 25 aureusidin. Examples of the catechins are catechin and epigallocatechin gallate.

The stilbene includes resveratrol and its glycoside piceid, etc.

The lignan includes (+)-pinoresinol, (+)-piperitol, (+)-sesaminol, (+)-secoisolariciresinol, (+)-sesamin catechol 1) (SC1), (+)-sesamin catechol 2 (SC2), (+)-episesamin catechol 2 (EC2), matairesinol, etc.

30 For example, the UDP-glucuronosyltransferase having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (PfUGT50) shows the activity when the glycosyl acceptor substrate is a flavonoid such as baicalein, apigenin, scutellarein, luteolin, tricetin, diosmetin, chrysoeriol, quercetin, myricetin, kaempferol, naringenin, aureusidin, etc., a stilbene such as resveratrol, etc., a lignan such as SC1, etc., and
 35 shows a potent activity as compared to other glycosyl acceptor substrates, especially

when the glycosyl acceptor substrate is baicalein, apigenin, scutellarein, luteolin, tricetin, diosmetin, chrysoeriol, quercetin and aureusidin.

The UDP-glucuronosyltransferase having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 (SIUGT) shows the activity when the glycosyl acceptor substrate is a flavonoid such as baicalein, apigenin, scutellarein, luteolin, tricetin, diosmetin, chrysoeriol, quercetin, kaempferol, naringenin, genistein, daidzein, formononetin, myricetin, etc., a coumarine such as esculetin, etc., a stilbene such as resveratrol, etc., a lignan such as SC1, SC2, EC2, etc., and shows a potent activity as compared to other glycosyl acceptor substrates, especially when the glycosyl acceptor substrate is baicalein and apigenin.

The UDP-glucuronosyltransferase having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 (AmUGTcg10) shows the activity when the glycosyl acceptor substrate is a flavonoid such as baicalein, apigenin, scutellarein, luteolin, tricetin, diosmetin, chrysoeriol, quercetin, kaempferol, naringenin, aureusidin, etc., a stilbene such as resveratrol, etc., and shows a potent activity as compared to other glycosyl acceptor substrates, especially when the glycosyl acceptor substrate is a flavonoid such as baicalein, apigenin, scutellarein, luteolin, tricetin, diosmetin, chrysoeriol, kaempferol, naringenin, etc.

The UDP-glucuronosyltransferase having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23 (SiUGT23) shows the activity when the glycosyl acceptor substrate is a flavonoid such as baicalein, apigenin, scutellarein, luteolin, tricetin, diosmetin, chrysoeriol, isovitexin, quercetin, kaempferol, naringenin, aureusidin, formononetin, etc., a coumarine such as esculetin, etc., a stilbene such as resveratrol, etc., and shows a potent activity as compared to other glycosyl acceptor substrates, especially when the glycosyl acceptor substrate is a flavonoid such as baicalein, scutellarein, luteolin, tricetin, kaempferol, aureusidin, etc.

3. Vector and transformant bearing the same

In another embodiment, the present invention provides the expression vector comprising the polynucleotide of the present invention. The vector of the invention comprises any one of (a) through (f) described above. Preferably, the expression vector of the invention comprises any one of the polynucleotides (g) through (j). More preferably, the expression vector of the invention comprises a polynucleotide comprising one polynucleotide selected from the group consisting of a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the

nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12 and a
5 polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22, or one polynucleotide selected from the group consisting of a polynucleotide encoding a protein consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5, a polynucleotide encoding a protein consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11, a polynucleotide encoding
10 a protein consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 and a polynucleotide encoding a protein consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23.

The vector of the invention is generally constructed to contain an expression cassette comprising (i) a promoter that can be transcribed in a host cell, (ii) any of the
15 polynucleotides described in (a) to (j) above that is linked to the promoter, and (iii) a signal that functions in the host cell with respect to the transcription termination and polyadenylation of RNA molecule. The vector thus constructed is introduced into a host cell. To construct the expression vector, methods using a plasmid, phage or cosmid are used but are not particularly limited.

20 Specific types of the vector are not particularly limited, and vectors capable of expressing in a host cell can be suitably selected. That is, a suitable promoter sequence may be chosen depending upon the type of the host cell to reliably express the polynucleotide of the invention, and a vector obtained by incorporating this sequence and the polynucleotide of the present invention into various plasmids or the
25 like may be used as an expression vector.

The expression vector of the present invention contains an expression control region (for example, a promoter, a terminator, and/or a replication origin, etc.) depending on the type of a host to be introduced. A conventional promoter (for example, trc promoter, tac promoter, lac promoter, etc.) is used as a promoter for
30 a bacterial expression vector. As a promoter for yeast, there are used, for example, a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase promoter, PH05 promoter, etc. As a promoter for fungi there are used, for example, amylase, trpC, etc. Additionally, a viral promoter (e.g., SV40 early promoter, SV40 late promoter, etc.) is used as a promoter for animal-derived host cell.

35 The expression vector preferably contains at least one selective marker.

The marker available includes an auxotrophic marker (ura5, niaD), a drug-resistant marker (hygromycin, zeocin), a geneticin-resistant marker (G413r), a copper-resistant gene (CUP1) (Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 337, 1984), a cerulenin resistant gene (fas2m, PDR4) (Junji Inokoshi et al., Biochemistry, 5 64, 660, 1992; and Hussain et al., Gene, 101: 149, 1991), and the like.

The present invention provides the transformant in which the polynucleotide described in any of (a) to (j) above is introduced.

A method of preparing (method of producing) the transformant is not particularly limited and includes, for example, a method which comprises
 10 introducing the recombinant vector into a host followed by transformation. The host cell used herein is not particularly limited and various known cells may be preferably used. Specific examples are bacteria such as *Escherichia coli*, etc., yeast (budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*), nematode (*Caenorhabditis elegans*), oocyte of African clawed frog
 15 (*Xenopus laevis*), etc. Culture media and conditions suitable for the host cells above are well known in the art. The organism to be transformed is not particularly limited, and includes various microorganisms, plants and animals given as examples of the host cells above.

For transformation of the host cell, there may be used generally known
 20 methods. For example, methods that can be used include but not limited to the electroporation method (Machtenzie D. A. et al., Appl. Environ. Microbiol., 66, 4655-4661, 2000), the particle delivery method (method described in JPA 2005-287403 "Method of Breeding Lipid-Producing Fungus"), the spheroplast method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978)), the lithium acetate method (J.
 25 Bacteriology, 153: 163 (1983)), and methods described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978), Methods in yeast genetics, 2000 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, etc.

4. Method of producing the protein of the invention

30 In yet another embodiment, the present invention provides a method of producing the protein of the present invention using the transformants described above.

Specifically, the protein of the invention may be obtained by isolating and purifying the protein of the invention from the culture of the transformant described
 35 above. As used herein, the culture refers to any one of a culture broth, cultured

bacteria or cultured cells, and the homogenate of cultured bacteria or cultured cells. Conventional methods may be used to isolate and purify the protein of the invention.

Specifically, when the protein of the invention accumulates within cultured bacteria or within cultured cells, a crude extract of the protein of the invention may be obtained by culturing the bacteria or cells, then disrupting the bacterial or cells using a conventional technique (e.g., ultrasonication, lysozymes, freezing and thawing, etc.) and applying a conventional method such as centrifugation or filtration. When the protein of the invention is accumulated in the culture broth, the culture supernatant containing the protein of the invention can be obtained, after completion of the incubation, by separating the bacteria or cells from the culture supernatant in a conventional manner (e.g., centrifugation, filtration, etc.).

Purification of the protein of the invention contained in the extract or culture supernatant obtained as described above can be performed by a conventional method of separation and purification. The separation and purification methods including ammonium sulfate precipitation, gel filtration chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography, reversed phase high performance liquid chromatography, dialysis, and ultrafiltration, etc. may be used singly or in a suitable combination.

5. Method of producing the glucuronide

The present invention further provides a method of producing the glucuronide using the protein of the present invention. The protein of the invention catalyzes the reaction of transferring the glucuronic acid from UDP-glucuronic acid to a glycosyl acceptor substrate (e.g., a flavonoid, a stilbene or a lignan) and therefore, the glucuronide can be produced from the glycosyl acceptor substrate and UDP-glucuronic acid by using the protein of the invention. The glycosyl acceptor substrate is preferably a flavonoid.

The glucuronide can be produced, for example, by preparing a solution containing 1 mM glycosyl acceptor substrate, 2 mM UDP-glucuronic acid, 50 mM calcium phosphate buffer (pH 7.5) and 20 μ M of the protein of the invention is prepared and reacting them at 30°C for 30 minutes. The glucuronide can be isolated/purified from this solution by known methods. Specifically, e.g., ammonium sulfate precipitation, gel filtration chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography, reversed phase high performance liquid chromatography, dialysis, ultrafiltration, etc. can be used alone or in an appropriate

combination.

The glucuronide thus obtained is useful as a reagent for inspecting the in vivo functions, an antioxidant, etc. (Gao, Z., Huang, K., Yang, X., and Xu, H. (1999) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472, 643-650).

5

The present invention is described in more details with reference to EXAMPLES below but is not deemed to be limited thereto.

EXAMPLE 1

10 1. Outline of EXAMPLE 1

In this EXAMPLE, Sb7GAT homologue gene (SIUGT) was cloned from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* by PCR and using this gene as a probe, it was attempted to isolate 7-glucuronosyltransferase of the flavonoid from the cDNA library of *Perilla frutescens* a red-leaf variety, which accumulates the 7-glucuronide
15 of flavonoid.

As a result of screening, PfUGT50 having an activity to transfer the glucuronic acid to the 7-hydroxy group of a flavone was identified in glycosyltransferase PfUGT derived from *Perilla frutescens* a red-leaf variety. This PfUGT50 had the glucuronosyl transfer activity not only to flavones such as
20 baicalein, scutellarein, apigenin, luteolin, etc. but also to quercetin which is a flavonol. Accordingly, the use of PfUGT50 enables to glucuronidate the 7-position of various flavonoids including flavones in vivo.

Also, SIUGT derived from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*, which was isolated as a screening probe, showed the glucuronosyl transfer activity to
25 various flavonoids. Scrophulariaceae *Antirrhinum majus* was also searched for UGT (UDP- glucuronosyltransferase) highly homologous to PfUGT50 and SIUGT to identify AmUGTeg10 as UGT from *Antirrhinum majus*. The AmUGTeg10 protein expressed in *Escherichia coli*, which is UGT derived from *Antirrhinum majus*, showed the glucuronosyl transfer activity to apigenin, quercetin and naringenin. It
30 was therefore shown that PfUGT50 from *Perilla frutescens* a red-leaf variety, SIUGT from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* and AmUGTeg10 from *Antirrhinum majus* described above had the activity to transfer the 7-glucuronic acid of flavonoids.

2. Isolation of glucosyltransferase gene from the *Perilla frutescens* cDNA library

35 (1) Preparation of probe

The molecular biological method used in this EXAMPLE was in accordance with the method described in Molecular Cloning (Sambrook et al, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001), unless otherwise indicated in detail.

After total RNA was extracted from the radix of *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* using RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Corp.) was used under the conditions recommended by the manufacturer to synthesize cDNA from 1 µg of total RNA. Based on the sequence of Sb7GAT from *Scutellaria baicalensis* (GenBank: accession No. AB042277), primer-Fw (SEQ ID NO: 1) and primer-Rv (SEQ ID NO: 2) were designed. Using the primers, PCR was performed using as a template cDNA from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*.

SEQ ID NO: 1: SIUGT-Fw: 5'-AAACATATGGCGGTGCTGGCGAAGTTC-3' (the underlined is the NdeI site)
 SEQ ID NO: 2: SIUGT-Rv: 5'-TTTGTATCATTAAATCCCGAGTGGCGTGAAG-3' (the underlined is the BclI site)

Specifically, the PCR solution (50 µl) was composed of 1 µl of cDNA (*Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*), 1 x Taq buffer (TaKaRa), 0.2 mM dNTPs, 0.4 pmol each/µl of the primers (SEQ ID NOs: 1 and 2) and 2.5U of rTaq polymerase. PCR was performed by reacting at 94°C for 3 minutes and then amplified for 30 cycles with each cycle consisting of reacting at 94°C for a minute, 53°C for a minute and 72°C for 2 minutes.

The amplified fragment was inserted into the multicloning site of pCR-TOPOII vector (Invitrogen), and the nucleotide sequence of the inserted fragment was determined by the primer walking method using synthetic oligonucleotide primer with DNA Sequencer Model 3100 (Applied Biosystems). As a result of the analysis on the nucleotide sequence obtained by CLUSTAL-W Program (MACVECTOR 7.2.2 software, Accelry Corporation), it was confirmed that the partial sequence of UGT from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* highly homologous to *Scutellaria baicalensis* was obtained (SEQ ID NO: 3). This UGT from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* was used as a template for the screening probe in the form of SIUGT partial sequence.

The fragment obtained by RT-PCR was labeled by using the Non-Radioisotope DIG-Nucleic Acid Detection System (Roche Diagnostics) in

accordance with the conditions recommended by the manufacturer. Specifically, the PCR solution (50 µl) was composed of 1 µl of each cDNA, 1 x Taq buffer (TaKaRa), 0.2 mM dNTPs, 0.4 pmol each/µl of the primers (SEQ ID NOs: 1 and 2) and 2.5U of rTaq polymerase. PCR was performed by reacting at 94°C for 5 minutes and then amplified for 30 cycles with each cycle consisting of reacting at 94°C for a minute, 53°C for a minute and 72°C for 2 minutes. After the SIUGT fragment was confirmed to be labeled by agarose electrophoresis, this DIG-labeled fragment was used for the following experiment as a probe for hybridization.

(2) Hybridization

Using the SIUGT probe described above, the cDNA library derived from *Perilla frutescens* (species: aka-chirimen-jiso or red-leaved perilla) (Yonelura-Sakalibara, K. et al., Plant Cell Physiol. 41, 495-502. 2000) was screened by using the Non-Radioisotope DIG-Nucleic Acid Detection System (Roche Diagnostics) in accordance with the conditions recommended by the manufacturer.

A hybridization buffer (5 x SSC, 30% formamide, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 1% SDS, 2% blocking reagent (Roche), 0.1% lauroylsarcosine and 80 g/ml salmon sperm DNA) was used for prehybridization at 40°C for an hour, and the denatured probe was then added, followed by incubation overnight. The membrane was rinsed in 4 x SSC wash buffer containing 1% SDS at 53°C for 30 minutes. Approximately 1×10^6 pfu plaques were screened to obtain 300 positive clones.

(3) Gene identification

The positive clones were purified to a single plaque by secondary screening. Using a primer pair of M13RV and M13M4 (-20), the inserted fragment was amplified to determine the DNA sequence of the inserted part. Using the putative amino acid sequence deduced based on the determined DNA sequence, database search was performed by Blast x to obtain perilla UGT (PfUGT50) having high homology to SIUGT and Sb7GAT (SEQ ID NOs: 4 and 5).

The results of analysis on the obtained full-length PfUGT50, SIUGT and Sb7GAT on the CLUSTAL-W program (MACVECTOR 7.2.2 software, Accelry Corporation) strongly suggested that both SIUGT and Sb7GAT were incomplete ORF (open reading frame) missing the 3'- and 5'-regions. So, rapid amplification of cDNA end (hereinafter RACE) was conducted using a Gene Racer Kit (Invitrogen), according to the protocol recommended by the manufacturer to amplify the 5'- and 3'-regions of SIUGT. For RACE, the following primer sets specific to each SIUGT

gene were used (SEQ ID NOs: 6 to 9).

SEQ ID NO: 6: GR-SIUGT-Rv:

5'-TGG GAG GCA AAC CAG GGA TCT CGA CAA

5 SEQ ID NO: 7: SIUGT-nest-Rv:

5'-AAT CAT CCA AAT CTT TAA GGT

SEQ ID NO: 8: GR-SIUGT-Fw:

5'-AGA AGG GGT GTG TTC TCC GCT GAG CAA

SEQ ID NO: 9: SIUGT-nest-Fw:

10 5'-GAA CAG CGG TCA CAG ATT TCT

The nucleotide sequences of the respective amplified products were determined by the primer walking method using synthetic oligonucleotide primers to obtain the SIUGT gene including the full-length ORF and the amino acid sequence (SEQ ID NOs: 10 and 11).

In addition to *Perilla frutescens* and *Scutellaria laeteviolacea* v. *yaluzimensis*, 7-glucuronides of apigenin, which is one of flavones, are reported also on Scrophulariaceae, *Antirrhinum majus* (Harborne, J. B. *Phytochemistry*, 2, 327-334, 1963). Since the functionally unknown *Antirrhinum majus* glucosyltransferase AmUGTeg10 represented by SEQ ID NOs: 12 and 13, which were previously isolated, shows a high homology to PfUGT50 and SIUGT isolated in this EXAMPLE, AmUGTeg10 was also a candidate gene for enzyme analysis (Ono, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11075-11080, 2006).

The alignments of AmUGTeg10 from *Antirrhinum majus*, SIUGT from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yaluzimensis* and PfUGT50 from *Perilla frutescens* obtained above are shown in FIG. 1. In FIG. 1, Sb7GAT from *Scutellaria baicalensis* is also included.

3. Extraction and purification of flavonoids from the leaves of *Perilla frutescens*

(1) Purification of scutellarein 7-glucuronide

30 After 144.4 g of green-leaved perilla (Toyohashi Greenhouse Association in Aichi) corresponding to 200 leaves were ground into powders in liquid nitrogen, the powders were immersed in 1.5 L of 50% CH₃CN and 0.1% HCOOH overnight and then filtered through a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The concentrate was loaded on 600 ml of CHP-20P and stepwise eluted
35 twice with 300 ml each of water, 10, 20, 30, 40 and 50% CH₃CN/H₂O. Each

fraction from 10%-2 to 50%-1 in which elution of polyphenols was observed was concentrated, frozen and dried, which was subjected to HPLC analysis. The yield was 10%-2 (12.1 mg), 20%-1 (52.5 mg), 20%-2 (122.4 mg), 30%-1 (227.5 mg), 30%-2 (262.8 mg), 40%-1 (632.4 mg), 40%-2 (192.0 mg) and 50%-1 (113.2 mg).

- 5 In the 40%-1 fraction, rosmarinic acid was contained in a high purity and the other fractions all contained flavones. The 30%-2 fraction was purified by preparatory HPLC below to give 16 mg of scutellarein 7-glucuronide.

Conditions for preparatory HPLC

- Column: Develosil C-30-UG5, 20 mm x 250 mm
 10 Moving phase: A- 0.1% TFA, B- 0.05% TFA/90% CH₃CN
 Flow rate: 6 ml/min.
 Gradient: B20→B60% (100 min), B60% iso (20 min)
 Detected: A280 nm

(2) Hydrolysis of scutellarein 7-glucuronide and purification of aglycone

- 15 From scutellarein 7-glucuronide obtained in (1) above, 3 mg was dissolved in 100 µL of DMSO and the solution was divided into 15 ml falcon tubes in half. To each tube 10 mL of H₂O, 2.5 mL of 0.2M Na acetate buffer (pH5.0) and 0.8 ml of β-glucuronidase/arylsulfatase (EC3.2.1.31/EC3.1.6.1, Roche Diagnostics GmbH) solution were added, followed by incubation at 37°C for 2 hours. After completion
 20 of the reaction, the solution mixture was loaded onto Sep-Pak-C18 (20 cc). After washing with 20 ml of water and then with 20 ml of 10% EtOH to remove salts and proteins, the aglycone formed was eluted with 40 ml of 80% CH₃CN ÷ 0.05%TFA. The eluate was concentrated and freeze dried. This fraction was purified by preparatory HPLC below to give 0.4 mg of scutellarein (aglycone).

25 Conditions for preparatory HPLC

- Column: Develosil C-30-UG5, 20 mm x 250 mm
 Moving phase: A-0.1% TFA, B-0.05% TFA/90% CH₃CN
 Flow rate: 6 ml/min.
 Gradient: B15→B70% (60 min), B70% iso (10 min)
 30 Detected: A330 nm

4. Expression of recombinant *Perilla frutescens* glucosyltransferase and its activity assay

(1) Construction of expression vector

- cDNAs bearing the full-length ORF of 3 glucosyltransferases of PfUGT50
 35 from *Perilla frutescens*, SIUGT from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yalusimensis* and

AmUGTcg10 from *Antirrhinum majus*, having a high homology to each other, were amplified using the primer sets specific to the respective genes (PfUGT50, SEQ ID NOs: 14-15; SIUGT, SEQ ID NOs: 16-17; AmUGTcg10, SEQ ID NOs: 18-19).

cDNAs synthesized using total RNAs extracted from the leaves of *Perilla frutescens*, the radix of *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* and the petals of *Antirrhinum majus* were used as templates, respectively.

SEQ ID NO: 14: PfUGT50-fw:

5'-AAACCATATGGGAAGGCGTCATACTTC-3' (the underlined is the NdeI site)

SEQ ID NO: 15: PfUGT50-rv:

5'-TTTTGATCATTAAATCACGAGTTACGGAATC-3' (the underlined is the BclI site)

SEQ ID NO: 16: SIUGT-fw:

5'-AAACCATATGGAGGACACGATTGTTATC-3' (the underlined is the NdeI site)

SEQ ID NO: 17: SIUGT-rv:

5'-TTCATATGTCAATCCCTCGTGGCCAGAAG-3' (the underlined is the NdeI site)

SEQ ID NO: 18: AmUGTcg10-fw:

5'-AAACCATATGGAGGACACTATCGTTCTC-3' (the underlined is the NdeI site)

SEQ ID NO: 19: AmUGTcg10-rv:

5'-TTGGATCCTTAAGAAACCACCATATCAAC-3' (the underlined is the BamHI site)

PCR (KOD -Plus-, TOYOBO) was carried out, after reacting at 94°C for 2 minutes, by repeating 35 cycles with each cycle consisting of reacting at 94°C for 15 seconds, 50°C for 30 seconds and 68°C for 1.5 minutes. The amplified DNA fragments were subcloned into pCR-Blunt II-TOPO vector (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen) and the nucleotide sequence was confirmed by an ABI 3100 Avant (Applied Biosystems). With respect to PfUGT50, unmethylated plasmid was obtained by transformation of the positive strains obtained. The plasmids obtained were digested with NdeI and BclI in the case of PfUGT50, with NdeI in SIUGT and with NdeI and BamHI in AmUGTcg10, respectively. The resulting DNA fragments

of about 1.5 kb were ligated into pET-15 digested with NdeI and BamHI in the case of PfUGT50 and AmUGTeg10 and with NdeI in the case of SIUGT.

(2) Culture of recombinant *Escherichia coli* and purification of protein

Escherichia coli BL21 (DE3) was transformed with each plasmid obtained in 4-(1) above. The transformant obtained was shake cultured overnight at 37°C in 4 ml of LB medium (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 1 g/l NaCl) supplemented with 50 µg/ml of ampicillin. The culture broth, 4 ml, which reached the stationary phase, was inoculated into 80 ml of the medium with the same composition, followed by shake culture at 37°C. When the cell turbidity (OD_{600}) reached approximately 0.5, 0.4 mM IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside) in a final concentration was added to the medium, followed by shake culture at 22°C for 20 hours. All of the subsequent procedures were performed at 4°C. The transformants cultured were centrifuged (7,000 × g, 15 mins.) to collect the cells, and 2 ml/g cell of Buffer S (20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 20 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 14 mM β-mercaptoethanol) was added to the cells for suspension. Subsequently, ultrasonication was performed (15 secs. × 8) followed by centrifugation (15,000 × g, 10 mins.). To the supernatant obtained, 0.12% (w/v) polyethyleneimine in a final concentration was added to suspend the cells, which was then allowed to stand for 30 minutes. The mixture was centrifuged (15,000 × g, 10 mins.) and the supernatant was recovered as a crude enzyme solution. The crude enzyme solution was applied to His SpinTrap (GE Healthcare), which had been equilibrated with Buffer S, and centrifuged (70 × g, 30 secs.). After washing with 600 µl of Buffer S, the protein bound to the column was stepwise eluted with 600 µl each of Buffer S containing 100, 200 and 500 mM imidazole. The buffer in each fraction eluted was replaced by 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 14 mM β-mercaptoethanol, using Microcon YM-30 (Amicon). As a result of SDS-PAGE analysis, the protein of expected size was confirmed in the fractions eluted with 100 mM and 200 mM imidazole. These fractions were mixed and used for analysis. The objective proteins were not single in these fractions.

(3) Enzyme reaction and conditions for HPLC analysis

Standard reaction conditions are as follows. A reaction solution (2 mM UDP-glucuronic acid, 100 µM glycosyl acceptor substrate, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), enzyme solution), 50 µl, was prepared and the enzyme solution was added to initiate the reaction at 30°C for 30 minutes. The reaction was stopped by adding 50 µl of 0.5% TFA in CH₃CN and provided for HPLC analysis.

The conditions for HPLC are as follows: column, Develosil C30-UG-5 (4.6 × 150 mm); eluant A, 0.1% TFA/H₂O; eluant B, 0.03% TFA/90% CH₃CN; conditions A for elution (except for aurone, catechin, coumarine and phenylpropanoid), 0 min/5% B → 18 min/100% eluant B → 18.1 min/5% B → 25 min/5% B; conditions B for elution (aurone, catechin, coumarine and phenylpropanoid), 0 min/5% B → 20 min/50% eluant B → 20.5 min/5% B → 25 min/5% B; flow rate, 1 ml/min; detection wavelength: 280 and 350 nm. Respective characterizations and results are shown below.

Analysis of glycosyl acceptor substrate specificity

10 In accordance with the method described above, the specificity of various glycosyl acceptor substrates was analyzed (FIGS. 2 to 4).

FIG. 2 shows the results of analysis on the specificity of glycosyl acceptor substrates for PfUGT50. In FIG. 2, the relative activity to each substrate is shown, taking the activity to scutellarein as 100%. As a result of the analysis, PfUGT50 showed the highest activity to scutellarein and reacted well with flavones other than glycosides (baicalein (relative activity to scutellarein, 73%), apigenin (44%), luteolin (41%), tricetin (87.9%), diosmetin (62%) and chrysoeriol (18%)). Furthermore, PfUGT50 showed the activity also to flavonols (quercetin (26%), myricetin (9%) and kaempferol (3%)) and flavanones (naringenin (3%)) and (aureusidin (40%)). However, PfUGT50 showed no activity to flavone C-glycosides (vitexin, isovitexin and orientin), isoflavones (genistein, daidzein and formononetin), catechins (catechin and epigallocatechin gallate), coumarines (esculetin) and phenylpropanoids (coniferyl alcohol). In HPLC, the reaction products of scutellarein, baicalein, apigenin and quercetin coincided in terms of retention time with the respective 7-glucuronosylated products.

FIG. 3 shows the results of analysis on the specificity of glycosyl acceptor substrates for SIUGT. In FIG. 3, the relative activity to each substrate is shown, taking the activity to scutellarein as 100%. As a result of the analysis, SIUGT showed the highest activity to scutellarein but lower activities to flavones (apigenin (3%), luteolin (0.6%), tricetin (1.1%), diosmetin (0.3%), chrysoeriol (0.02%)) other than baicalein (relative activity to scutellarein, 63%). The activities to flavonols (quercetin (1%), kaempferol (14%)), flavanones (naringenin (6%)), isoflavones (genistein (1%), daidzein (0.3%) and formononetin (0.08%)) and coumarines (esculetin (0.3%)) were low. SIUGT showed no activity on flavone C-glycosides (vitezin, isovitexin and orientin), aurones (aureusidin), catechins (catechin and

epigallocatechin gallate) or phenylpropanoids (coniferyl alcohol). In other words, it was suggested that modification at the ortho-position of the 7 position of flavonoids would be important for the activity of SIUGT. In HPLC, the reaction products of scutellarein, baicalein and apigenin coincided in terms of retention time with the
 5 respective 7-glucuronosylated products. On the other hand, pluralities of the products were detected with quercetin and one of them coincided in terms of retention time with the 7-glucuronosylated product.

FIG. 4 shows the results of analysis on the specificity of glycosyl acceptor substrates for AmUGTcg10. In FIG. 4, the relative activity to each substrate is
 10 shown, taking the activity to scutellarein as 100%. As a result of the analysis, AmUGTcg10 showed the highest activity to scutellarein and reacted also with flavones other than glycosides (baicalein (relative activity to scutellarein, 22%), apigenin (40%), luteolin (34%), tricetin (23.8%), diosmetin (26%) and chrysoeriol (18%)). AmUGTcg10 also showed the activities to flavonols (quercetin (4%) and
 15 kaempferol (28%)), flavanones (naringenin (15%)) and aurones (aureusidin (2%)). However, AmUGTcg10 showed no activity to flavone C-glycosides (vitexin, isovitexin and orientin), isoflavones (genistein, daidzein and formononetin), catechins (catechin and epigallocatechin gallate), coumarines (esculetin) and phenylpropanoids (coniferyl alcohol). In HPLC, the reaction products of
 20 scutellarein, baicalein, apigenin and quercetin coincided in terms of retention time with the respective 7-glucuronosylated products.

The foregoing results reveal that PfUGT50 and AmUGTcg10 show a low specificity, whereas SIUGT showed a high specificity, to flavonoids such as flavones, etc. The results further reveal that PfUGT50 derived from *Perilla*
 25 *frutescens* shows a particularly low specificity, i.e., is an enzyme with a broader range of substrate specificity.

Analysis of glycosyl donor substrate specificity

Using apigenin as a glycosyl acceptor substrate, specificity to various UDP-activated glycosyl donors was analyzed. As a result, PfUGT50, SIUGT and
 30 AmUGTcg10 showed the activity only to UDP-glucuronic acid but showed no activity on UDP-glucose and UDP-galactose.

The foregoing results reveal that these enzymes are 7-glucuronosyltransferase highly specific for flavones (flavone 7-glucuronosyltransferase).

Analysis of pH and temperature characteristics

Temperature stability was analyzed as follows. An enzyme solution was treated at 15 to 55°C for an hour and then cooled to 4°C. Using the sample cooled, the residual activity was determined under standard reaction conditions. After 167 mM final concentration of a buffer solution (pH 4, 4.5, 5, Acetate-NaOH; pH 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, NaH₂PO₄-NaOH; pH 8, 8.5, 9, Tris-HCl) was added to the enzyme solution, the mixture was treated at 4°C for an hour and then 500 mM final concentration of potassium phosphate buffer (pH 7.5) was added thereto. Using the sample treated, the residual activity was determined under standard reaction conditions. The reaction was performed under standard reaction conditions where the reaction temperature was set at 10 to 55°C to analyze the reaction temperature dependency. Reaction pH dependency was analyzed under standard reaction conditions using a buffer solution (pH 4, 4.5, 5, Acetate-NaOH; pH 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, NaH₂PO₄-NaOH; pH 8, 8.5, 9, Tris-HCl) in place of potassium phosphate buffer (pH 7.5). As a result of the foregoing analyses, PfUGT50 was stable at pH ranging from 7 to 9 and showed the maximum catalytic activity at pH between 7 and 8 but showed little activity in an acidic region. PfUGT50 was stable at 30°C or lower (an hour, pH 7.5) and the reaction optimum temperature was 30°C in the activity assay for 30 minutes. SIUGT was stable at pH ranging from 4.5 to 8 and showed the maximum catalytic activity at pH between 7 and 8 but showed little activity in an acidic region. This enzyme was stable at 40°C or lower (an hour, pH 7.5) and the reaction optimum temperature was 35°C in the activity assay for 30 minutes. AmUGTcg10 was stable at pH ranging from 7.5 to 9.5 and showed the maximum catalytic activity at pH between 8.5 and 9.5 but showed little activity in an acidic region. This enzyme was stable at 30°C or lower (an hour, pH 7.5) and the reaction optimum temperature was 45°C in the activity assay for 30 minutes. These properties were similar to known GT involved in plant secondary metabolism.

5. Results

PfUGT50 derived from *Perilla frutescens*, SIUGT derived from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* and AmUGTcg10 derived from *Scrophulariaceae*, *Antirrhinum majus*, which are structurally similar as described above, were identified. Glucosyltransferases from PfUGT50 and AmUGTcg10 had a broad glycosyl acceptor substrate specificity as compared to Sb7GAT from *Scutellaria baicalensis* and had the 7-glucuronosyl transfer activity of various flavonoids such as flavones, flavonols, aurones, etc. On the other hand, SIUGT showed a substrate specificity similar to Sb7GAT. By using these glucosyltransferases, the 7-position

of flavonoids can be glucuronidated at a low cost.

Therefore, glucuronides including quercetin 7-glucuronide, which are present in vivo, can be mass-produced in vitro, which enables to assess their physiological activities.

5

EXAMPLE 2

1. Outline of EXAMPLE 2

In this EXAMPLE, SiUGT23 highly homologous to SIUGT from Scutellaria laeteviolacea v. yakusimensis and AmUGTeg12 from Antirrhinum majus was identified from Lamiales Pedaliaceae Sesamum indicum and it was confirmed that its Escherichia coli expression protein had the glucuronosyl transfer activity to scutellarein and luteolin.

10

2. Identification of SiUGT23 gene

Paying attention to the sequence conservation of 7-glucuronosyltransferase genes (UGT genes) of flavonoids from Scutellaria laeteviolacea v. yakusimensis and Antirrhinum majus, genes having a high homology to these genes were searched, and sesame UGT gene SiUGT23 showing a high homology to these UGT genes was found also in Lamiales Pedaliaceae Sesamum indicum. Since SiUGT23 isolated from the sesame cDNA library had no full-length sequence, the full-length sequence of SiUGT23 (SEQ ID NOs: 22 and 23) was determined by the RACE method described in EXAMPLE 1, 2 (3), using the primers of SEQ ID NOs: 20 and 21 described below.

20

SEQ ID NO: 20: GR-SiUGT23-Rv

25

5'-GGCCAAACGCGCCGGAGCTGATGTAGA-3'

SEQ ID NO: 21: SiUGT23-nest-Rv

5'-AGTGGGTATATTCAAGCCTGT-3'

3. Expression of SiUGT23 derived from Sesamum indicum and its activity assay

30

cDNA containing full-length ORF of SiUGT23 derived from Sesamum indicum was amplified by a gene-specific primer set (SEQ ID NOs: 24 and 25). cDNA synthesized using total RNA extracted from sesame seeds was used as a template. SiUGT23 was incorporated into Escherichia coli expression vector as in UGT of Perilla frutescens, Scutellaria laeteviolacea v. yakusimensis and Antirrhinum majus in EXAMPLE 1 and recombinant SiUGT23 protein was expressed in the same

35

way to assay the enzyme activity.

SEQ ID NO: 24: SiUGT23-fw:

5 5'-CACCATATGGAAGACACCGTTGTCCTCTA-3' (the underlined is the NdeI site)

SEQ ID NO: 25: SiUGT23-rv:

5'-GGATCCTAACATCACTCAAACCCGAGTCA-3' (the underlined is the BamHI site)

10 FIG. 5 shows the results of analysis on the specificity of glycosyl acceptor substrates for SiUGT23. In FIG. 5, the relative activity to each substrate is shown, taking the activity to scutellarein as 100%. As a result of the analysis, SiUGT23 showed the highest activity to scutellarein and reacted also with the following flavones (baicalein (relative activity to scutellarein (hereinafter the same), 24%),
15 apigenin (7%), luteolin (29%), tricetin (14.0%), diosmetin (4%), chrysoeriol (6%) and isovitexin (0.3%)). In addition, SiUGT23 showed the activities to flavonols (quercetin (4%) and kaempferol (18%)), flavanones (naringenin (2%)), aurones (aureusidin (13%)), coumarines (esculetin (0.03%)) and the following isoflavones (formononetin (0.03%)). However, SiUGT23 showed no activity to flavone
20 C-glycosides (vitexin and orientin) other than isovitexin, isoflavones (genistein, Daidzein) other than formononetin, catechins (catechin and epigallocatechin gallate) and phenylpropanoids (caffeic acid). In HPLC, the reaction products of scutellarein, baicalein, apigenin and quercetin coincided in terms of retention time with the respective 7-glucuronosylated products.

25 The foregoing results revealed that SiUGT23 from *Sesamum indicum* was found to be a 7-glucuronosyltransferase of flavonoids showing a low specificity for flavonoids such as flavones, etc., as in PfUGT50 from *Perilla frutescens* and AmUGTcg10 from *Antirrhinum majus*.

30 EXAMPLE 3

Using recombinant proteins of PfUGT50 derived from *Perilla frutescens*, SIUGT derived from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* and AmUGTcg10 derived from *Antirrhinum majus* as well as recombinant protein of SiUGT23 derived from *Sesamum indicum*, the glucuronosyl transfer activities to stilbenes and lignans,
35 which are plant polyphenols, were examined. The enzyme reaction was performed

under the same conditions as described above, using resveratrol as a substrate for stilbenes and as substrates for lignans, (+)-pinoresinol, (+)-piperitol, (+)-sesaminol, (+)-secoisolariciresinol, (+)-sesamin catechol 1 (SC1), (+)-sesamin catechol 2 (SC2) and (+)-episesamin catechol 2 (EC2) (Nakai M, et al. (2003) J. Agric Food Chem. 51, 1666-1670).

As a result of the HPLC analysis, the products were obtained in all of the reaction solutions of PfUGT50 from *Perilla frutescens* a red-leaf variety, SIUGT from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*, AmUGTcg10 from *Antirrhinum majus* and SiUGT23 from *Sesamum indicum* (cf., FIGS. 2 to 5). As for lignans, new products were obtained when SC1 and SC2 were used as substrates. As a result of the LC-MS analysis on the reaction of SIUGT with SC1 in which the largest numbers of the products were obtained, SC1 was eluted at R.T. = 12.8 minutes and the reaction product was confirmed to be the SC1 monoglucuronide showing R.T. = 10.8 minutes (FIG. 6) and $m/z = 517.1323$ [M-H]⁻ (C₂₅H₂₅O₁₂, calcd. 517.1346, err. -2.5 ppm) (FIG. 7). LC-MS was performed under the following conditions.

Column: Develosil C30-UG3, 3mm x 150 mm

Moving phase: A; H₂O, B; CH₃CN, C; 2.5% HCOOH, 0.2 ml/min.

Gradient: B20% → B70% (10 mins.), B70% (5 mins.), C4%

Detected: A280 nm

MS conditions: Q-TOF-Premier (Micromass, Manchester, UK)

V mode, negative, capillary voltage: 2.3KV, cone voltage: 45V

Based on the results above, it was confirmed that the glucuronides of stilbenes and lignans could be produced by using PfUGT50 from *Perilla frutescens* a red-leaf variety, SIUGT from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*, AmUGTcg10 from *Antirrhinum majus* and SiUGT23 from *Sesamum indicum*, in addition to diverse flavonoids.

EXAMPLE 4

SIUGT derived from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*, when reacted with quercetin (QU), gave a plurality of products in addition to the 7-glucuronic acid (FIG. 8).

They are characteristic products that are not found with SiUGT23 derived from *Sesamum indicum*, AmUGTcg10 derived from *Antirrhinum majus* and PfUGT50 derived from *Perilla frutescens*. As a result of the LC-MS analysis,

quercetin diglucuronide showing $m/z = 653.1009$ $[M-H]^-$ ($C_{27}H_{23}O_{19}$, calcd. 653.0990, err. 2.9ppm), in which two glucuronic acids would be transferred to quercetin during the retention time of 7 to 9 minutes, was detected. During the retention time of 9 to 11 minutes, 3 types of quercetin monoglucuronides showing $m/z = 477.06$ $[M-H]^-$, in which one glucuronic acid would be transferred to quercetin, were detected. The component showing R.T. = 10.12 minutes coincided with the reaction product with GAT of *Perilla frutescens*, which was purified and structurally analyzed, and was found to be quercetin 7-O-glucuronide. Furthermore, the component showing R.T. = 10.34 minutes coincided with the major flavonol from grape leaves, which was purified and structurally analyzed, and was found to be quercetin 3-O-glucuronide (Hmamouch, M. et al. (1996) *Am. J. Enol Vitic.*, 47, 186-192). The component showing R.T. = 11.3 minutes, which is the main reaction product, was found to be quercetin 3'-O-glucuronide, after purification on reversed phase HPLC and structural analysis by NMR. It was confirmed that the 3 major peaks represented 7-, 3- and 3'-monoglucuronides of quercetin, respectively.

The conditions for LC-MS are as follows.

Column: YMC-pack polymer C18, 2 mm x 150 mm, 6 μ m
Moving phase: A; H_2O , B; CH_3CN , C; 2.5% $HCOOH$, 0.2 ml/min.
Gradient: B10% $\rightarrow$ B50% (10 minutes), B50% (5 minutes), C4%
Detected: A350nm
MS conditions: Q-TOF-Premier (Micromass, Manchester, UK)
V mode, negative, capillary voltage: 3.0 KV, cone voltage: 30V

The foregoing results reveal that a variety of quercetin glucuronides can be obtained from quercetin by using SIUGT from *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

The UDP-glucuronosyltransferase of the present invention has a broad substrate specificity and is useful for the production of various glucuronides. The glucuronides produced are useful as reagents for inspecting the *in vivo* functions, antioxidants, etc.

CLAIMS

1. A polynucleotide of any one of (a) through (f) below:

(a) a polynucleotide comprising a polynucleotide consisting of one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22;

(b) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein having one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23;

(c) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein consisting of an amino acid sequence with deletion, substitution, insertion and/or addition of 1 to 15 amino acids in one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and having a UDP-glucuronosyltransferase activity;

(d) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein having an amino acid sequence having a homology of at least 80% to one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23 and having a UDP-glucuronosyltransferase activity;

(e) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22, and has a UDP-glucuronosyltransferase activity; and,

(f) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of a polynucleotide

encoding a protein consisting of one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and has a UDP-glucuronosyltransferase activity.

2. The polynucleotide according to claim 1, which is any one of (g) through (j) below:

(g) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein consisting of an amino acid sequence with deletion, substitution, insertion and/or addition of not greater than 10 amino acids in one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and having a UDP-glucuronosyltransferase activity;

(h) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein having an amino acid sequence having a homology of at least 90% to one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and having a UDP-glucuronosyltransferase activity;

(i) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under high stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22, and has a UDP-glucuronosyltransferase activity; and,

(j) a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein that hybridizes under high stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of a polynucleotide encoding a protein consisting of one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 11, 13 and 23, and has a UDP-glucuronosyltransferase activity.

3. The polynucleotide according to claim 1, which comprises a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4.

4. The polynucleotide according to claim 1, which comprises a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the

nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10.

5. The polynucleotide according to claim 1, which comprises a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12.

6. The polynucleotide according to claim 1, which comprises a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22.

7. The polynucleotide according to claim 1, which comprises a polynucleotide encoding the protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5.

8. The polynucleotide according to claim 1, which comprises a polynucleotide encoding the protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 11.

9. The polynucleotide according to claim 1, which comprises a polynucleotide encoding the protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 13.

10. The polynucleotide according to claim 1, which comprises a polynucleotide encoding the protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 23.

11. The polynucleotide according to any one of claims 1 to 10, which is a DNA.

12. A protein encoded by the polynucleotide according to any one of claims 1 to 11.

13. A vector comprising the polynucleotide according to any one of claims 1 to 11.

14. A transformant, wherein the polynucleotide according to any one of claims 1 to 11 is introduced.

15. A transformant, wherein the vector according to claim 13 is introduced.

16. A method for producing the protein of claim 12, which comprises using the transformant according to claim 14 or 15.

17. A method for producing a glucuronide, which comprises forming the glucuronide from UDP-glucuronic acid and a flavonoid using the protein according to claim 12 as a catalyst.

ABSTRACT

The present invention provides a novel UDP-glucuronosyltransferase and a polynucleotide encoding the same (for example, a polynucleotide comprising a polynucleotide consisting of one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence at positions 1 to 1359 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence at positions 1 to 1365 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 10, the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12, and the nucleotide sequence at positions 1 to 1371 in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 22; or a polynucleotide comprising a polynucleotide encoding a protein having one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ IDNOS: 5, 11, 13 and 23), etc. This provides a novel UDP-glucuronosyltransferase with a broad substrate specificity.

Fig. 1

Formatted Alignments

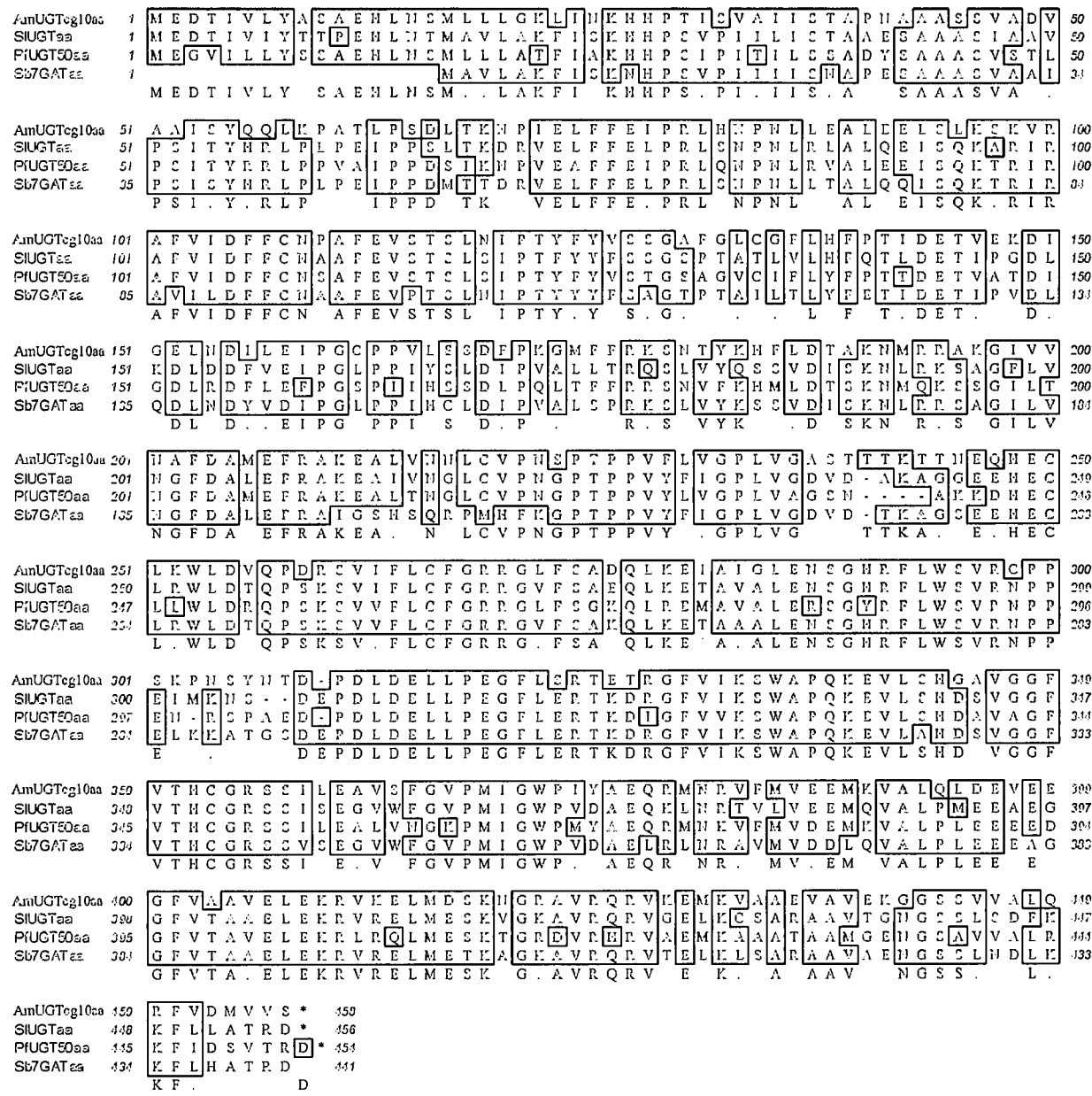


Fig. 2

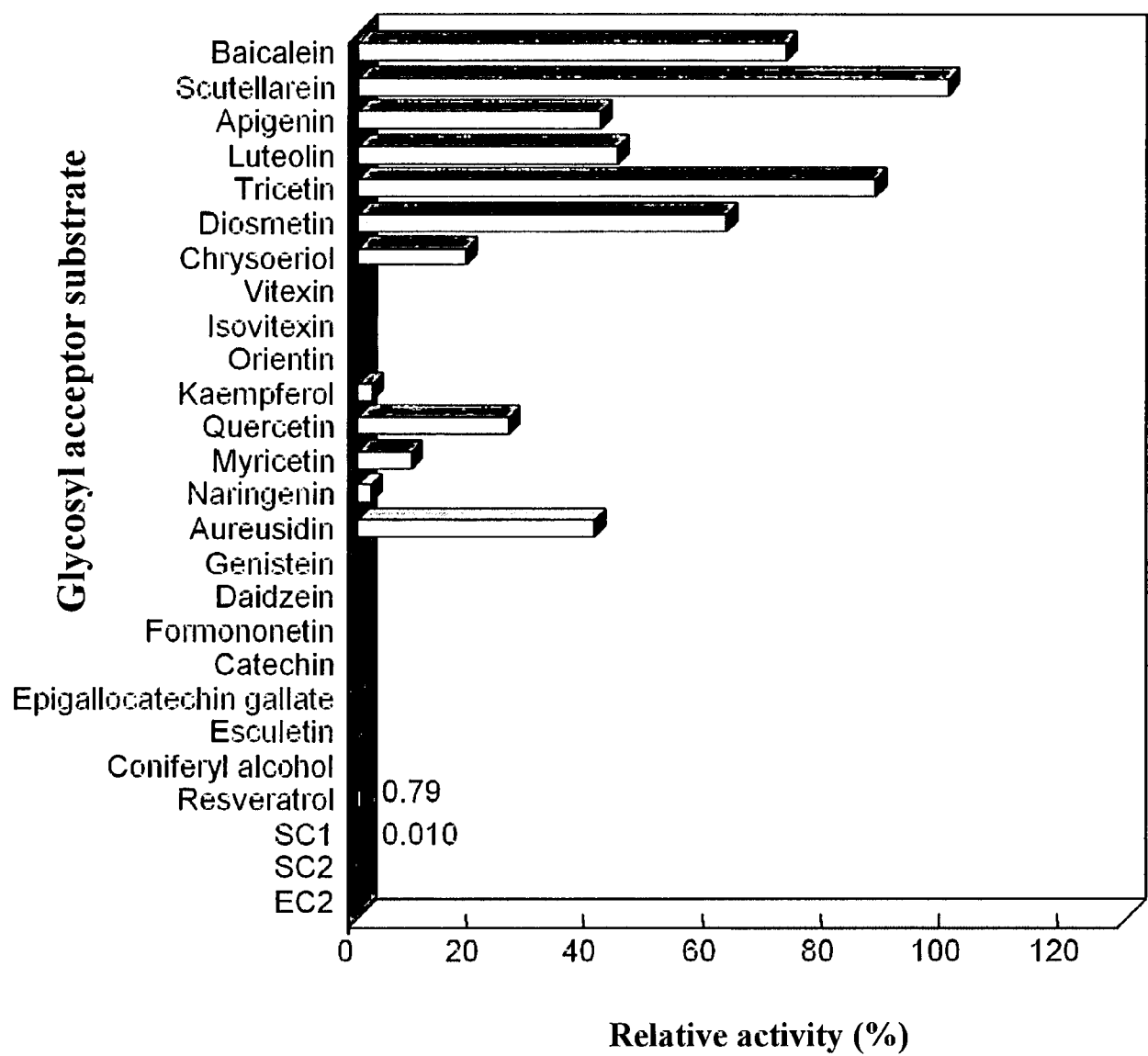


Fig. 3

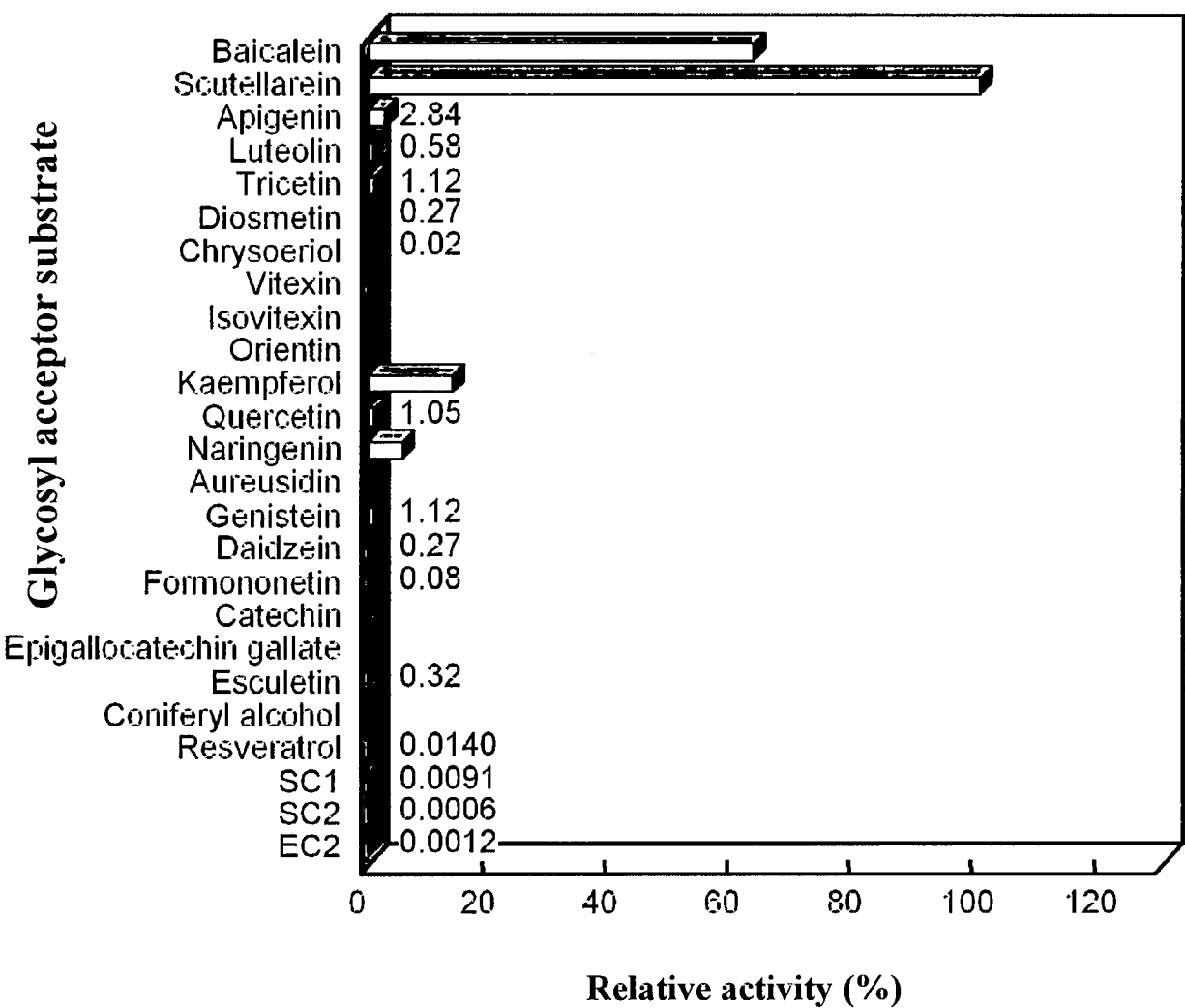


Fig. 4

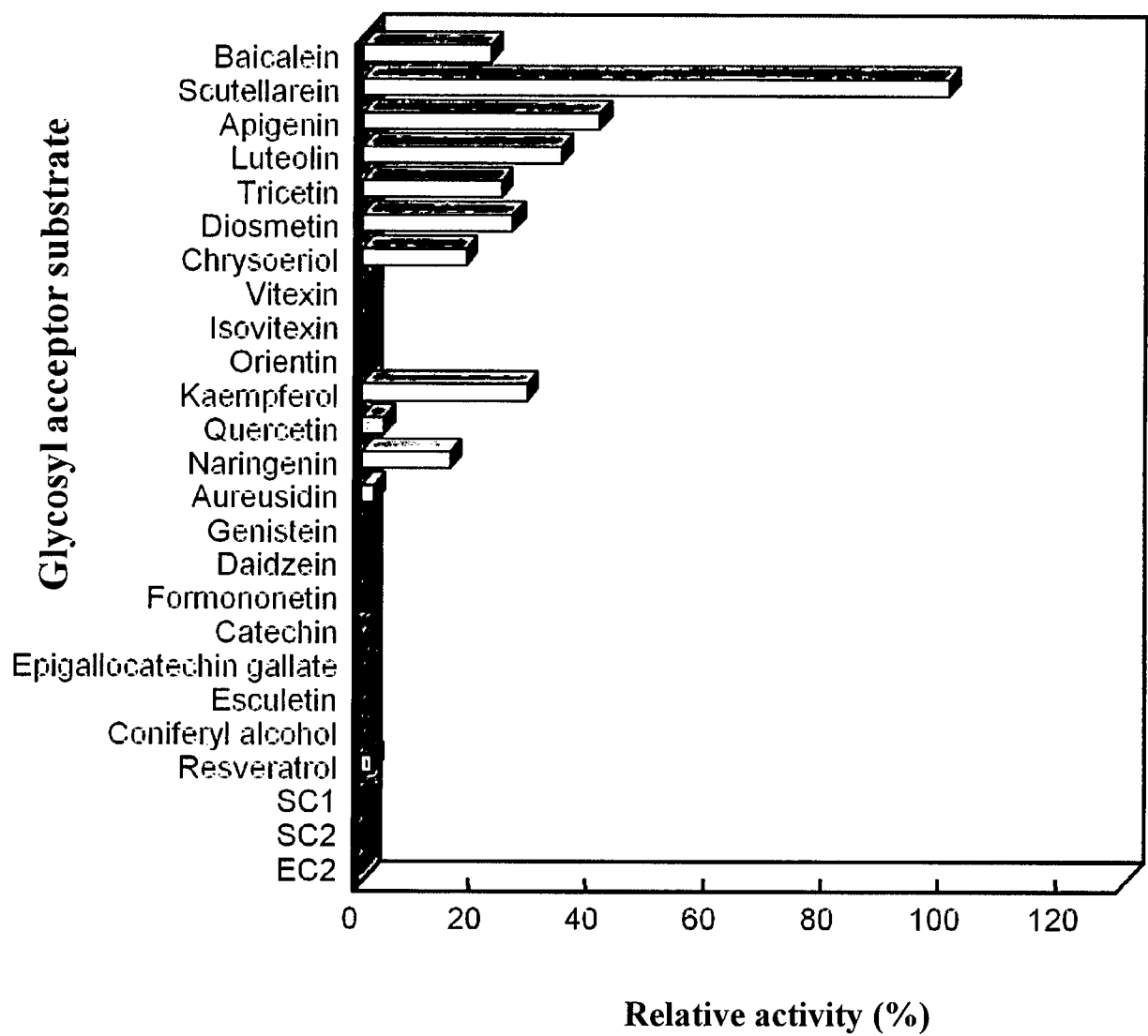


Fig. 5

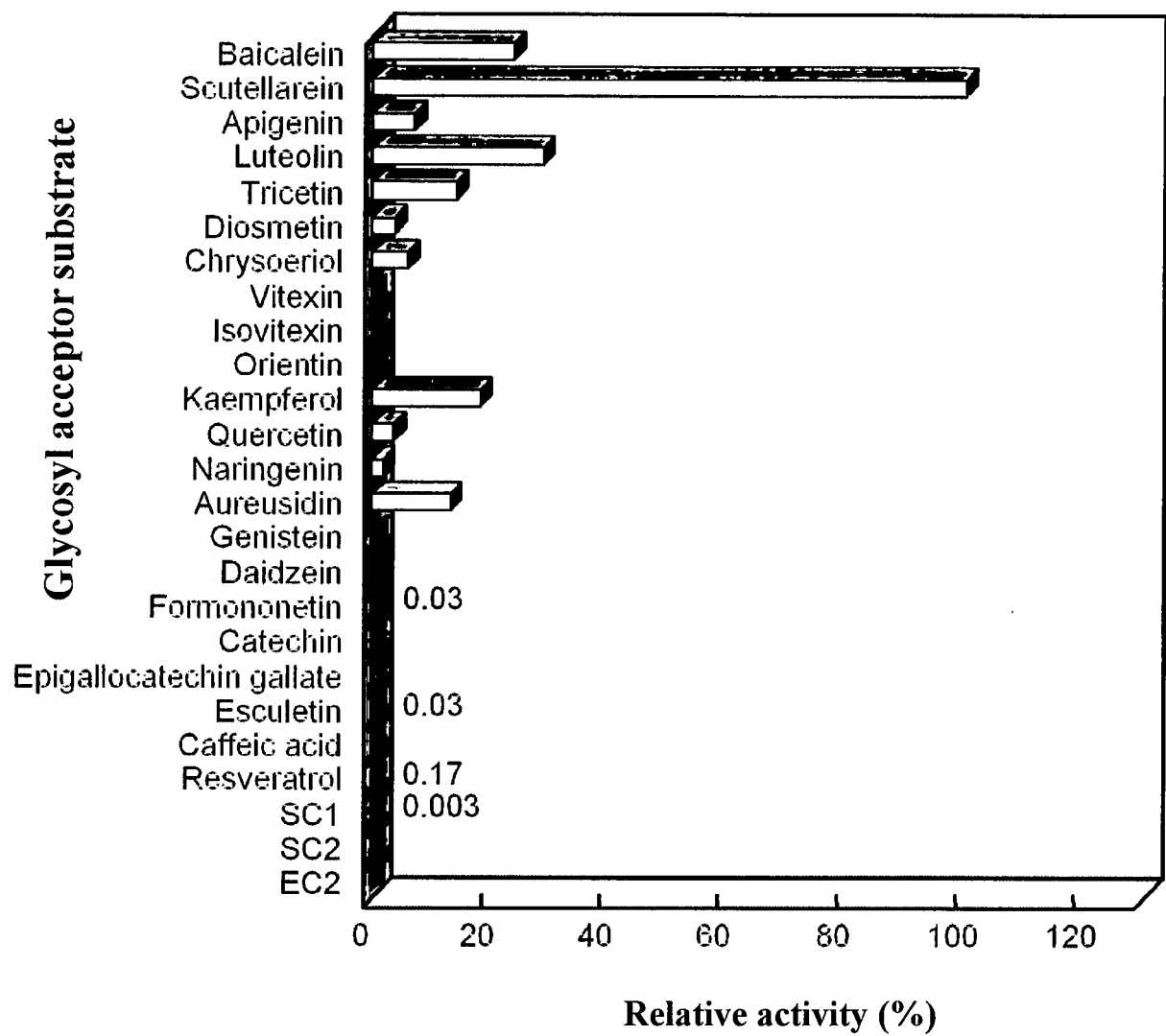


Fig. 6

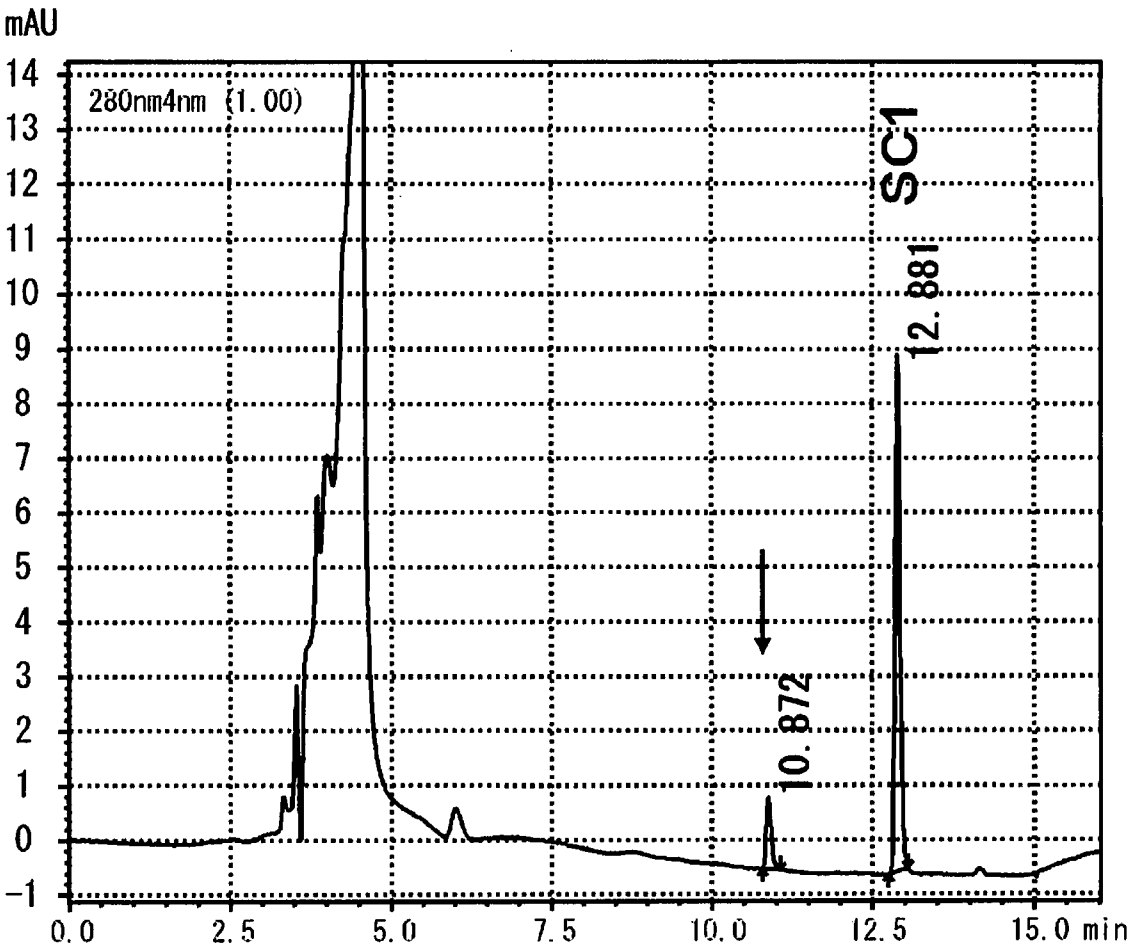


Fig. 7

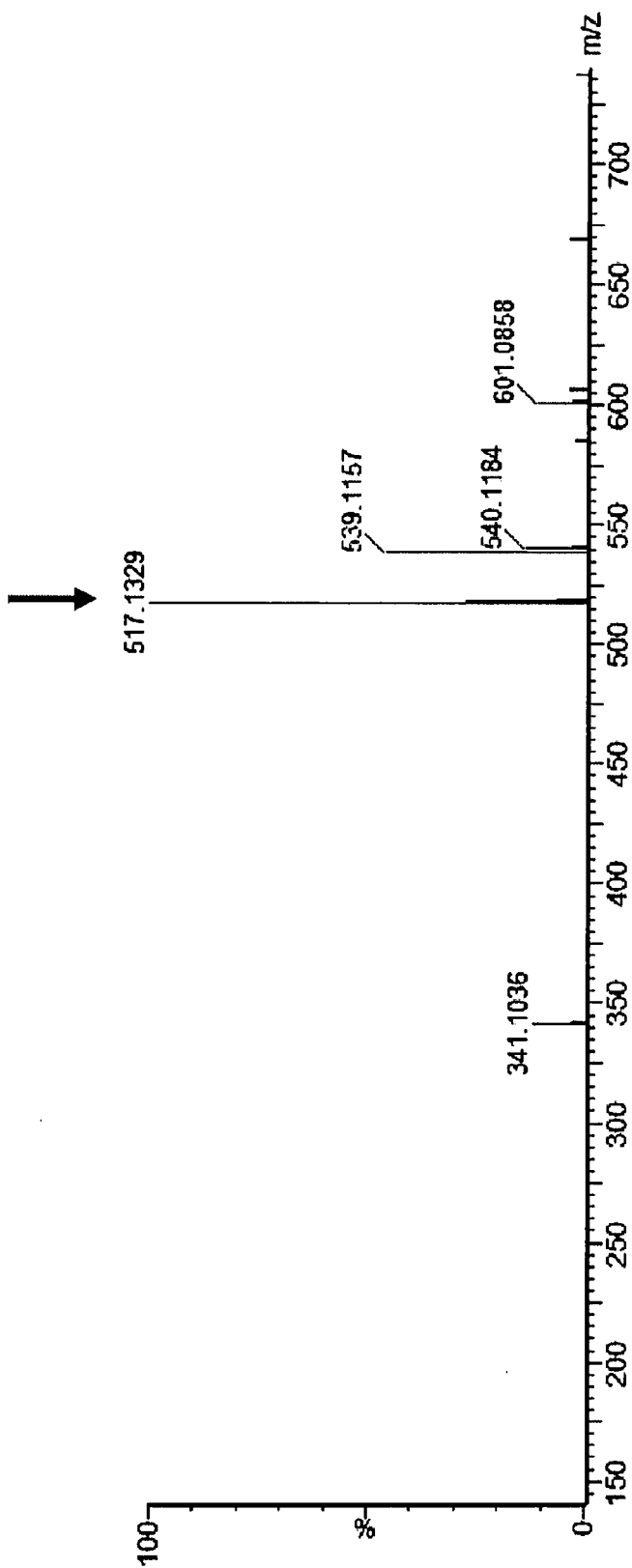
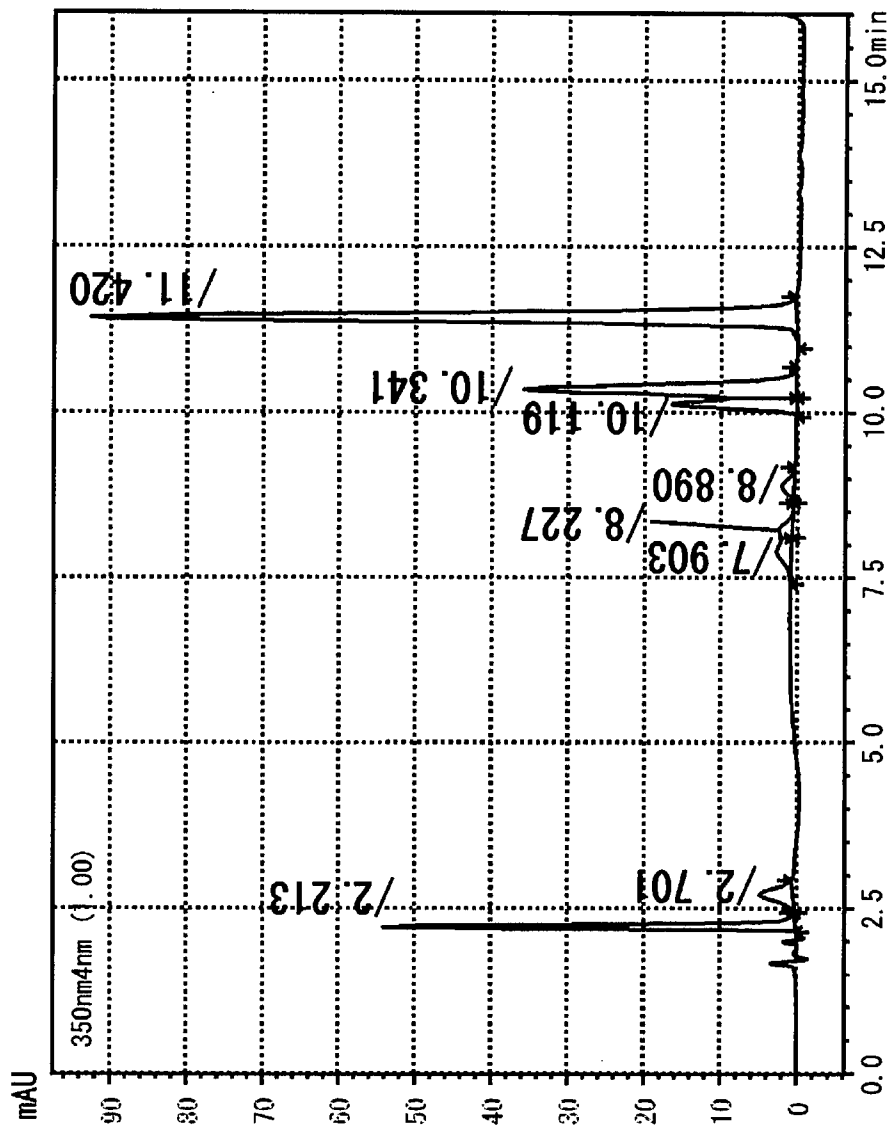


Fig. 8



SEQUENCE LISTING

<110> SUNTORY LIMITED

<120> UDP- glucuronosyltransferase and polynucleotide encoding the same

<130> PCT08-0058

<150> JP 2007-267050

<151> 2007-10-12

<150> JP 2008-067185

<151> 2008-03-17

<160> 25

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

aaacatatgg oggtgctggo gaagttc

27

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

ttttgatcat taatcccgag tggcgtgaag

30

<210> 3

<211> 1326

<212> DNA

<213> *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*

<400> 3

atgggggtgc tggogaagtt catcagcaag aaccacccct ccgccccat catcattatc	60
agcaacgccc oggaatccgc cgcgcctcc gtgggggcca tcccttccat ctctaccac	120
cgcttcccc tccggagat cctcccgac atgacaaag acgggtgga gtctttctc	180
gagctccctc gtctcagcaa cctaacctc ctactgtc tgcaacagat ctcccagaag	240
acaagaatca gagctgttat cctcgatttc ttctgcaag cggttttga ggttcggac	300
agctcaata taccaccta ctactactc agcgccggaa ctcaacgc cactctacc	360
ttgtacttcg aaaccatga tgagaccat cctgttgac ttcaagacct caatgaatat	420
gtcgacatcc ctggtttgc gcgattcac tgcctcgata tcccggtgga ttgtccacg	480
cgtaagagtc ttgtttacaa gagctccgc gacatttga agaacctgcg cagatggga	540
ggcatctctg ttaatggctt cgatgcactc gagtttagag ccataggaag ccatagtcaa	600
cggtctatgc atttcaaagg ccaactctc cggtttact tcatggggcc attggtcgga	660
gatgtcgaca ctaaggccgc cagcgaggag catgagtgc tgagatggct tgatacacag	720
ccaagtaaga gtgtctctt cctttgtttt gggagaagg gtgtctctc tgcataagcag	780
ctgaaggaga cggcggggc gttggagaa agtggccaca ggtttctctg gtcagtgaga	840
aaccacccg agttgaagaa gggaacggg tcgatgagc cggacctgga tgagctgctg	900
cccgagggtt tctggagag aaccaaggat cggggtttcg tgataaagtc gtgggtcca	960
cagaaggagg tctggctca cgaactcgta gttggattcg tgaactactg tggcgaggc	1020
tccgtgtctg aaggggtgtg gttcggagt ccatgatcg gttggccgtt ggacgggag	1080
ctgaggttga atcggcggt gatgtggat gatctgcagg tggcgtgcc gctggaggag	1140
gaggcgggtg gttcgtgac ggcgctgag ttggagaaac gatttagaga gttgatggag	1200

acgaaggogg ggaaggoggt gaggaagaaga gtaacogaac tgaaaactoto ogocagggog 1260
goggtggogg agaatggato ctegetaaat gatttgaaaa aattttettoa ogocactogg 1320
gattaa 1326

<210> 4
<211> 1490
<212> DNA
<213> Perilla frutescens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1362)

<400> 4
atg gaa ggc gtc ata ctt ctt tac tca tog got gag cac ttg aac too 48
Met Glu Gly Val Ile Leu Leu Tyr Ser Ser Ala Glu His Leu Asn Ser
1 5 10 15

atg tta ttg ctc gcc acc ttc atc gcc aaa cac cat ccc tcc atc ccc 96
Met Leu Leu Leu Ala Thr Phe Ile Ala Lys His His Pro Ser Ile Pro
20 25 30

atc aca atc ctt agc tcc gcc gac tac tca gcc gcc gcc tcc gtc tcc 144
Ile Thr Ile Leu Ser Ser Ala Asp Tyr Ser Ala Ala Ala Ser Val Ser
35 40 45

acc ttg cct tcc att act tat cgc cgc ctc ccg ccc gtc ggc ata ccc 192
Thr Leu Pro Ser Ile Thr Tyr Arg Arg Leu Pro Pro Val Ala Ile Pro
50 55 60

cct gac tca ata aag aac ccg gtc gaa gcc ttc ttc gaa atc cct cgt 240
Pro Asp Ser Ile Lys Asn Pro Val Glu Ala Phe Phe Glu Ile Pro Arg
65 70 75 80

ctc caa aac cca aac ctt cgc gtc gcc ctc gaa gaa atc tcc cag aaa 288
Leu Gln Asn Pro Asn Leu Arg Val Ala Leu Glu Glu Ile Ser Gln Lys
85 90 95

aca aga atc aga gca ttt gtg att gat ttc ttc tgc aat tcc gca ttt 336

Thr	Arg	Ile	Arg	Ala	Phe	Val	Ile	Asp	Phe	Phe	Cys	Asn	Ser	Ala	Phe	
			100					105					110			
gaa	gtc	tgc	acc	agc	ctc	agc	ata	ccc	act	tac	ttc	tac	gtc	agc	acc	394
Glu	Val	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Ile	Pro	Thr	Tyr	Phe	Tyr	Val	Ser	Thr	
			115				120					125				
ggt	tcg	gac	ggc	gtc	tgc	atc	ttc	ctc	tat	ttc	ccc	acc	acc	gat	gag	432
Gly	Ser	Ala	Gly	Val	Cys	Ile	Phe	Leu	Tyr	Phe	Pro	Thr	Thr	Asp	Glu	
			130				135				140					
acc	gtt	gct	aca	gac	atc	gga	gac	ttg	ogt	gat	ttt	ott	gaa	ttc	cct	430
Thr	Val	Ala	Thr	Asp	Ile	Gly	Asp	Leu	Arg	Asp	Phe	Leu	Glu	Phe	Pro	
					150					155					160	
ggc	tcg	ccc	att	atc	cac	tcg	tgc	gat	ttg	cca	caa	ott	aca	ttt	ttc	528
Gly	Ser	Pro	Ile	Ile	His	Ser	Ser	Asp	Leu	Pro	Gln	Leu	Thr	Phe	Phe	
					165				170					175		
ogg	ogg	agt	aat	gtt	ttc	aag	cac	atg	ttg	gac	act	tcg	aaa	aac	atg	576
Arg	Arg	Ser	Asn	Val	Phe	Lys	His	Met	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Met	
			180					185					190			
cag	aaa	tct	tct	ggg	atc	ctc	aca	aat	gga	ttc	gac	gct	atg	gag	ttc	624
Gln	Lys	Ser	Ser	Gly	Ile	Leu	Thr	Asn	Gly	Phe	Asp	Ala	Met	Glu	Phe	
			195				200					205				
aga	gct	aag	gaa	gct	cta	act	aac	ggc	ctc	tgc	gtt	ccc	aac	gga	ccc	672
Arg	Ala	Lys	Glu	Ala	Leu	Thr	Asn	Gly	Leu	Cys	Val	Pro	Asn	Gly	Pro	
			210				215				220					
act	cgg	cgg	gtt	tac	tta	gtt	ggg	cca	cta	gtt	goc	gga	agc	aac	gct	720
Thr	Pro	Pro	Val	Tyr	Leu	Val	Gly	Pro	Leu	Val	Ala	Gly	Ser	Asn	Ala	
					230					235					240	
aaa	aaa	gac	cac	gag	tgc	ctg	ctg	tgg	ctg	gac	aga	cag	cca	agt	aaa	768
Lys	Lys	Asp	His	Glu	Cys	Leu	Leu	Trp	Leu	Asp	Arg	Gln	Pro	Ser	Lys	
				245				250					255			
agc	gtg	gtt	ttc	ctt	tgt	ttc	ggc	aga	agg	ggt	ttg	ttt	tcg	ggc	aag	816
Ser	Val	Val	Phe	Leu	Cys	Phe	Gly	Arg	Arg	Gly	Leu	Phe	Ser	Gly	Lys	
			260					265				270				
cag	ttg	aga	gag	atg	gog	gtt	gct	cta	gag	aga	agt	ggc	tac	aga	ttt	864

Gln	Leu	Arg	Glu	Met	Ala	Val	Ala	Leu	Glu	Arg	Ser	Gly	Tyr	Arg	Phe	
	275						280					285				
ctg	tgg	tgg	gtg	egg	aat	cgg	cgg	gaa	aat	ogt	tgg	cgg	gog	gaa	gao	912
Leu	Trp	Ser	Val	Arg	Asn	Pro	Pro	Glu	Asn	Arg	Ser	Pro	Ala	Glu	Asp	
	290					295				300						
oet	gat	ttg	gac	gag	ott	ttg	oet	gag	eggt	ttt	otg	gag	aga	act	aaa	960
Pro	Asp	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	Gly	Phe	Leu	Glu	Arg	Thr	Lys	
305					310					315					320	
gat	ata	ggg	ttt	gtg	gtg	aag	tgg	tgg	gog	oet	cag	aag	gag	gtg	otg	1008
Asp	Ile	Gly	Phe	Val	Val	Lys	Ser	Trp	Ala	Pro	Gln	Lys	Glu	Val	Leu	
				325					330					335		
agt	cat	gac	gog	gtg	goc	ggc	tto	gtg	act	cac	tgt	ggg	agg	ago	tgg	1056
Ser	His	Asp	Ala	Val	Ala	Gly	Phe	Val	Thr	His	Cys	Gly	Arg	Ser	Ser	
			340					345					350			
att	otg	gaa	gog	otg	gtg	aat	ggg	aaa	cgg	atg	atc	ggt	tgg	cca	atg	1104
Ile	Leu	Glu	Ala	Leu	Val	Asn	Gly	Lys	Pro	Met	Ile	Gly	Trp	Pro	Met	
	355					360						365				
tac	gog	gag	cag	agg	atg	aac	aag	gta	tto	atg	gtg	gac	gaa	atg	aag	1152
Tyr	Ala	Glu	Gln	Arg	Met	Asn	Lys	Val	Phe	Met	Val	Asp	Glu	Met	Lys	
	370					375					380					
gta	gog	otg	ooo	ttg	gag	gag	gag	gag	gat	ggg	tto	gtg	acg	gog	gtc	1200
Val	Ala	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Val	
385					390					395					400	
gag	ttg	gag	aag	cgg	otg	aga	cag	ttg	atg	gag	too	aag	aca	ggg	aga	1248
Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Leu	Arg	Gln	Leu	Met	Glu	Ser	Lys	Thr	Gly	Arg	
				405					410					415		
gat	gtt	cgc	cac	ogt	gtt	goc	gaa	atg	aaa	goc	got	goc	acg	gog	gog	1296
Asp	Val	Arg	His	Arg	Val	Ala	Glu	Met	Lys	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	
			420					425					430			
atg	gga	gag	aat	ggt	tgg	gog	gtg	gtt	got	ttg	cgg	aag	tto	att	gat	1344
Met	Gly	Glu	Asn	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Arg	Lys	Phe	Ile	Asp	
		435					440					445				
too	gta	act	ogt	gat	taa	aggattttac	atatgtogot	tattaattaa								1392

Ser Val Thr Arg Asp
450

tatagtatgt aaottagttg ttatttoggg aaatotaoccc aagtcattga gtccaataat 1452

caaattcttcc tatgggctat gccaaattaa aaataaaaa 1490

<210> 5
<211> 453
<212> PRT
<213> Perilla frutescens

<400> 5

Met Glu Gly Val Ile Leu Leu Tyr Ser Ser Ala Glu His Leu Asn Ser
1 5 10 15

Met Leu Leu Leu Ala Thr Phe Ile Ala Lys His His Pro Ser Ile Pro
20 25 30

Ile Thr Ile Leu Ser Ser Ala Asp Tyr Ser Ala Ala Ala Ser Val Ser
35 40 45

Thr Leu Pro Ser Ile Thr Tyr Arg Arg Leu Pro Pro Val Ala Ile Pro
50 55 60

Pro Asp Ser Ile Lys Asn Pro Val Glu Ala Phe Phe Glu Ile Pro Arg
65 70 75 80

Leu Gln Asn Pro Asn Leu Arg Val Ala Leu Glu Glu Ile Ser Gln Lys
85 90 95

Thr Arg Ile Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ser Ala Phe
100 105 110

Glu Val Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Val Ser Thr

115

120

125

Gly Ser Ala Gly Val Cys Ile Phe Leu Tyr Phe Pro Thr Thr Asp Glu
 130 135 140

Thr Val Ala Thr Asp Ile Gly Asp Leu Arg Asp Phe Leu Glu Phe Pro
 145 150 155 160

Gly Ser Pro Ile Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Gln Leu Thr Phe Phe
 165 170 175

Arg Arg Ser Asn Val Phe Lys His Met Leu Asp Thr Ser Lys Asn Met
 180 185 190

Gln Lys Ser Ser Gly Ile Leu Thr Asn Gly Phe Asp Ala Met Glu Phe
 195 200 205

Arg Ala Lys Glu Ala Leu Thr Asn Gly Leu Cys Val Pro Asn Gly Pro
 210 215 220

Thr Pro Pro Val Tyr Leu Val Gly Pro Leu Val Ala Gly Ser Asn Ala
 225 230 235 240

Lys Lys Asp His Glu Cys Leu Leu Trp Leu Asp Arg Gln Pro Ser Lys
 245 250 255

Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu Phe Ser Gly Lys
 260 265 270

Gln Leu Arg Glu Met Ala Val Ala Leu Glu Arg Ser Gly Tyr Arg Phe
 275 280 285

Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Glu Asn Arg Ser Pro Ala Glu Asp

290 295 300

Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu Arg Thr Lys
305 310 315 320

Asp Ile Gly Phe Val Val Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys Glu Val Leu
325 330 335

Ser His Asp Ala Val Ala Gly Phe Val Thr His Cys Gly Arg Ser Ser
340 345 350

Ile Leu Glu Ala Leu Val Asn Gly Lys Pro Met Ile Gly Trp Pro Met
355 360 365

Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Lys Val Phe Met Val Asp Glu Met Lys
370 375 380

Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Glu Asp Gly Phe Val Thr Ala Val
385 390 395 400

Glu Leu Glu Lys Arg Leu Arg Gln Leu Met Glu Ser Lys Thr Gly Arg
405 410 415

Asp Val Arg His Arg Val Ala Glu Met Lys Ala Ala Ala Thr Ala Ala
420 425 430

Met Gly Glu Asn Gly Ser Ala Val Val Ala Leu Arg Lys Phe Ile Asp
435 440 445

Ser Val Thr Arg Asp
450

<210> 6

<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 6
tgggaggcaa accagggatc togacaa 27

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 7
aatcatocaa atotttaagg t 21

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 8
agaaggggtg tggtotocgo tgagcaa 27

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 9

gaacagcgggt cacagatttc t 21

<210> 10
<211> 1446
<212> DNA
<213> Scutellaria laeteviolacea v. yakusimensis

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1368)

<400> 10
atg gag gac acg att gtt atc tac acc acg cgg gag cac ctg aac acc 48
Met Glu Asp Thr Ile Val Ile Tyr Thr Thr Pro Glu His Leu Asn Thr
1 5 10 15

atg gag gtg ctc gcc aag ttc atc agc aaa cac cac ccc tcc gtc ccc 96
Met Ala Val Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His His Pro Ser Val Pro
20 25 30

atc ata ctc atc agc acc gcc gcc gaa tca gcc gcc gcc tcc atc gcc 144
Ile Ile Leu Ile Ser Thr Ala Ala Glu Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ala
35 40 45

gcc gtc ccc tcc atc acc tac cac cgc ctc ccc ctc ccc gag atc cct 192
Ala Val Pro Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Leu Pro Glu Ile Pro
50 55 60

ccc agc ctg aca aag gac cgc gtg gag ctc ttc ttc gag ctc cct cgt 240
Pro Ser Leu Thr Lys Asp Arg Val Glu Leu Phe Phe Glu Leu Pro Arg
65 70 75 80

ctc agc aac cct aat ctc cgc ctt gcc ctg caa gag atc tcc cag aaa 288
Leu Ser Asn Pro Asn Leu Arg Leu Ala Leu Gln Glu Ile Ser Gln Lys
85 90 95

gcc aga atc aga gcc ttc gtc atc gac ttc ttc tgc aac gca gct ttt 336
Ala Arg Ile Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe
100 105 110

gag gtt tct acc agc ctc agt ata ccc act ttc tac tac ttc agc tct 384
Glu Val Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Thr Phe Tyr Tyr Phe Ser Ser

115	120	125	
gga tog ccc aca ggc acc ctc gtt ctg cac ttc caa acc ctt gat gag Gly Ser Pro Thr Ala Thr Leu Val Leu His Phe Gln Thr Leu Asp Glu 130 135 140			432
acc atc cct ggt gac ctt aaa gat ttg gat gat ttt gtc gag atc cct Thr Ile Pro Gly Asp Leu Lys Asp Leu Asp Asp Phe Val Glu Ile Pro 145 150 155 160			480
ggt ttg cct ccc att tac tcc ctg gat atc cct gtt gct ctg ctt aag Gly Leu Pro Pro Ile Tyr Ser Leu Asp Ile Pro Val Ala Leu Leu Thr 165 170 175			528
cgt cag agc ctt gtt tac cag agc tct gtt gac atc tog aaa aac ctg Arg Gln Ser Leu Val Tyr Gln Ser Ser Val Asp Ile Ser Lys Asn Leu 180 185 190			576
cgc aaa tca gca ggc ttc ctt gtt aat ggc ttc gat gcc ctc gag ttc Arg Lys Ser Ala Gly Phe Leu Val Asn Gly Phe Asp Ala Leu Glu Phe 195 200 205			624
aga gct aag gaa gcc ata gtc aac ggc ctc tgc gtt ccc aat ggc ccg Arg Ala Lys Glu Ala Ile Val Asn Gly Leu Cys Val Pro Asn Gly Pro 210 215 220			672
act cct ccg gtt tac ttc atc ggc cca ctc gtc gga gat gtc gat gcc Thr Pro Pro Val Tyr Phe Ile Gly Pro Leu Val Gly Asp Val Asp Ala 225 230 235 240			720
aaa gcc ggc ggc gaa gag cat gaa tgt ctc aga tgg ctt gat aca cag Lys Ala Gly Gly Glu Glu His Glu Cys Leu Arg Trp Leu Asp Thr Gln 245 250 255			768
cca agt aag agt gtg atc ttc ctt tgc ttt ggc aga agg ggt gtg ttc Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Val Phe 260 265 270			816
tcc gct gag caa ctg aag gag acg gcg gtg gcg ttg gag aac agc ggt Ser Ala Glu Gln Leu Lys Glu Thr Ala Val Ala Leu Glu Asn Ser Gly 275 280 285			864
cac aga ttt ctg tgg tog gtg cga aac cca ccg gag atc atg aag aac His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Glu Ile Met Lys Asn 290 295 300			912

290	295	300	
too gat gag ceg gao ctg gat gag ctg ctg ooo gag ggg ttt ctg gag			960
Ser Asp Glu Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu			
305	310	315	320
aga aco aag gat egg ggt tto gtg ato aag tog tgg got ceg cag aag			1003
Arg Thr Lys Asp Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys			
	325	330	335
gag gtg ctg agt oao gao tog gtg ggg ggg tto gto act oao tgt ggg			1056
Glu Val Leu Ser His Asp Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys Gly			
	340	345	350
egg ago too att tog gaa ggg gtg tgg ttt ggg gtg ceg atg ato ggg			1104
Arg Ser Ser Ile Ser Glu Gly Val Trp Phe Gly Val Pro Met Ile Gly			
	355	360	365
tgg ceg gtg gao gog gag cag aag ttg aat oga aca gtg ttg gtg gag			1152
Trp Pro Val Asp Ala Glu Gln Lys Leu Asn Arg Thr Val Leu Val Glu			
	370	375	380
gaa atg cag ctg gog ctg ceg atg gag gag gog gag ggt ggg tto gtg			1200
Glu Met Gln Val Ala Leu Pro Met Glu Glu Ala Glu Gly Gly Phe Val			
385	390	395	400
acg gog got gag ctg gag aaa oga gtt aga gag ttg atg gag tog aag			1248
Thr Ala Ala Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu Ser Lys			
	405	410	415
gtg ggg aag gog gtg agg oaa oga gto ggt gaa ttg aaa tgo tog goo			1296
Val Gly Lys Ala Val Arg Gln Arg Val Gly Glu Leu Lys Cys Ser Ala			
	420	425	430
agg goa gog gtg aog ggg aat gga too tog ota agt gat ttt aaa aag			1344
Arg Ala Ala Val Thr Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Asp Phe Lys Lys			
	435	440	445
ttt ott ctg goo aog agg gat tgatcatata ctotocatot cogtoattga			1395
Phe Leu Leu Ala Thr Arg Asp			
450	455		
attcataaaa gtattttttaa gacaagtttt tgtgagagaa taagttaato a			1446

<210> 11
<211> 455
<212> PRT
<213> Scutellaria laeteviolacea v. yakusimensis

<400> 11

Met Glu Asp Thr Ile Val Ile Tyr Thr Thr Pro Glu His Leu Asn Thr
1 5 10 15

Met Ala Val Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His His Pro Ser Val Pro
20 25 30

Ile Ile Leu Ile Ser Thr Ala Ala Glu Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ala
35 40 45

Ala Val Pro Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Leu Pro Glu Ile Pro
50 55 60

Pro Ser Leu Thr Lys Asp Arg Val Glu Leu Phe Phe Glu Leu Pro Arg
65 70 75 80

Leu Ser Asn Pro Asn Leu Arg Leu Ala Leu Gln Glu Ile Ser Gln Lys
85 90 95

Ala Arg Ile Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe
100 105 110

Glu Val Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Thr Phe Tyr Tyr Phe Ser Ser
115 120 125

Gly Ser Pro Thr Ala Thr Leu Val Leu His Phe Gln Thr Leu Asp Glu
130 135 140

Thr Ile Pro Gly Asp Leu Lys Asp Leu Asp Asp Phe Val Glu Ile Pro
145 150 155 160

Gly Leu Pro Pro Ile Tyr Ser Leu Asp Ile Pro Val Ala Leu Leu Thr
165 170 175

Arg Gln Ser Leu Val Tyr Gln Ser Ser Val Asp Ile Ser Lys Asn Leu
180 185 190

Arg Lys Ser Ala Gly Phe Leu Val Asn Gly Phe Asp Ala Leu Glu Phe
195 200 205

Arg Ala Lys Glu Ala Ile Val Asn Gly Leu Cys Val Pro Asn Gly Pro
210 215 220

Thr Pro Pro Val Tyr Phe Ile Gly Pro Leu Val Gly Asp Val Asp Ala
225 230 235 240

Lys Ala Gly Gly Glu Glu His Glu Cys Leu Arg Trp Leu Asp Thr Gln
245 250 255

Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Val Phe
260 265 270

Ser Ala Glu Gln Leu Lys Glu Thr Ala Val Ala Leu Glu Asn Ser Gly
275 280 285

His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Glu Ile Met Lys Asn
290 295 300

Ser Asp Glu Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu
305 310 315 320

Arg Thr Lys Asp Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys
325 330 335

Glu Val Leu Ser His Asp Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys Gly
340 345 350

Arg Ser Ser Ile Ser Glu Gly Val Trp Phe Gly Val Pro Met Ile Gly
355 360 365

Trp Pro Val Asp Ala Glu Gln Lys Leu Asn Arg Thr Val Leu Val Glu
370 375 380

Glu Met Gln Val Ala Leu Pro Met Glu Glu Ala Glu Gly Gly Phe Val
385 390 395 400

Thr Ala Ala Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu Ser Lys
405 410 415

Val Gly Lys Ala Val Arg Gln Arg Val Gly Glu Leu Lys Cys Ser Ala
420 425 430

Arg Ala Ala Val Thr Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Asp Phe Lys Lys
435 440 445

Phe Leu Leu Ala Thr Arg Asp
450 455

<210> 12
<211> 1374
<212> DNA
<213> Antirrhinum majus

<220>
<221> CDS

75

<222> (1).. (1374)

<400> 12

atg	gag	gac	act	atc	gtt	ctc	tac	gct	tea	gca	gag	cac	ctt	aac	too	48
Met	Glu	Asp	Thr	Ile	Val	Leu	Tyr	Ala	Ser	Ala	Glu	His	Leu	Asn	Ser	
1				5				10					15			

atg	cta	cta	ctc	ggc	aaa	ctc	atc	aac	aaa	cac	cac	ccc	aca	atc	too	96
Met	Leu	Leu	Leu	Gly	Lys	Leu	Ile	Asn	Lys	His	His	Pro	Thr	Ile	Ser	
			20					25					30			

gtc	goc	att	atc	agc	acc	goc	cca	aac	goc	goc	gct	agt	too	gtc	goc	144
Val	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	Ala	Pro	Asn	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Val	Ala	
		35					40					45				

gac	gtg	gog	goc	ata	tct	tat	cag	caa	ctc	aaa	cgc	goc	act	ctc	cct	192
Asp	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Pro	Ala	Thr	Leu	Pro	
	50					55					60					

tgc	gat	cta	acc	aaa	aac	cca	atc	gag	ctc	ttc	ttc	gaa	atc	cca	cgt	240
Ser	Asp	Leu	Thr	Lys	Asn	Pro	Ile	Glu	Leu	Phe	Phe	Glu	Ile	Pro	Arg	
65					70					75				80		

cta	cat	aat	cct	aac	ttg	ctc	gaa	gog	ctg	gaa	gaa	ctg	tea	cta	aaa	288
Leu	His	Asn	Pro	Asn	Leu	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Lys	
				85					90					95		

tea	aaa	gta	agg	gca	ttt	gtg	ata	gat	ttc	ttt	tgc	aat	ccc	gca	ttt	336
Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Phe	Val	Ile	Asp	Phe	Phe	Cys	Asn	Pro	Ala	Phe	
		100						105					110			

gag	gtt	tgc	act	agc	ttg	aac	ata	ccc	act	tac	ttc	tat	gtc	agc	agc	384
Glu	Val	Ser	Thr	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Thr	Tyr	Phe	Tyr	Val	Ser	Ser	
		115					120					125				

ggc	gog	ttt	ggg	cta	tgc	ggg	ttc	ttg	cat	ttt	cgc	aca	atc	gac	gaa	432
Gly	Ala	Phe	Gly	Leu	Cys	Gly	Phe	Leu	His	Phe	Pro	Thr	Ile	Asp	Glu	
	130					135				140						

act	gtc	gaa	aaa	gac	atc	ggc	gaa	ctg	aac	gat	atc	ttg	gag	atc	cgc	480
Thr	Val	Glu	Lys	Asp	Ile	Gly	Glu	Leu	Asn	Asp	Ile	Leu	Glu	Ile	Pro	
145					150				155					160		

ggc	tgc	ccc	cgc	gtt	ttg	too	tgc	gat	ttt	cgc	aaa	ggc	atg	ttc	ttt	528
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Gly Cys Pro Pro Val Leu Ser Ser Asp Phe Pro Lys Gly Met Phe Phe	
165 170 175	
cgc aag agt aac act tac aag cat ttt tta gac acg gcg aaa aac atg	576
Arg Lys Ser Asn Thr Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ala Lys Asn Met	
180 185 190	
agg aga gcg aaa ggg atc gtg gtg aac gcc ttc gac gcg atg gag ttc	624
Arg Arg Ala Lys Gly Ile Val Val Asn Ala Phe Asp Ala Met Glu Phe	
195 200 205	
cga gct aaa gaa gcc ctc gtc aac aat ctg tgc gta ccc aat tog cca	672
Arg Ala Lys Glu Ala Leu Val Asn Asn Leu Cys Val Pro Asn Ser Pro	
210 215 220	
act ccc cca gtt ttc tta gtc ggc cca ttg gtc gga gca agc aca act	720
Thr Pro Pro Val Phe Leu Val Gly Pro Leu Val Gly Ala Ser Thr Thr	
225 230 235 240	
acg aaa acc aca aac gaa cag cac gaa tgc ttg aaa tgg ctg gac gtg	768
Thr Lys Thr Thr Asn Glu Gln His Glu Cys Leu Lys Trp Leu Asp Val	
245 250 255	
cag cca gac aga agc gtg atc ttc tta tgt ttc ggt agg agg ggt ttg	816
Gln Pro Asp Arg Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu	
260 265 270	
ttc tcc gca gac caa ttg aag gaa atc gca att ggt ctg gag aac agc	864
Phe Ser Ala Asp Gln Leu Lys Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Asn Ser	
275 280 285	
ggc cac agg ttc ctg tgg tcc gtg cgt tgc cca cca agt aag cct aac	912
Gly His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Cys Pro Pro Ser Lys Pro Asn	
290 295 300	
tct tat aac act gat cgc gac ctg gac gag ctc ctg ccc gag ggg ttt	960
Ser Tyr Asn Thr Asp Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe	
305 310 315 320	
ttg tcc agg acc gag acc cgg ggt ttc gtg atc aag tcg tgg gcg cct	1008
Leu Ser Arg Thr Glu Thr Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro	
325 330 335	
cag aag gag gtg ctg agc cat ggc ggc gtt gga ggg ttc gtg acg cac	1056

Gln Lys Glu Val Leu Ser His Gly Ala Val Gly Gly Phe Val Thr His	
340 345 350	
tgt ggg agg agt tog ata ttg gaa gog gtg tog ttt ggg gtg oag atg	1104
Cys Gly Arg Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Phe Gly Val Pro Met	
355 360 365	
atc ggg tgg oag ata tac gog gag oag agg atg aat agg gtg ttc atg	1152
Ile Gly Trp Pro Ile Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met	
370 375 380	
gtg gag gag atg aag gtg gog ttg oag ttg gat gag gtg gag gaa ggg	1200
Val Glu Glu Met Lys Val Ala Leu Gln Leu Asp Glu Val Glu Glu Gly	
385 390 395 400	
ttc gtg gog gog gtg gaa ttg gag aag aga gtg aag gag ttg atg gat	1248
Phe Val Ala Ala Val Glu Leu Glu Lys Arg Val Lys Glu Leu Met Asp	
405 410 415	
tog aag aat ggg aga gog gtt agg oag aga gtg aag gag atg aaa gtg	1296
Ser Lys Asn Gly Arg Ala Val Arg Gln Arg Val Lys Glu Met Lys Val	
420 425 430	
gog gct gag gtg gog gtt gaa aag ggt ggt tog tca gtt gtg gog ttg	1344
Ala Ala Glu Val Ala Val Glu Lys Gly Gly Ser Ser Val Val Ala Leu	
435 440 445	
caa cgc ttt gtt gat atg gtg gtt tct taa	1374
Gln Arg Phe Val Asp Met Val Val Ser	
450 455	

- <210> 13
- <211> 457
- <212> PRT
- <213> Antirrhinum majus

<400> 13

Met Glu Asp Thr Ile Val Leu Tyr Ala Ser Ala Glu His Leu Asn Ser	
1 5 10 15	

Met Leu Leu Leu Gly Lys Leu Ile Asn Lys His His Pro Thr Ile Ser

	20		25		30														
Val	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr	Ala	Pro	Asn	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Val	Ala				
	35						40					45							
Asp	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Pro	Ala	Thr	Leu	Pro				
	50					55					60								
Ser	Asp	Leu	Thr	Lys	Asn	Pro	Ile	Glu	Leu	Phe	Phe	Glu	Ile	Pro	Arg				
65					70					75					80				
Leu	His	Asn	Pro	Asn	Leu	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Lys				
				85					90					95					
Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Phe	Val	Ile	Asp	Phe	Phe	Cys	Asn	Pro	Ala	Phe				
			100					105						110					
Glu	Val	Ser	Thr	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Thr	Tyr	Phe	Tyr	Val	Ser	Ser				
	115						120					125							
Gly	Ala	Phe	Gly	Leu	Cys	Gly	Phe	Leu	His	Phe	Pro	Thr	Ile	Asp	Glu				
	130					135					140								
Thr	Val	Glu	Lys	Asp	Ile	Gly	Glu	Leu	Asn	Asp	Ile	Leu	Glu	Ile	Pro				
145					150					155					160				
Gly	Cys	Pro	Pro	Val	Leu	Ser	Ser	Asp	Phe	Pro	Lys	Gly	Met	Phe	Phe				
				165					170					175					
Arg	Lys	Ser	Asn	Thr	Tyr	Lys	His	Phe	Leu	Asp	Thr	Ala	Lys	Asn	Met				
			180					185					190						
Arg	Arg	Ala	Lys	Gly	Ile	Val	Val	Asn	Ala	Phe	Asp	Ala	Met	Glu	Phe				

195	200	205
Arg Ala Lys Glu Ala Leu Val Asn Asn Leu Cys Val Pro Asn Ser Pro		
210	215	220
Thr Pro Pro Val Phe Leu Val Gly Pro Leu Val Gly Ala Ser Thr Thr		
225	230	235 240
Thr Lys Thr Thr Asn Glu Gln His Glu Cys Leu Lys Trp Leu Asp Val		
	245	250 255
Gln Pro Asp Arg Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu		
	260	265 270
Phe Ser Ala Asp Gln Leu Lys Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Asn Ser		
	275	280 295
Gly His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Cys Pro Pro Ser Lys Pro Asn		
	290	295 300
Ser Tyr Asn Thr Asp Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe		
305	310	315 320
Leu Ser Arg Thr Glu Thr Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro		
	325	330 335
Gln Lys Glu Val Leu Ser His Gly Ala Val Gly Gly Phe Val Thr His		
	340	345 350
Cys Gly Arg Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Phe Gly Val Pro Met		
	355	360 365
Ile Gly Trp Pro Ile Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met		

370		375		380											
Val	Glu	Glu	Met	Lys	Val	Ala	Leu	Gln	Leu	Asp	Glu	Val	Glu	Glu	Gly
385				390					395						400
Phe	Val	Ala	Ala	Val	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Val	Lys	Glu	Leu	Met	Asp
			405						410					415	
Ser	Lys	Asn	Gly	Arg	Ala	Val	Arg	Gln	Arg	Val	Lys	Glu	Met	Lys	Val
			420					425					430		
Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Val	Glu	Lys	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Val	Ala	Leu
		435					440						445		
Gln	Arg	Phe	Val	Asp	Met	Val	Val	Ser							
	450					455									

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 14
aaacatatgg aaggogtoat acttc 25

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 15
.

ttttgatcat taatcaagag ttacggaato	30
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic DNA	
<400> 16	
aaacatatgg aggacaagat tgttato	27
<210> 17	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic DNA	
<400> 17	
ttcatatgtc aatcccttgt ggccagaag	29
<210> 18	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> synthetic DNA	
<400> 18	
aaacatatgg aggacaatat ogttoto	27
<210> 19	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220>		
<223>	synthetic DNA	
<400>	19	
	ttggatcctt aagaaaccac catatcaac	29
<210>	20	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	synthetic DNA	
<400>	20	
	ggccaaaagc gcgggagctg atgtaga	27
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	synthetic DNA	
<400>	21	
	agtgggtata ttaagcctg t	21
<210>	22	
<211>	1433	
<212>	DNA	
<213>	Sesamum indicum	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1)..(1374)	
<400>	22	
	atg gaa gac acc gtt gtc ctc tac aat tog gca gag cac ttg aat tcc	48
	Met Glu Asp Thr Val Val Leu Tyr Thr Ser Ala Glu His Leu Asn Ser	

1	5	10	15	
atg tta gtg ctg ggc aaa ttc att agc aaa cat tat ccc tcc atc ccc				96
Met Leu Val Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His Tyr Pro Ser Ile Pro				
	20	25	30	
ctc cta atc ctt tgc tcc ggc ccc gag tcc ggc gag got tcc gtc ggc				144
Leu Leu Ile Leu Cys Ser Ala Pro Glu Ser Ala Ala Ala Ser Val Ala				
	35	40	45	
acc gtg cct tcc atc act tac cac cgc ctc cca cct ccc got ctt cct				192
Thr Val Pro Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Pro Pro Ala Leu Pro				
	50	55	60	
ccc aac ttg acc acc aat cct ctt gaa ctc tta ttc gaa ata cct cgt				240
Pro Asn Leu Thr Thr Asn Pro Leu Glu Leu Leu Phe Glu Ile Pro Arg				
65	70	75	80	
ctc aac aac cca aat gtt agc aaa ggc ctt cca gag atc tcc cag aag				288
Leu Asn Asn Pro Asn Val Ser Lys Ala Leu Gln Glu Ile Ser Gln Lys				
	85	90	95	
tea aga atc aaa goa ttt gtc att gat ttc ttc tgc aat cca gtt ttt				336
Ser Arg Ile Lys Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Pro Val Phe				
	100	105	110	
gaa gtt tct aca ggc ttg aat ata ccc act tac ttc tac atc agc tcc				384
Glu Val Ser Thr Gly Leu Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Ile Ser Ser				
	115	120	125	
ggc gag ttt ggc ctt tgc ccc ttt ctg aat ttc ccc act atc gag gaa				432
Gly Ala Phe Gly Leu Cys Pro Phe Leu Asn Phe Pro Thr Ile Glu Glu				
	130	135	140	
acc gtt cct gga gac ctt got gac ttg aat gat ttt gtc gaa att cct				480
Thr Val Pro Gly Asp Leu Ala Asp Leu Asn Asp Phe Val Glu Ile Pro				
145	150	155	160	
ggc tgc cca ccc gtt cac tca tca gat ttc ccc gag got atg att cat				528
Gly Cys Pro Pro Val His Ser Ser Asp Phe Pro Glu Ala Met Ile His				
	165	170	175	
cgt aag agt aat atc tac aaa cat ttt atg gac ggc goa aga aac atg				576
Arg Lys Ser Asn Ile Tyr Lys His Phe Met Asp Ala Ala Arg Asn Met				

180	185	190	
gca aaa tca acc gga aac ctg gta aac gca ttt gat gog cto gag ttt			624
Ala Lys Ser Thr Gly Asn Leu Val Asn Ala Phe Asp Ala Leu Glu Phe			
195	200	205	
agg gct aag gaa goa ctg ata aac ggt ttg tgo att ooo aat gog oca			672
Arg Ala Lys Glu Ala Leu Ile Asn Gly Leu Cys Ile Pro Asn Ala Pro			
210	215	220	
aca oag oot gtt tao ttg gtt gga ooo tta gtt ggt gat ago aao ogt			720
Thr Pro Pro Val Tyr Leu Val Gly Pro Leu Val Gly Asp Ser Asn Arg			
225	230	235	240
aac aac ggo tgo ata oag oot gaa tgo ctg aag tgg ott gat tog oag			768
Asn Asn Gly Cys Ile Gln His Glu Cys Leu Lys Trp Leu Asp Ser Gln			
	245	250	255
ooo ago aaa ago gtg att tto cto tgo tto ggo agg agg ggo ttg ttt			816
Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu Phe			
	260	265	270
toc gtt gaa cag ott aaa gaa atg gog ott ggt ctg gaa aat ago ggo			864
Ser Val Glu Gln Leu Lys Glu Met Ala Leu Gly Leu Glu Asn Ser Gly			
	275	280	285
tat aga ttt ott tgg too gtg ogo agt oca oag ggo aag cag aat toa			912
Tyr Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Ser Pro Pro Gly Lys Gln Asn Ser			
290	295	300	
gca gog gog gag oca gao ttg gat gag ctg cta oca aag ggt tto ctg			960
Ala Ala Ala Glu Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Lys Gly Phe Leu			
305	310	315	320
gag aga aot aaa gao agg ggo tto ata att aag toa tgg gog oag cag			1008
Glu Arg Thr Lys Asp Arg Gly Phe Ile Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln			
	325	330	335
acg gaa gtg ctg agt oac gat tog gtg ggt ggg tto gtg aca oac tgo			1056
Thr Glu Val Leu Ser His Asp Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys			
	340	345	350
ggt agg ago toa att ctg gaa gog gtg tog ctg ggg gtg oag atg atc			1104
Gly Arg Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Leu Gly Val Pro Met Ile			

355	360	365	
ggg tgg cgg ttg tac ggg gag cag agg atg aat cgg gtt ttc atg gtg			1152
Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met Val			
370	375	380	
gag gaa atg aag gtg ggg ctg cca tta gag gag acg ggg gat ggg tta			1200
Glu Glu Met Lys Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Thr Ala Asp Gly Leu			
385	390	395	400
gtg acg ggg gtt gag ttg gag aag cga gtc aga cag ttg atg gac tcc			1248
Val Thr Ala Val Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Gln Leu Met Asp Ser			
405	410	415	
cag acg gga aga gct gtg cga cac cga gtg acc gaa ttg aaa agc tcc			1296
Gln Thr Gly Arg Ala Val Arg His Arg Val Thr Glu Leu Lys Ser Ser			
420	425	430	
gct ggg ggg ggg gtg cgg aag aat gga tgg tgg cta gtg ggg ttg caa			1344
Ala Ala Ala Ala Val Arg Lys Asn Gly Ser Ser Leu Val Ala Leu Gln			
435	440	445	
aat ttc att ggg tgg gtg act cgg gtt tga gtgatgttat tactccaagt			1394
Asn Phe Ile Ala Ser Val Thr Arg Val			
450	455		
aataaaattt aattacogtg taataaaaaaa aaaaaaaa			1433

- <210> 23
- <211> 457
- <212> PRT
- <213> Sesamum indicum

<400> 23

Met Glu Asp Thr Val Val Leu Tyr Thr Ser Ala Glu His Leu Asn Ser
1 5 10 15

Met Leu Val Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His Tyr Pro Ser Ile Pro
20 25 30

Leu Leu Ile Leu Cys Ser Ala Pro Glu Ser Ala Ala Ala Ser Val Ala
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Pro Pro Ala Leu Pro
50 55 60

Pro Asn Leu Thr Thr Asn Pro Leu Glu Leu Leu Phe Glu Ile Pro Arg
65 70 75 80

Leu Asn Asn Pro Asn Val Ser Lys Ala Leu Gln Glu Ile Ser Gln Lys
85 90 95

Ser Arg Ile Lys Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Pro Val Phe
100 105 110

Glu Val Ser Thr Gly Leu Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Ile Ser Ser
115 120 125

Gly Ala Phe Gly Leu Cys Pro Phe Leu Asn Phe Pro Thr Ile Glu Glu
130 135 140

Thr Val Pro Gly Asp Leu Ala Asp Leu Asn Asp Phe Val Glu Ile Pro
145 150 155 160

Gly Cys Pro Pro Val His Ser Ser Asp Phe Pro Glu Ala Met Ile His
165 170 175

Arg Lys Ser Asn Ile Tyr Lys His Phe Met Asp Ala Ala Arg Asn Met
180 185 190

Ala Lys Ser Thr Gly Asn Leu Val Asn Ala Phe Asp Ala Leu Glu Phe
195 200 205

Arg Ala Lys Glu Ala Leu Ile Asn Gly Leu Cys Ile Pro Asn Ala Pro
 210 215 220

Thr Pro Pro Val Tyr Leu Val Gly Pro Leu Val Gly Asp Ser Asn Arg
 225 230 235 240

Asn Asn Gly Cys Ile Gln His Glu Cys Leu Lys Trp Leu Asp Ser Gln
 245 250 255

Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu Phe
 260 265 270

Ser Val Glu Gln Leu Lys Glu Met Ala Leu Gly Leu Glu Asn Ser Gly
 275 280 285

Tyr Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Ser Pro Pro Gly Lys Gln Asn Ser
 290 295 300

Ala Ala Ala Glu Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Lys Gly Phe Leu
 305 310 315 320

Glu Arg Thr Lys Asp Arg Gly Phe Ile Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln
 325 330 335

Thr Glu Val Leu Ser His Asp Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys
 340 345 350

Gly Arg Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Leu Gly Val Pro Met Ile
 355 360 365

Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met Val
 370 375 380

Glu Glu Met Lys Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Thr Ala Asp Gly Leu
385 390 395 400

Val Thr Ala Val Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Gln Leu Met Asp Ser
405 410 415

Gln Thr Gly Arg Ala Val Arg His Arg Val Thr Glu Leu Lys Ser Ser
420 425 430

Ala Ala Ala Ala Val Arg Lys Asn Gly Ser Ser Leu Val Ala Leu Gln
435 440 445

Asn Phe Ile Ala Ser Val Thr Arg Val
450 455

<210> 24
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 24
caccatatgg aagacacogt tgtocteta 29

<210> 25
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 25
ggatcctaac atcactcaaa ccgagtea 29

DESCRIPCIÓN

UDP-GLUCUFONIL TRANSFERASA Y POLINUCLEÓTIDO QUE CODIFICA LA MISMA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a una UDP-glucuronosiltransferasa, un polinucleótido que codifica la misma, un vector que contiene la misma, un transformador, etc.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Los metabolitos secundarios de las plantas polifenólicas que incluyen los flavonoides y los lignanos, con abundante experiencia alimenticia, han llamado la atención como materiales funcionales durante años debido a las propiedades funcionales representadas por sus actividades como antioxidantes, y ya están disponibles comercialmente como
15 alimentos saludables. Por ejemplo, quercetina (flavonoide), OTPP (flavonoide), sesamin (lignano), etc. son materiales representativos de alimentos saludables.

20 La trayectoria de la biosíntesis de los flavonoides en las células de las plantas se ha estudiado desde tiempos antiguos. Se han aislado las enzimas biosintetizadas que catalizan la trayectoria metabólica y los genes que codifican las enzimas, lo cual ha llevado a un mejor entendimiento de sus mecanismos moleculares.

25 Por otra parte, es insuficiente el conocimiento sobre cómo los metabolitos secundarios de las plantas serían metabolizados, para mostrar su funcionamiento después de su

captación in vivo.

Se sabe que la glicosilación de los metabolitos secundarios de la planta generalmente es catalizada por una enzima que pertenece a la superfamilia denominada UDP-
5 glicosiltransferasa (UGT), irrespectivamente de los tipos de azúcares (glucosa, ramnosa, ácido glucurónico, galactosa, etc.). Adicionalmente, en los estudios sobre la sesamin, se ha mostrado que los metabolitos secundarios están presentes in vivo como glucurónidos vía metabolitos del catecol. Por eso se
10 considera que los glucurónidos tendrían una parte en el desarrollo de las funciones in vivo de los metabolitos secundarios de las plantas.

Se ha confirmado que cuatro monoglucurónidos están presentes como metabolitos de la quercetina en mamíferos (Q-3-
15 GlcA, Q-7-GlcA, Q-3'-GlcA and Q-4'-GlcA) (Referencia 1: Day, AJ et al. Free Radic. Res. 35, 941-952, 2001, Referencia 2: Moon, J. H. et al. Free Radical Biology & Medicine 30, 1274-1285, 2001, Referencia 3: O'Leary, K. A. et al. Biochemical Pharmacology 65, 479-491, 2003, y Referencia 4: van der Woude,
20 H. et al. Chem. Res. Toxicol. 17, 1520-1530, 2004); para entender estas funciones in vivo, es necesario obtener una cantidad suficiente de compuestos para examinar sus actividades. Sin embargo, aún se desconoce alguna UDP-glucuronosiltransferasa apropiada que muestre una amplia
25 especificidad de sustrato, y fue realmente imposible sintetizar por vía química un producto para la reacción de fijación en sitio específico.

La raíz de la Labiatae *Scutellaria baicalensis* se llama

escutellaria o "wogon" en Japonés, y se sabe que en ella se acumulan 7-glucurónidos de flavonas altamente antioxidantes. De acuerdo a los límites entre fármacos y no-fármacos, la raíz de la *Scutellaria baicalensis* está clasificada entre los fármacos (Referencia 5: Gao, Z. et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1472, 643-650. 1999). A la fecha, la Sb7GAT se purifica a partir de la *Labiatae Scutellaria baicalensis* como 7-glucuronosiltransferasa de flavona; esta enzima actúa solamente sobre flavonas con sustituyentes tales como el grupo hidroxilo en la posición orto de las flavonas 7-OH (baicaleína, escutelareína, etc.) pero no actúa sobre la apigenina y la luteolina que son las flavonas principales y tampoco sobre la quercetina que es uno de los flavonoles (Referencia 6: Nagashima S. et al., *Phytochemistry* 53, 533-538, 2000). Un gen correspondiente a esta Sb7GAT está registrado en GenBank (Accession No. AB042277) pero su función permanece sin confirmar.

Por otra parte, se sabe que 7-glucurónidos de flavona que son más diversos que los de escutellaria o "wogon" se acumulan en la *Perilla frutescens*, una variedad de hoja roja, con experiencia en dietética (Referencia 7: Yamazaki, M. et al. *Phytochemistry* 62, 987-998. 2003).

Referencias:

1. Day, A. J. et al., *Free Radic. Res.*, 35, 941-952, 2001
2. Moon, J. H. et al., *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 1274-1285, 2001
3. O'Leary, K. A. et al., *Biochemical Pharmacology*, 65, 479-491, 2003

4. van der Woude, H. et al., Chem. Res. Toxicol., 17, 1520-1530, 2004

5. Gao, Z. et al., Biochemica et Biophysica Acta, 1472, 643-650, 1999

5 6. Nagashima S. et al., Phytochemistry, 53, 533-538, 2000.

7. Yamazaki, M. et al., Phytochemistry, 62, 987-998, 2003

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

PROBLEMAS A SER RESUELTOS POR LA INVENCION

Bajo estas circunstancias, ha sido deseable identificar
10 una nueva UDP-glucuronosiltransferasa con especificidad de sustrato más amplia y un gen que codifique la misma.

MEDIOS PARA RESOLVER EL PROBLEMA

En vista de las anteriores circunstancias se ha llegado a la presente invención y se proporcionan las siguientes UDP-
15 glucuronosiltransferasas y polinucleótidos que codifican las mismas, así como vectores que soportan las mismas, transformadores, etc.

(1) Un polinucleótido cualquiera de la (a) a la (f) de los que siguen:

20 (a) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que consta de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consta de la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365
25 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en

la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 12, y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22;

(b) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que
5 codifica una proteína que tiene una secuencia de amino ácidos seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23;

(c) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que
10 codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con eliminación, sustitución, inserción y/o adición of 1 a 15 aminoácidos en un secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y que tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa;

(d) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que
15 codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene homología de por lo menos el 80% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23 y que tiene actividad de UDP-
20 glucuronosiltransferasa;

(e) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que
codifica una proteína que hibridiza bajo condiciones estrictas
con un polinucleótido que consta de una secuencia de
nucleótidos complementaria a un secuencia de nucleótidos
25 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de

nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 12, y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22, y tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa; y,

(f) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que hibridiza bajo condiciones estrictas con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa.

(2) El polinucleótido de acuerdo con el anterior numeral (1), el cual es cualquiera de la (g) a la (j) de los que siguen:

(g) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con eliminación, sustitución, inserción y/o adición de no más de 10 aminoácidos (i.e. 0-10 aminoácidos) en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y que tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa;

(h) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene homología de por lo menos el 90% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID

Nos: 5, 11, 13 y 23, y que tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa;

(i) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que hibridiza bajo condiciones muy
5 estrictas con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consta de la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4, la secuencia de
10 nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 12, y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de
15 nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22, y tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa; y,

(j) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que hibridiza bajo condiciones muy estrictas con un polinucleótido que consiste en una secuencia
20 de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica a proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y tiene una actividad de UDP-glucuronosiltransferasa.

25 (3) El polinucleótido de acuerdo con el (1) anterior, que comprende un polinucleótido que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4.

(4) El polinucleótido de acuerdo con el (1) anterior, que comprende un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10.

5 (5) El polinucleótido de acuerdo con el (1) anterior, que comprende un polinucleótido que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 12.

10 (6) El polinucleótido de acuerdo con el (1) anterior, que comprende un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22.

15 (7) El polinucleótido de acuerdo con el (1) anterior, que comprende un polinucleótido que codifica la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No: 5.

(8) El polinucleótido de acuerdo con el (1) anterior, que comprende un polinucleótido que codifica la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ
20 ID No: 11.

(9) El polinucleótido de acuerdo con el (1) anterior, que comprende un polinucleótido que codifica la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No: 13.

25 (10) El polinucleótido de acuerdo con el (1) anterior, que comprende un polinucleótido que codifica la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ

ID No: 23.

(11) El polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1) a (10), que es un ADN.

(12) Una proteína codificada por el polinucleótido de
5 acuerdo con cualquiera de los anteriores (1) a (11).

(13) Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1) a (11).

(14) Un transformador, en donde se introduce el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los anteriores (1)
10 a (11).

(15) Un transformador, en donde se introduce el vector de acuerdo con el (13) anterior.

(16) Un método para producir la proteína de la reivindicación 12, el cual comprende el uso del transformador
15 de acuerdo con las anteriores (14) o (15).

(17) Un método para producir un glucurónido, el cual comprende la formación del glucurónido a partir del ácido UDP-glucurónico y un flavonoide empleando la proteína de acuerdo con el (12) anterior como catalizador.

20

EFFECTO VENTAJOSO DE LA INVENCION

El polinucleótido de la presente invención es útil para la producción de una nueva UDP-glucuronosiltransferasa por introducción del polinucleótido en, e.g., un transformador. En
25 una modalidad preferida de la invención, la UDP-glucuronosiltransferasa tiene amplia especificidad de sustrato

y actividad de glucuronidación de diversos sustratos aceptores de glicosil.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS GRÁFICAS

FIG. 1 muestra alineamientos de las secuencias de aminoácidos de AmUGTcg10 derivados de *Antirrhinum majus*, SlUGT derivados de *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*, PfUGT50 derivados de *Perilla frutescens*, una variedad de hoja roja y Sb7GAT derivada de *Scutellaria baicalensis*.

FIG. 2 muestra los resultados del análisis de la especificidad de los sustratos aceptores de glicosil para PfUGT50.

FIG. 3 muestra los resultados del análisis de la especificidad de los sustratos aceptores de glicosil para SlUGT.

FIG. 4 muestra los resultados del análisis de la especificidad de los sustratos aceptores de glicosil para AmUGTcg10.

FIG. 5 muestra los resultados del análisis de la especificidad de los sustratos aceptores de glicosil para SiUGT23.

FIG. 6 muestra los resultados del análisis por LC-MS de los productos en la solución de reacción de SlUGT y SC1, en donde las flechas denotan los productos.

FIG. 7 muestra los resultados del análisis por MS de los productos en la reacción de SC1 y SlUGT1.

FIG. 8 muestra los resultados del análisis por LC de los productos en la reacción de quercetina y SlUGT1.

Texto Libre del listado de Secuencia:

SEQ ID NO: 1 ADN sintético

5 SEQ ID NO: 2 ADN sintético

SEQ ID NO: 6 ADN sintético

SEQ ID NO: 7 ADN sintético

SEQ ID NO: 8 ADN sintético

SEQ ID NO: 9 ADN sintético

10 SEQ ID NO: 14 ADN sintético

SEQ ID NO: 15 ADN sintético

SEQ ID NO: 16 ADN sintético

SEQ ID NO: 17 ADN sintético

SEQ ID NO: 18 ADN sintético

15 SEQ ID NO: 19 ADN sintético

SEQ ID NO: 20 ADN sintético

SEQ ID NO: 21 ADN sintético

SEQ ID NO: 24 ADN sintético

SEQ ID NO: 25 ADN sintético

20

MEJORES MANEJA PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

De aquí en adelante, se describen detalladamente las UDP-glucuronosiltransferasas de la invención, el polinucleótido que codifica las mismas, el vector que soporta las mismas, el

transformador etc.

1. Polinucleótido de la invención

Primero, la presente invención proporciona (a) un polinucleótido (específicamente un ADN, al cual en adelante se
5 hará referencia algunas veces nada más que como "ADN") que comprende un polinucleótido que está constituido por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ
10 ID No: 4, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 12, y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en
15 la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22; y (b) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23. El ADN objetivo de la presente invención no
20 está limitado solamente al ADN que codifica la UDP-glucuronosiltransferasa descrita anteriormente sino que también incluye otros ADN que codifican una proteína funcionalmente equivalente a esta proteína. La proteína funcionalmente equivalente es, por ejemplo, (c) una proteína que está
25 constituida por una secuencia de aminoácidos con eliminación, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 15 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y que tiene

actividad de UDP-glucuronosiltransferasa. Tal proteína incluye una proteína que está constituida por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23 en donde 1 a 15, 1 a 14, 1 a 13, 1 a 12, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6 (1 a varios), 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 aminoácido(s) es/son suprimido(s), sustituido(s), insertado(s) y/o adicionado(s) y que tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa. En general, el número de eliminaciones, sustituciones, inserciones, y/o adiciones es preferiblemente más pequeño. Tales proteínas incluyen una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de aproximadamente el 80% o más alta, el 81% o más alta, el 82% o más alta, el 83% o más alta, el 84% o más alta, el 85% o más alta, el 86% o más alta, el 87% o más alta, el 88% o más alta, el 89% o más alta, el 90% o más alta, el 91% o más alta, el 92% o más alta, el 93% o más alta, el 94% o más alta, el 95% o más alta, el 96% o más alta, el 97% o más alta, el 98% o más alta, el 99% o más alta, el 99.1% o más alta, el 99.2% o más alta, el 99.3% o más alta, el 99.4% o más alta, el 99.5% o más alta, el 99.6% o más alta, el 99.7% o más alta, el 99.8% o más alta, o el 99.9% o más alta, con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y que tiene la actividad de UDP-glucuronosiltransferasa. Como el porcentaje de homología descrito anteriormente es más alto, esta proteína se prefiere por lo general.

Según se emplea aquí, el término " actividad de UDP-glucuronosiltransferasa" se refiere a una actividad de

canalización de la reacción que implica la glucuronidación de los grupos hidroxilo en flavonoides, estilbenos, lignanos, etc. (glucuronidación de, e.g., una flavona en la posición 7-OH) para formar glucurónidos.

5 La actividad de UDP-glucuronosiltransferasa puede analizarse por reacción, por ejemplo, de ácido UDP-glucurónico con un sustrato aceptor de glicosil (e.g., una flavona) en presencia de una enzima a ser probada y analizando el producto de la reacción por HPLC (cf., EJEMPLOS descritos adelante para
10 más detalles).

La presente invención incluye además (e) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que hibridiza bajo condiciones estrictas con un polinucleótido que está constituido por una secuencia de nucleótidos
15 complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos
20 representada por la SEQ ID NO: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 12, y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 22, y tiene
25 actividad de UDP-glucuronosiltransferasa; y (f) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que hibridiza bajo condiciones estrictas con un polinucleótido que está constituido por una secuencia de

nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica una proteína que está constituida por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y tiene la actividad de UDP-glucuronosiltransferasa.

Según se emplea aquí, el "polinucleótido" se refiere a un ADN o ARN.

Según se emplea aquí, el término "polinucleótido que hibrida bajo condiciones estrictas" se refiere a, por ejemplo, un polinucleótido obtenido por hibridación en colonias, hibridación en placa, hibridación Southern o similares, empleando como sonda todo o parte de un polinucleótido que está constituido por una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID No: 12, y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22 o un polinucleótido que está constituido por una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID NOs: 5, 11, 13 y 23. El método de hibridación puede ser un método

descrito en, por ejemplo, Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997, etc.

- 5 Según se emplea aquí, las "condiciones estrictas" pueden ser cualesquiera entre condiciones estrictas baja, condiciones de estrictas media o condiciones de estrictas alta. Las "condiciones de estrictas baja" son, por ejemplo, solución de Denhardt 5x SSC, 5x, SDS al 0.5%, formamida al 50% y 32°C. Las
- 10 "condiciones de estrictas media" son, por ejemplo, solución de Denhardt 5x SSC, 5x, SDS al 0.5%, formamida al 50% y 42°C. Las "condiciones de estrictas alta" son, por ejemplo, solución de Denhardt 5x SSC, 5x, SDS al 0.5%, formamida al 50% y 50°C. Bajo estas condiciones, a medida que la temperatura es más alta, se
- 15 espera obtener más eficientemente un ADN con homología más alta a la temperatura más alta, aunque en la estrictas de la hibridación se involucran múltiples factores incluyendo temperatura, concentración de la sonda, longitud de la sonda, fuerza iónica, tiempo, concentración de sal y similares.
- 20 Quienes tienen experiencia en la técnica pueden obtener estrictas similar por selección adecuada de estos factores.

Cuando se emplea un equipo disponible comercialmente para la hibridación, puede usarse, por ejemplo, Alkphos Direct Labeling Reagents (producido por Amersham Pharmacia). En este

25 caso, de acuerdo con el protocolo anexo, se incuba una membrana con una sonda marcada durante la noche, la membrana se lava con un búfer para lavado primario que contiene SDS al 0.1% (p/v) a 55°C y entonces puede detectarse el ADN híbrido.

Otros polinucleótidos que pueden hibridarse incluyen los ADN que tienen una homología aproximadamente del 60% o más alta, aproximadamente del 70% o más alta, del 71% o más alta, del 72% o más alta, del 73% o más alta, del 74% o más alta, 75% o más alta, 76% o más alta, 77% o más alta, 78% o más alta, del 79% o más alta, del 80% o más alta, del 81% o más alta, del 82% o más alta, del 83% o más alta, del 84% o más alta, del 85% o más alta, del 86% o más alta, del 87% o más alta, del 88% o más alta, del 89% o más alta, del 90% o más alta, del 91% o más alta, del 92% o más alta, del 93% o más alta, 94% o más alta, 95% o más alta, 96% o más alta, 97% o más alta, del 98% o más alta, del 99% o más alta, del 99.1% o más alta, del 99.2% o más alta, del 99.3% o más alta, del 99.4% o más alta, del 99.5% o más alta, del 99.6% o más alta, del 99.7% o más alta, del 99.8% o más alta o del 99.9% o más alta, con un ADN que codifica una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID No: 12 y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22, o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID N°s: 5, 11, 13 y 13, calculadas con un software para búsqueda de homología, tal como FASTA y BLAST usando los parámetros preestablecidos.

La homología entre secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos puede determinarse empleando el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873, 1993). Se han desarrollado los programas denominados ELASTN y ELASTY con base en el algoritmo ELAST (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol., 215: 403, 1990). Cuando se emplea ELASTN para la secuenciación de una secuencia de nucleótidos, los parámetros son, por ejemplo, puntaje = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando se emplea ELASTY para la secuenciación de una secuencia de aminoácidos, los parámetros son, por ejemplo, puntaje = 50 y longitud de palabra = 3. Cuando se usan los programas ELAST y Gapped ELAST, se emplean parámetros predeterminados para cada uno de los programas.

El polinucleótido de la invención descrito anteriormente puede obtenerse por medios conocidos en ingeniería genética o por medios conocidos para síntesis.

2. Proteína de la invención

En una modalidad adicional, la presente invención también proporciona la proteína codificada por cualquiera de los polinucleótidos (a) a (f) descritos anteriormente. La proteína de la invención que se prefiere es una proteína que está constituida por una secuencia de aminoácidos con eliminación, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 15 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y que tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa. Tal proteína incluye una proteína que está constituida por una secuencia de

aminoácidos en donde los residuos de aminoácidos con el número descrito anteriormente son eliminados, sustituidos, insertados y/o adicionados en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23 y que tiene la actividad de UDP-glucuronosiltransferasa. La proteína incluye también una proteína que tiene secuencia de aminoácidos que tiene la homología descrita anteriormente con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23 y que tiene la actividad de UDP-glucuronosiltransferasa. Estas proteínas pueden obtenerse por el empleo de mutagénesis dirigida al sitio descrita en Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997, Nuc. Acids Res., 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nuc. Acids Res., 13, 4431 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985), etc.

La eliminación, sustitución, inserción y/o adición de uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de la proteína de la invención significa que uno o una pluralidad de residuos de aminoácidos son eliminados, sustituidos, insertados y/o adicionados en una o una pluralidad de posiciones en la misma secuencia de aminoácidos. Pueden ocurrir dos o más clases de eliminación, sustitución, inserción y adición concurrentemente.

Ejemplos de residuos de aminoácido que son sustituibles mutuamente se dan a continuación. Los residuos de aminoácidos

en el mismo grupo son sustituibles mutuamente.

Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, o-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina y
5 ciclohexilalanina; Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isocaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico y ácido 2-aminosubérico; Grupo C: asparagina y glutamina; Grupo
D: lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico y ácido 2,3-diaminopropionico; Grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina
10 y 4-hidroxiprolina; Grupo F: serina, treonina y homoserina; y Grupo G: fenilalanina y tirosina.

La proteína de la presente invención puede también ser producida por métodos para síntesis química tales como el método Fmoc (método del fluorenilmetiloxycarbonilo) y el
15 método tBoc (método del t-butiloxycarbonilo). Adicionalmente, pueden emplearse también para la síntesis química sintetizadores para péptidos disponibles en Advanced ChemTech, Perkin Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corp., etc.

20 En esta, la proteína de la invención es una UDP-glucuronosiltransferasa. La denominada "UDP-glucuronosiltransferasa" cataliza la reacción de transferencia del grupo glucuronilo del ácido UDP-glucurónico como donador de glicosil sobre un sustrato aceptor de glicosil para formar el
25 glucurónido y UDP. En la presente invención, el sustrato aceptor de glicosil es, por ejemplo, un flavonoide, un estilbeno y un lignano.

El flavonoide incluye flavonas, flavonoles, flavanonas,

isoflavonas, C-glicósidos de flavonas, auronas, catequinas, y similares. Entre estos, ejemplos de las flavonas incluyen baicaleina, escutelsonina, apigenina, luteolina, tricetina, diosmetina, criseriol, etc. Ejemplos de los flavonoles
5 incluyen quercetina, miricetina, camferol, etc. Un ejemplo de las flavanonas es naringenina. Ejemplos de las isoflavonas son genisteina, daidzeina y formononetina. Ejemplos de los C-glicósidos de flavona incluyen vitexina, isovitexina y orientina. Un ejemplo de las auronas es aureusidina. Ejemplos
10 de las catequinas son catequina y galato de epigallocatequina.

El estilbeno incluye resveratrol y su piceido glicósido, etc.

El lignano incluye (+)-pinoresinol, (+)-piperitol, (+)-sesaminol, (+)-secoisolariciresinol, (+)-sesamin catecol 1)
15 (SC1), (+)-sesamin catecol 2 (SC2), (+)-episesamin catecol 2 (EC2), matairesinol, etc.

Por ejemplo, la UDP-glucuronosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 5 (PfUGT50) muestra la actividad cuando el sustrato aceptor de glicosil es un
20 flavonoide tal como baicaleina, apigenina, escutelareina, luteolina, tricetina, diosmetina, crisoeriol, quercetina, miricetina, camferol, naringenina, aureusidina, etc., un estilbeno tal como resveratrol, etc., un lignano tal como SC1, etc., y muestra una potente actividad en comparación con otros
25 sustratos aceptores de glicosil, especialmente cuando el sustrato aceptor de glicosil es baicaleina, apigenina, escutelsonina, luteolina, tricetina, diosmetina, crisoeriol, quercetina y aureusidina.

La UDP-glucuronosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 (SLUGT) muestra la actividad cuando el sustrato aceptor de glicosil es un flavonoide tal como baicaleina, apigenina, escutelareina, luteolina, tricetina, diosmetina, crisoeriol, quercetina, camferol, naringenina, genisteina, daidzeina, formononetina, miricetina, etc., una cumarina tal como esculetin, etc., un estilbeno tal como resveratrol, etc., un lignano tal como SC1, SC2, EC2, etc., y muestra una potente actividad en comparación con otros sustratos aceptores de glicosil, especialmente cuando el sustrato aceptor de glicosil es baicaleina y apigenina.

La UDP-glucuronosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 13 (AmUGTcg10) muestra la actividad cuando el sustrato aceptor de glicosil es un flavonoide tal como baicaleina, apigenina, escutelsonina, luteolina, tricetina, diosmetina, crisoeriol, quercetina, camferol, naringenina, aureusidina, etc., un estilbeno tal como resveratrol, etc., y muestra una potente actividad en comparación con otros sustratos aceptores de glicosil, especialmente cuando el sustrato aceptor de glicosil es un flavonoide tal como baicaleina, apigenina, escutelareina, luteolina, tricetina, diosmetina, crisoeriol, camferol, naringenina, etc.

La UDP-glucuronosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 23 (SiUGT23) muestra la actividad cuando el sustrato aceptor de glicosil es un flavonoide tal como baicaleina, apigenina, escutelareina, luteolina, tricetina, diosmetina, crisoeriol, isovitexina, quercetina,

camferol, naringenina, aureusidina, formononetina, etc., una
cumarina tal como esculetina, etc., un estilbeno tal como
resveratrol, etc., y muestra una potente actividad en
comparación con otros sustratos aceptores de glicosil,
5 especialmente cuando el sustrato aceptor de glicosil es un
flavonoide tal como baicaleina, escutelareina, luteolina,
tricetina, camferol, aureusidina, etc.

3. Vector y transformador portador del mismo

En otra modalidad, La presente invención proporciona el
10 vector de expresión que comprende el polinucleótido de la
presente invención. El vector de la invención comprende
cualquiera de (a) a (f) descritos anteriormente.
Preferiblemente, el vector de expresión de la invención
comprende cualquiera de los polinucleótidos (g) a (j). Más
15 preferiblemente, el vector de expresión de la invención
comprende un polinucleótido que comprende un polinucleótido
seleccionado del grupo que está constituido por un
polinucleótido que está constituido por la secuencia de
nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de
20 nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4, un polinucleótido
que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las
posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada
por la SEQ ID No: 10, un polinucleótido que está constituido
por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en
25 la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 12 y
un polinucleótido que está constituido por la secuencia de
nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de
nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 22, o un

polinucleótido seleccionado del grupo que está constituido por un polinucleótido que codifica una proteína que está constituido por la secuencia de aminoácidos of SEQ ID No: 5, un polinucleótido que codifica una proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 11, un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 13 y un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 23.

10 El vector de la invención se construye generalmente para que contenga una casete de expresión que comprende (i) un promotor que puede transcribirse en una célula huésped, (ii) cualquiera de los polinucleótidos descritos anteriormente en (a) a (j) que está ligado al promotor, y (iii) una señal que
15 funciona en la célula huésped con respecto a la terminación de la transcripción y la poliadenilación de la molécula de APN. El vector así construido se introduce en una célula huésped. Para construir el vector de expresión, se emplean métodos que usan un plásmido, un fago o un cósmido pero no están limitados
20 particularmente.

Los tipos específicos de vector no están limitados en particular, y pueden seleccionarse adecuadamente vectores capaces de expresar en una célula huésped. Esto es, puede escogerse una secuencia promotora apropiada dependiendo del
25 tipo de la célula huésped para expresar confiablemente el polinucleótido de la invención, y puede emplearse como vector de expresión un vector obtenido por incorporación de esta secuencia y el polinucleótido de la presente invención en

varios plásmidos o similares.

El vector de expresión de la presente invención contiene una región de control de la expresión (por ejemplo, un promotor, un terminador, y/o un origen para replicación, etc.) dependiendo del tipo del huésped a introducir. Un promotor convencional (por ejemplo, promotor *trc*, promotor *tac*, promotor *lac*, etc.) se emplea como promotor para un vector de expresión bacteriano. Como promotor para levadura, se usan, por ejemplo, un promotor de gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa, promotor PH05, etc. Como promotor para hongos se usa, por ejemplo, amilasa, *trpC*, etc. Adicionalmente, se emplea un promotor viral (e.g., promotor temprano SV40, promotor tardío SV40, etc.) como promotor para células huésped derivadas de animal.

El vector de expresión contiene preferiblemente por lo menos un marcador selectivo. El marcador disponible incluye un marcador auxotrófico (*ura5*, *niaD*), un marcador resistente a fármacos (higromicina, zeocina), un marcador resistente a la gentamicina (G418r), un gen resistente al cobre (*CUP1*) (Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 337, 1984), un gen resistente a la cerulenina (*fas2m*, *FDR4*) (Junji Inokoshi et al., Biochemistry, 64, 660, 1992; y Hussain et al., Gene, 101: 149, 1991), y similares.

La presente invención proporciona el transformador en el cual se introduce el polinucleótido descrito anteriormente en cualquiera de (a) a (j).

El método de preparación (método de producción) del transformador no está limitado en particular e incluye, por ejemplo, un método que comprende la introducción del vector

recombinante en un huésped seguida por una transformación. La célula huésped empleada en esta no está limitada particularmente y preferiblemente pueden emplearse varias células conocidas. Ejemplos específicos son: bacterias tales como *Escherichia coli*, etc., levaduras (levadura gemante *Saccharomyces cerevisiae*, levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*), nemátodos (*Caenorhabditis elegans*), oocito de la rana Africana con uñas (*Xenopus laevis*), etc. Los medios de cultivo y las condiciones apropiadas para las anteriores células huésped son bien conocidos en la técnica. El organismo a transformar no está limitado en particular, e incluye varios microorganismos, plantas y animales mencionados anteriormente como ejemplos de células huésped.

Para la transformación de la célula huésped, se pueden emplear varios métodos de conocimiento general. Por ejemplo, métodos que pueden emplearse incluyen, pero no están limitados a: el método de electroporación (Mackenzie D. A. et al., Appl. Environ. Microbiol., 66, 4655-4661, 2000), el método de liberación de partículas (método descrito en JPA 2005-287403 "Method of Breeding Lipid-Producing Fungus"), el método del esferoplasto (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978)), el método del acetato de litio (J. Bacteriology, 153: 163 (1983)), y métodos descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978), Methods in yeast genetics, 2000 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, etc.

4. Método de producción de la proteína de la invención

En aún otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de la proteína de la presente invención

empleando los transformadores descritos anteriormente.

Específicamente, la proteína de la invención puede obtenerse por aislamiento y purificación de la proteína de la invención a partir del cultivo del transformador descrito anteriormente. Según se emplea aquí, el cultivo se refiere a cualquiera entre caldo de cultivo, bacterias cultivadas o células cultivadas, y el homogeneizado de bacterias cultivadas o células cultivadas. Pueden emplearse métodos convencionales para aislar y purificar la proteína de la invención.

Específicamente, cuando la proteína de la invención se acumula entre bacterias cultivadas o entre células cultivadas, puede obtenerse un extracto crudo de la proteína de la invención cultivando las bacterias o las células, con posterior interrupción de las bacterias o células mediante una técnica convencional (e.g., ultrasonido, lisozimas, congelamiento y descongelamiento, etc.) y aplicando un método convencional tal como centrifugación o filtración. Cuando la proteína de la invención se acumula en el caldo de cultivo, el sobrenadante del cultivo que contiene la proteína de la invención puede obtenerse, después de concluida la incubación, por separación de las bacterias o células del sobrenadante del cultivo de una manera convencional (e.g., centrifugación, filtración, etc.).

La purificación de la proteína de la invención contenida en el extracto o el sobrenadante del cultivo obtenido como se describió anteriormente puede efectuarse por un método convencional de separación y purificación. Los métodos de separación y purificación incluyendo precipitación con sulfato

de amonio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa, diálisis, y ultrafiltración, etc. pueden emplearse solos o en una
5 combinación adecuada.

5. Método de producción del glucurónido

La presente invención proporciona además un método de producción del glucurónido empleando la proteína de la presente invención. La proteína de la invención cataliza la reacción de
10 transferencia del ácido glucurónico del ácido UDP-glucurónico a un sustrato aceptor de glicosil (e.g., un flavonoide, un estilbano o a lignano) y por lo tanto, el glucurónido puede producirse a partir del sustrato aceptor de glicosil y ácido UDP-glucurónico empleando la proteína de la invención. El
15 sustrato aceptor de glicosil es preferiblemente un flavonoide.

El glucurónido puede producirse, por ejemplo, preparando una solución que contiene 1 mM de sustrato aceptor de glicosil, 2 mM de ácido UDP-glucurónico, 50 mM de búfer de fosfato de calcio (pH 7.5) y se preparan 20 μ M de la proteína de la
20 invención y se dejan reaccionar a 30°C durante 30 minutos. El glucurónido puede aislarse/purificarse a partir de esta solución por métodos conocidos. Específicamente, e.g., precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alta
25 resolución en fase reversa, diálisis, ultrafiltración, etc. pueden emplearse solos o en una combinación adecuada.

El glucurónido así obtenido es útil como reactivo para

inspeccionar las funciones in vivo, un antioxidante, etc. (Gao, Z., Huang, K., Yang, X., y Xu, H. (1999) Biochimica et Biophysica Acta, 1472, 643-650).

La presente invención se describe más detalladamente con referencia a los EJEMPLOS a continuación pero no se considera limitada a ellos.

EJEMPLO 1

1. Resumen del EJEMPLO 1

En este EJEMPLO se clonó por PCR el gen homólogo Sb7GAT (SLUGT) de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y usando este gen como una sonda, se intentó aislar la 7-glucuronosiltransferasa del flavonoide a partir de la biblioteca del cADN de la *Perilla frutescens*, una variedad de hoja roja, la cual acumula el 7-glucurónido del flavonoide.

Como resultado de tamizado, el PfUGT50, que tiene la actividad para transferir el ácido glucurónico al grupo 7-hidroxil de una flavona, fue identificado en el PfUGT de la glicosiltransferasa derivada de la *Perilla frutescens*, una variedad de hoja roja. Este PfUGT50 tuvo la actividad de transferencia del glucuronosilo no solo a las flavonas tales como baicaleina, escutelareina, apigenina, luteolina, etc., sino también a la quercetina que es un flavonol. Por consiguiente, el uso de PfUGT50 habilita la glucuronidación in vivo de varios flavonoides en la posición 7, incluyendo las flavonas.

Asimismo, el SLUGT derivado de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* que fue aislado como una sonda de

tamizado, mostró la actividad de transferencia del glucuronosilo a varios flavonoides. También se buscó en la Scrophulariaceae *Antirrhinum majus* una UGT (UDP-glucuronosiltransferasa) altamente homóloga del PfUGT50 y del
5 SlUGT para identificar el AmUGTog10 como UGT del *Antirrhinum majus*. La proteína de AmUGTog10 expresada en la *Escherichia coli* la cual es UGT derivada del *Antirrhinum majus*, mostró la actividad de transferencia del glucuronosilo a la apigenina, a la quercetina y a la naringenina. Por lo tanto se mostró que el
10 PfUGT50 de la *Perilla frutescens*, una variedad de hoja roja, el SlUGT de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y el AmUGTog10 del *Antirrhinum majus* anteriormente descritos tienen la actividad para transferir el ácido 7-glucurónico de los flavonoides.

15 2. Aislamiento del gen de la glucosiltransferasa a partir de la biblioteca del cADN de la *Perilla frutescens*

(1) Preparación de la sonda

El método biológico molecular usado en este EJEMPLO estuvo de acuerdo con el método descrito en Clonación Molecular (Sambrook
20 et al, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001), a menos que, en detalle, se indique de otro modo.

Después de extraer totalmente el APN de la raíz de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* usando el RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), se empleó el SuperScript™ First-Strand
25 Synthesis System para la RT-PCR (Invitrogen Corp.) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante para sintetizar el cADN a partir de 1 µg del total del APN. Con base en la secuencia del sb7GAT de la *Scutellaria baicalensis* (Acceso No.

AB042277 al GenBank), se diseñaron el cebador Fw (SEQ ID NO: 1) y el cebador Fv (SEQ ID NO: 2). Usando los cebadores, se realizó la PCR usando como patrón el cADN de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*.

5 SEQ ID NO: 1: SLUGT-Fw: 5'-AAACATATGGCGGTGCTGGCGAAGTTC-3' (El subrayado es el sitio NdeI)

SEQ ID NO: 2: SLUGT-Fv: 5'-TTTTGATCATTAAATCCCGAGTGGCGTGAAG-3' (el subrayado es el sitio BclI)

Específicamente, la solución para la PCR (50 µl) estaba
10 compuesta por 1 µl de cADN (*Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*), 1 x búfer de Taq (TaKaRa), 0,2 mM de dNTPs, 0,4 pmol de cada uno de los cebadores (SEQ ID Nos 1 y 2) y 2,5U de polimerasa rTaq. La PCR se realizó por reacción a 94°C durante 3 minutos y posterior ampliación a 30 ciclos con cada ciclo
15 consistiendo en la reacción a 94°C por un minuto, a 53°C por un minuto y a 72°C por 2 minutos.

El fragmento aumentado fue insertado en el sitio de multiclonación del vector pCR-TOPOII (Invitrogen), y la secuencia del nucleótido del segmento insertado se determinó
20 por el método del cebador ambulatorio usando un cebador de oligonucleótido sintético con el secuenciador para ADN Modelo 3100 (Applied Biosystems). Como un resultado del análisis de la secuencia del nucleótido obtenido por el programa CLUSTAL-W (Programa de computador MACVECTOR 7.2.2, Accelry Corporation),
25 se confirmó que se obtuvo la secuencia parcial (SED ID No:3) de UGT de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* altamente homóloga a la *Scutellaria baicalensis*. Esta UGT de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* se usó como modelo

para la sonda de tamizado en la forma de la secuencia parcial SLUGT.

El fragmento obtenido por RT-PCR fue rotulado usando el sistema de Detección de Ácido DIG-Nucleico Sin Radioisótopo (Roche Diagnostics) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Específicamente, la solución para la PCR (50 μ l) estaba compuesta de 1 μ l de cada cADN, 1 x búfer Taq (TaqRa), 0,2 mM de dNTPs, 0,4 pmol cada μ l de los cebadores (SEQ ID Nos: 1 y 2) y 2,5U de polimerasa rTaq. La PCR se llevó a cabo por reacción a 94°C durante 5 minutos y posterior ampliación a 30 ciclos consistiendo cada ciclo de la reacción a 94°C por un minuto, a 53°C por un minuto y a 72°C por 2 minutos. Después de que se confirmó el fragmento SLUGT por electroforesis en agarosa, este fragmento con rotulación DIG se usó para el siguiente experimento como una sonda para la hibridación.

(2) Hibridación

Usando la sonda SLUGT descrita anteriormente, la biblioteca de cADN derivada de la *Perilla frutescens* (especie: aka-chirimen-jiso o perilla de hojas rojas) (Yonekura-Sakakibara, K. et al., Plant Cell Physiol. 41, 495-502. 2000) fue tamizada usando el sistema de Detección de Ácido DIG-Nucleico Sin Radioisótopo (Roche Diagnostics) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

Se usó un búfer para hibridación (5 x SSC, 30% de formamida, 50mM de búfer de fosfato de sodio (pH 7,0) 1% de SDS, 2% de reactivo bloqueador (Roche), 0,1% de lauroilsarcosina y 80g/ml de ADN de esperma de salmón) para la

prehibridación a 40°C por una hora y después se añadió la sonda desnaturalizada seguida por la incubación durante la noche. Se enjuagó la membrana en 4 x el búfer de lavado SSC que contenía 1% de SDS a 58°C durante 30 minutos. Se examinaron
5 aproximadamente 1×10^6 placas pfu para obtener 300 clones positivos.

(3) Identificación de Genes

Los clones positivos fueron purificados en una sola placa por tamizado secundario. Usando un par de cebadores de M13EV y
10 M13M4 (20 20), el fragmento insertado se amplió para determinar la secuencia del ADN de la parte insertada. Usando la secuencia putativa de aminoácidos deducida con base en la secuencia del ADN determinada, se efectuó una búsqueda en la base de datos, por Blast x, para obtener la UGT de la perilla
15 (pfUGT50) que tenía alta homología con el SlUGT y el sb7GAT (SEQ ID Nos: 4 y 5).

El resultado del análisis sobre la longitud total obtenida para pfUGT50, SlUGT y sb7GAT con el programa CLUSTAL-W (Programa de computador MACVECTOR 7.2.2, Accelry Corporation)
20 fue una indicación firme de que tanto el SlUGT como el sb7GAT eran de ORF incompleto (marco de lectura abierto) faltando las regiones 3' y 5'. Así, se realizó la ampliación rápida del extremo del cADN (de aquí en adelante RACE) usando un Gene Racer Kit (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo recomendado
25 por el fabricante para ampliar las regiones 5' y 3' del SlUGT. Para RACE, se usaron los siguientes grupos de cebadores específicos para cada gen SlUGT: (SEQ ID Nos: 6 a 9).

SEQ ID NO: 6: GR-SlUGT-Rv:

5'-TGG GAG GCA AAC CAG GGA TCT CGA CAA

SEQ ID NO: 7: SLUGT-nest-Rv:

5'-AAT CAT CCA AAT CTT TAA GGT

SEQ ID NO: 8: GR-SLUGT-Fw:

5 5'-AGA AGG GGT GTG TTC TCC GCT GAG CAA

SEQ ID NO: 9: SLUGT-nest-Fw:

5'-GAA CAG CGG TCA CAG ATT TCT

Las secuencias de nucleótidos de los respectivos productos
ampliados se determinaron por el método del cebador ambulatorio
10 usando cebadores de oligonucleótido sintéticos para obtener el
gen SLUGT que incluye la longitud total del ORF y la secuencia
de aminoácidos (SEQ ID Nos: 10 y 11).

Adicionalmente a la *Perilla frutescens* y la *Scutellaria*
laeteviolacea v. *yakusimensis*, el 7-glucurónido de la
15 apigenina, la cual es una de las flavonas, se reportó también
en la *Scrophulariaceae*, *Antirrhinum majus* (Harborne, J. B.
Phytochemistry, 2, 327-334. 1963). Puesto que el AmUGTcg10 de
la glucosiltransferasa del *Antirrhinum majus* de desconocida
funcionalidad representado por las SEQ ID Nos 12 y 13, que
20 fueron previamente aisladas, muestra una alta homología con
pfUGT50 y al SLUGT aislados en este EJEMPLO, el AmUGTcg10 fue
también un gen candidato para análisis de enzimas (Ono, E. et
al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11075-11080. 2006).

En la FIG. 1 se muestran los alineamientos del AmUGTcg10
25 de la *Antirrhinum majus*, del SLUGT de la *Scutellaria*
laeteviolacea v. *yakusimensis* y del PfUGT50 de la *Perilla*
frutescens obtenidas anteriormente. En la FIG. 1, se incluye

también el Sb7GAT de la *Scutellaria baicalensis*.

3. Extracción y purificación de los flavonoides de las hojas de la *Perilla frutescens*

(1) Purificación del 7-glucurónido de la escutelareina

5 Después de moler hasta polvo en nitrógeno líquido 144 g de *Perilla* de hojas verdes (Toyohashi Greenhouse Association en Aichi), correspondientes a 200 hojas, los polvos fueron inmersos en 1.5 l de CH₃CN al 50% y HCOOH al 0,1% durante la noche y luego se filtraron a través de lecho de Celita. El
10 filtrado se concentró a presión reducida. Se cargó el concentrado en 600 ml de CHP-20F y paso a paso se eluyó dos veces cada una con 300 ml de agua, CH₃CN/H₂O al 10, 20, 30, 40 y 50%. Todas las fracciones del 10%-2 al 50%-1 en las cuales se observó elución de polifenoles se concentraron, se congelaron
15 y se secaron, y se sometieron a análisis por HPLC. El rendimiento fue 10%-2 (12,1 mg), 20%-1 (52,2 mg), 20%-2 (122,4 mg), 30%-1 (227,5 mg), 30%-2 (262,8 mg), 40%-1 (632,4 mg), 40%-2 (192,0 mg) y 50%-1 (113,2 mg). La fracción 40%-1 contenía ácido rosmarínico en un estado de alta pureza y todas las otras
20 fracciones contenían flavonas. La fracción 30%-2 se purificó por HPLC preparativa, ver adelante, para dar 16 mg de 7-glucurónido de la escutelareina.

Condiciones para HPLC preparativa

Columna: Develosil C-30-UG5, 20 mm x 250 mm

25 Fase Móvil: A- 0.1% TFA, B- 0.05% TFA/90% CH₃CN

Tasa de Flujo: 6 ml/min.

Gradiente: B20→B60% (100 min), B60% iso (20 min)

Detectado: A280 nm

(2) Hidrólisis del 7-glucurónido de la escutelareina y purificación de la aglicona

Del 7-glucurónido de la escutelareina obtenido
5 anteriormente en (1), se disolvieron 3 mg en 100 μ l de DMSO y se dividió a la mitad en tubos Falcon de 15 ml. A cada tubo se añadieron 10 ml de H₂O, 2,5 ml de búfer de acetato de Na 0,2M (pH 5.0) y 0,8 ml de β -glucuronidasa/arilsulfatasa (EC3.2.1.31/EC3.1.6.1, Roche Diagnostics GmbH), seguido por la
10 incubación a 37°C por 2 horas. Después de concluida la reacción, la mezcla de la solución se cargó en Sep-Pak-C18 (20 cc). Después del lavado con 20 ml de agua y luego con 20 ml de EtOH al 10% para remover sales y proteínas, la aglicona formada fue eluida con 40 ml de CH₃CN al 80% + TFA al 0,05%. Se
15 concentró el eluato y secó por congelamiento. Esta fracción se purificó por HPLC preparativa para dar 0,4 mg de escutelareina (aglicona).

Condiciones para HPLC preparativa

Columna: Develosil C-30-UG5, 20 mm x 250 mm

20 Fase Móvil: A- 0.1% TFA, E- 0.05% TFA/90% CH₃CN

Tasa de Flujo: 6 ml/min.

Gradiente: B20→B70% (60 min), B70% iso (10 min)

Detectado: A330 nm

4. Expresión de la glucosiltransferasa recombinante de la
25 *Perilla frutescens* y ensayo de su actividad

(1) Construcción del vector de expresión

Los cADN que llevan la ORF de longitud total de la 3 glucosiltransferasas de la PfUGT50 de la *Perilla frutescens*, la SLUGT de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y la AmUGTcg10 de la *Antirrhinum majus*, que tienen una alta
5 homología entre sí, fueron ampliados usando los grupos de cebadores específicos para los respectivos genes (PfUGT50, SEQ ID Nos: 14-15; SLUGT, SEQ ID Nos: 16-17; AmUGTcg10, SEQ ID Nos: 18-19). Los cADN sintetizados usando la totalidad de los ARN extraídos de las hojas de la *Perilla frutescens*, la raíz de la
10 *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y los pétalos de la *Antirrhinum majus* se usaron como modelos, respectivamente.

SEQ ID No: 14: PfUGT50-fw:

5'-AAACATATGGAAGGCGTCATACTTC-3' (el subrayado es el sitio NdeI)

15 SEQ ID No: 15: PfUGT50-rv: 5'-

TTTGTGATCATTAATCAGAGTTACGGAATC-3' (el subrayado es el sitio BclI)

SEQ ID No: 16: SLUGT-fw:

5'-AAACATATGGAGGACACGATTGTTATC-3' (el subrayado es el
20 sitio NdeI)

SEQ ID No: 17: SLUGT-rv:

5'-TTCATATGTCAATCCCTCGTGGCCAGAAG-3' (el subrayado es el sitio NdeI)

SEQ ID No: 18: AmUGTcg10-fw:

25 5'-AAACATATGGAGGACACTATCGTTCTC-3' (el subrayado es el sitio NdeI)

SEQ ID No: 19: AmUGTcg10-rv:

5'-TTGGATCCTTAAGAAACCACCATATCAAC-3' (el subrayado es el sitio BamHI)

Se llevó a cabo la PCR (KOD -Plus-, TOYOBO), después de la
5 reacción a 94°C por 2 minutos, por la repetición de 35 ciclos
cada uno consistiendo de la reacción a 94°C por 15 segundos, a
50°C por 30 segundos y 68°C por 1,5 minutos. Los fragmentos de
ADN ampliados fueron subclonados en el vector pCF-Blunt II-TOPO
(Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen) y la secuencia
10 del nucleótido se confirmó por un ABI 3100 Avant (Applied
Biosystems). Con respecto al PfUGT50, se obtuvo el plásmido no
metilado por la transformación de las cepas positivas
obtenidas. Los plásmidos obtenidos fueron sometidos a digestión
con NdeI y PciI en el caso del PfUGT50, con NdeI en el SlUGT y
15 con NdeI y BamHI en el AmUGTcg10, respectivamente. Los
fragmentos resultantes de ADN de cerca de 1,5 kb fueron ligados
en el pET-15 sometido a digestión con NdeI y BamHI en el caso
del PfUGT50 y el AmUGTcg10 y con NdeI en el caso del SlUGT.

(2) Cultivo de Escherichia coli recombinante y
20 purificación de la proteína

La Escherichia coli BL21 (DE3) se transformó con cada
plásmido obtenido anteriormente en 4-(1). El transformador
obtenido se cultivó en agitación durante la noche a 37°C en 4
ml de medio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de
25 levadura, 1 g/l de NaCl) suplementado con 50 µg/ml de
ampicilina. El caldo del cultivo, 4 ml, el cual alcanzó la fase
estacionaria, fue inoculado con 80 ml del medio con la misma
composición, seguido por el cultivo en agitación a 37°C.

Cuando la turbidez de las células (OD_{600}) alcanzó aproximadamente 0,5; se añadió al medio IPTG (isopropil- β -tiogalactopiranosido) en concentración final de 0,4 mM, seguido por el cultivo en agitación a 22°C por 20 horas. Todos los procedimientos subsecuentes se realizaron a 4°C. Los transformadores cultivados se centrifugaron (7000 x g, 15 minutos) para recolectar las células y se añadieron 2 ml/g de búfer para células S (búfer de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4), imidazol 20 mM, NaCl 0,5 M, β -mercaptoetanol 14 mM) a las células para suspenderlas. Subsecuentemente se realizó ultrasonificación (15 segundos x 3) seguida por centrifugación (15000 x g, 10 minutos). Al sobrenadante obtenido se añadió polietilenimina al 0,12% (p/v) en concentración final para suspender las células, a las cuales, después, se les permitió reposar por 30 minutos. La mezcla fue centrifugada (15000 x g 10 minutos) y el sobrenadante fue recuperado como una solución de enzimas cruda. La solución de enzimas cruda se aplicó al His SpinTrap (GE Healthcare), que había sido equilibrado con Búfer S, y centrifugado (70 x g, 30 segundos). Después de lavar con 600 μ l de búfer S, la proteína retenida en la columna fue eluida paso a paso con 600 μ l cada uno de Búfer S que contenía 100, 200 y 500 mM de imidazol. El búfer en cada fracción eluida fue reemplazado por búfer de fosfato de potasio 20 mM (pH 7,5) que contenía 14 mM de β -mercaptoetanol usando Microcon YM-30 (Amicon). Como resultado del análisis SDS-PAGE, se confirmó la proteína del tamaño previsto en las fracciones eluidas con 100 mM y 200 mM de imidazol. Las proteínas objetivo no fueron únicas en estas fracciones.

(3) Reacción de las enzimas y condiciones para el análisis por HPLC

Las condiciones estándar de la reacción son como sigue. Se preparó una solución de reacción (ácido UDP-glucurónico 2 mM, sustrato aceptor de glicosilo 100 μ M, búfer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.5), solución de enzimas), 50 μ M, y se añadió la solución de enzimas para iniciar la reacción a 30°C por 30 minutos. Se suspendió la reacción por la adición de 50 μ M de TFA al 0,5% en CH₃CN y se la dispuso para el análisis por HPLC. Las condiciones para la HPLC son como sigue: columna, Develosil C30-UG-5 (4,6 x 150 mm); eluyente A, TFA al 0.1%/H₂O; eluyente E, TFA al 0.08%/ CH₃CN al 90%; condiciones para la elución A (excepto para aurona, catequina, cumarina y fenilpropanoide), 0 min/ E al 5% → 18 min/ eluyente E al 100% → 18.1 min/E al 5% → 25 min/5% B; condiciones para la elución B (aurona, catequina, cumarina y fenilpropanoide), 0 min/E al 5% → 20 min/ eluyente E al 50% → 20.5 min/E al 5% → 25 min/E al 5%; tasa de flujo, 1 ml/min; longitud de onda de detección: 280 y 350 nm. Se muestran más adelante las respectivas caracterizaciones y resultados.

Análisis de la especificidad del sustrato aceptor de glicosilo

De acuerdo con el método descrito anteriormente se analizó la especificidad de varios sustratos aceptores del glicosilo (Figuras 2 a 4).

La figura 2 muestra los resultados del análisis sobre la especificidad de los sustratos aceptores del glicosilo para el PfUGT50. En la Fig. 2, se muestra la actividad relativa de cada

sustrato, tomando la actividad a la escutelareina como 100%. Como un resultado del análisis, el PfUGT50 mostró la más alta actividad a la escutelareina y reaccionó bien con las flavonas diferentes a las glicosidas (baicaleina (actividad relativa a escutelareina, 73%), apigenina (44%), luteolina (41%), tricetina (87.9%), diosmetina (62%) y criscoeriol (18%)). Además, el PfUGT50 mostró actividad también a los flavonoles (quercetina (26%), miricetina (9%) y camferol (3%)) y a las flavanonas (naringenina (3%)) y (aureusidina (40%)). Sin embargo el PfUGT50 no mostró actividad a los C-glicósidos de flavona (vitexina, isovitexina y orientina), a las isoflavonas (genisteina, daidzeina y formononetina), a las catequinas (catequina y galato de epigallocatequina), a las cumarinas (esculetina) y a los fenilpropanoides (alcohol coniferílico). En la HPLC, los productos de reacción de la escutelareina, baicaleina, apigenina y quercetina coincidieron en términos del tiempo de retención con los productos 7-glucuronosilados respectivos.

La FIG. 3 muestra los resultados del análisis sobre la especificidad de los sustratos aceptores de glicosilo para el SLUGT. En la FIG. 3 se muestra la actividad relativa de cada sustrato, tomando la actividad a la escutelareina como 100%. Como resultado del análisis el SLUGT mostró la más alta actividad a la escutelareina pero las más bajas actividades a las flavonas (apigenina (3%), luteolina (0.6%), tricetina (1.1%), diosmetina (0.3%), criscoeriol (0.02%)) diferentes a la baicaleina (actividad relativa a la escutelareina, 63%). Fueron bajas las actividades a flavonoles (quercetina (1%),

camferol (14%)), flavanonas (naringenina (6%)), isoflavonas (genisteina (1%), daidzeina (0.3%) y formononetina (0.08%)) y coumarinas (esculetina (0.3%)). El SLUGT no mostró actividad sobre los C-glicósidos de flavona (vitexina, isovitexina y orientina), las auronas (aureusidina), las catequinas (catequina y galato de epigallocatequina) o los fenilpropanoides (alcohol coniferílico). En otras palabras se indicó que la modificación de la posición orto de la posición 7 de los flavonoides sería importante para la actividad del SLUGT. En la HPLC, los productos de reacción de la escutelareina, baicaleina y apigenina coinciden en términos de tiempo de retención con los respectivos productos 7-glucuronosilados. Por otra parte, se detectaron pluralidades de productos con quercetina y uno de ellos coincidió en términos de tiempo de retención con el producto 7-glucuronosilado.

La FIG. 4 muestra los resultados de los análisis de especificidad de los sustratos aceptores de glicosilo para el AmUGTog10. En la FIG. 4, se muestra la actividad relativa para cada sustrato, tomando la actividad a la escutelareina como 100%. Como un resultado del análisis el AmUGTog10 mostró la máxima actividad a la escutelareina y también reaccionó con las flavonas diferentes a los glicósidos (baicaleina (actividad relativa a escutelareina, 22%), apigenina (40%), luteolina (34%), tricetina (23.8%), diosmetina (26%) y cristerirola (18%)). El AmUGTog10 también mostró actividades a los flavonoles (quercetina (4%) y camferol (23%)), a las flavanonas (naringenina (15%)) y a las auronas (aureusidina (2%)). Sin embargo, el AmUGTog10 no mostró actividad a los C-

glicósidos de flavona (vitexina, isovitexina y orientina), a las isoflavonas (genisteina, daidzeina y formononetina), a las catequinas (catequina y galato de epigallocatequina), a las cumarinas (esculetina) y a los fenilpropanoides (alcohol coniferílico). En la HPLC, los productos de la reacción de escutelareina, baicaleina, apigenina y quercetina coincidían en términos de tiempo de retención con los respectivos productos 7-glucuronosilados.

Los resultados anteriores revelan que el PfUGT50 y el AmUGTcg10 muestran una especificidad baja, mientras el SLUGT mostró una especificidad alta, a los flavonoides tales como las flavonas, etc. Los resultados muestran, además, que el PfUGT50 derivado de la *Perilla frutescens* muestra una especificidad particularmente baja, i.e., es una enzima con un rango más amplio de especificidad al sustrato.

Análisis de especificidad del sustrato donante de glicosilo

Usando la apigenina como un sustrato aceptor de glicosilo, se analizó la especificidad a varios donantes de glicosilo con activación UPD. Como resultado, el PfUGT50, el SLUGT y el AmUGTcg10 mostraron la actividad solamente al ácido UPD-glucurónico pero no mostraron actividad sobre UPD-glucosa y sobre UPD-galactosa.

Los resultados anteriores revelan que esas enzimas son 7-glucuronosiltransferasas altamente específicas para las flavonas (7-glucuronosiltransferasa de flavona).

Análisis de las características de pH y de temperatura

Se analizó la estabilidad a la temperatura como sigue. Se

trató una solución de enzimas de 15 a 55°C durante una hora y luego se enfrió a 4°C. Usando la muestra enfriada, se determinó la actividad residual en condiciones estándar de reacción. Después, se añadió a la solución enzimática, a concentración final de 167 mM, una solución búfer (pH 4, 4.5, 5, Acetato-NaOH; pH 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, NaH₂PO₄-NaOH; pH 8, 8.5, 9, Tris-HCl), la mezcla se trató a 4°C por una hora y luego se le añadió, a concentración final 500 mM, un búfer de fosfato de potasio (pH 7,5). Usando la muestra tratada, se determinó la actividad residual en condiciones estándar de reacción. La reacción se efectuó en condiciones estándar de reacción, donde la temperatura de la reacción se fijó de 10 a 55°C para analizar la dependencia de la temperatura de la reacción. La dependencia del pH de la reacción se analizó en condiciones estándar de reacción usando una solución búfer (pH 4, 4.5, 5, Acetato-NaOH; pH 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, NaH₂PO₄-NaOH; pH 8, 8.5, 9, Tris-HCl) en lugar del búfer de fosfato de potasio (pH 7,5). Como resultado de los anteriores análisis el FfUGT50 fue estable en el rango de 7 a 9 del pH y mostró la actividad catalítica máxima entre 7 y 8 del pH, pero mostró poca actividad en la región ácida. El FfUGT50 fue estable a (una temperatura de) 30°C o más baja (una hora, pH 7,5) y la temperatura óptima de reacción fue 30°C en el ensayo de actividad por 30 minutos. El SlUGT fue estable en el rango de pH de 4,5 a 8 y mostró actividad catalítica máxima con pH entre 7 y 8 pero mostró poca actividad en la región ácida. Esta enzima fue estable a (una temperatura de) 40°C o más baja (una hora, pH 7,5) y la temperatura óptima de la reacción fue 35°C en el ensayo de actividad por 30 minutos. El AmUGTcg10 fue

estable en el rango de 7,5 a 9,5 del pH y mostró la actividad catalítica máxima entre 8,5 y 9,5 del pH pero mostró poca actividad en la región ácida. Esta enzima fue estable a (una temperatura de) 30°C o más baja (una hora, pH 7,5) y la temperatura óptima de reacción fue 45°C en el ensayo de actividad por 30 minutos. Estas propiedades fueron similares al GT conocido involucrado en el metabolismo secundario de las plantas.

5. Resultados

Se identificaron el PfUGT50 derivado de la *Perilla frutescens*, el SlUGT derivado de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y el AmUGTcg10 derivado de la *Scrophulariaceae*, *Antirrhinum majus*, que son similares estructuralmente como se describió anteriormente. Las glucosiltransferasas del PfUGT50 y del AmUGTcg10 tuvieron una amplia especificidad de sustrato aceptor de glicosilo comparadas con el Sb7GAT de la *Scutellaria baicalensis* y tuvieron la actividad de transferencia del 7-glucuronosilo de varios flavonoides tales como las flavonas, flavonoles, auronas, etc. Por otra parte, el SlUGT mostró una especificidad de sustrato similar al Sb7GAT. Empleando esas glucosiltransferasas la posición 7 de los flavonoides puede ser glucuronidada a bajo costo.

Por lo tanto, los glucurónidos incluyendo el quercetin 7 glucurónido, que están presentes in vivo, pueden ser producidos masivamente in vitro, lo cual habilita evaluar sus actividades fisiológicas.

EJEMPLO 2

1. Resumen del EJEMPLO 2

En este EJEMPLO se identificaron el SiUGT23 altamente homólogo al SiUGT de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y el AmUGTogl2 del *Antirrhinum majus* a partir de la Lamiales Pedaliaceae *Sesamum indicum* y se confirmó que la proteína de expresión del *Escherichia coli* tiene la actividad de transferencia del glucuronosilo a la escutelareina y a la luteolina.

2. Identificación del gen SiUGT23

Atendiendo cuidadosamente la conservación de la secuencia de los genes de la 7-glucuronosiltransferasas (genes UGT) de los flavonoides de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y la *Antirrhinum majus*, se buscaron genes que tuvieran una alta homología a estos genes, y el gen UGT del sésamo SiUGT23 que mostró una alta homología a esos genes UGT fue hallado también en la Lamiales Pedaliaceae *Sesamum indicum*. Puesto que el SiUGT23 aislado de la librería del cADN del sésamo no tuvo una secuencia de longitud completa, la secuencia de longitud completa del SiUGT23 (SEQ ID Nos: 22 y 23) se determinó por el método FACE descrito en el EJEMPLO 1, 2 (3), usando los cebadores de las SEQ ID Nos: 20 y 21 descritas a continuación.

SEQ ID No: 20: GR-SiUGT23-Rv

5'-GGCCAAACGCGCCGGAGCTGATGTAGA-3'

SEQ ID No: 21: SiUGT23-nest-Rv

5'-AGTGGGTATATTCAAGCCTGT-3'

3. Expresión del SiUGT23 derivado del *Sesamum indicum* y su ensayo de actividad

Se amplió el cADN que contenía el ORF de longitud completa del SiUGT23 derivado del *Sesamum indicum* por un grupo de cebadores de gen específicos (SEQ ID Nos: 24 y 25). Se usó como modelo el cADN sintetizado usando el APN total extraído de las semillas del sésamo. El SiUGT23 se incorporó en el vector de expresión del *Escherichia coli* como en el UGT de la *Perilla frutescens*, la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y la *Antirrhinum majus* en el EJEMPLO 1 y la proteína recombinante SiUGT23 se expresó en la misma forma para ensayar la actividad de la enzima.

SEQ ID No: 24: SiUGT23-fw:

5'-CACCATATGGAAGACACCGTTGTCTCTA-3' (el subrayado es el sitio NdeI)

SEQ ID No: 25: SiUGT23-rv:

15 5'-GGATCCTAACATCACTCAAACCCGAGTCA-3' (el subrayado es el sitio BamHI)

La FIG. 5 muestra los resultados de los análisis sobre la especificidad de los sustratos aceptores de glicosilo para el SiUGT23. En la figura 5, se muestra la actividad relativa para cada sustrato, tomando la actividad a la escutelareina como 100%. Como resultado del análisis, el SiUGT23 mostró la máxima actividad a la escutelareina y reaccionó también con las siguientes flavonas (baicaleina (actividad relativa a la escutelareina (lo mismo en lo que sigue), 24%), apigenina (7%), luteolina (29%), tricetina (14.0%), diosmetina (4%), criscoeriol (6%) e isovitexina (0.3%)). Adicionalmente, el SiUGT23 mostró las actividades a los flavonoides (quercetina (4%) y camferol (18%)), a las flavanonas (naringenina (2%)), a las auronas

(aureansidina (13%)), a las cumarinas (esculetina (0.03%)) y a las siguientes isoflavonas (formononetina (0.03%)). Sin embargo, el SiUGT23 no mostró actividad a los C-glicósidos de flavonas (vitexina y orientina) diferentes a isovitexina, isoflavonas (genisteína, Daidzeína) diferentes a formononetina, catequinas (catequina y galato de epigallocatequina) y fenilpropanoides (ácido caféico). En la HPLC los productos de reacción de la escutelareína, de la baicaleína, de la apigenina y de la quercetina coinciden en los términos del tiempo de retención con los productos 7-glucuronosilados.

Los resultados anteriores revelaron que se encontró que el SiUGT23 del *Sesamum indicum* era una 7-glucuronosiltransferasa de flavonoides que presenta una especificidad baja para flavonoides tales como las flavonas, etc., como en el PfUGT50 de la *Perilla frutescens* y el AmUGTcg10 de la *Antirrhinum majus*.

EJEMPLO 3

Usando las proteínas recombinantes del PfUGT50 derivado de la *Perilla frutescens*, el SiUGT derivado de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis* y el AmUGTcg10 derivado del *Antirrhinum majus* al igual que la proteína recombinante del SiUGT23 derivado del *Sesamum indicum*, se examinaron las actividades de transferencia del glucuronosilo a los estilbenos y lignanos, los cuales son polifenoles de plantas. Las reacciones enzimáticas se realizaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, usando resveratrol como sustrato para los estilbenos y como sustratos para los lignanos (+)-pinoresinol, (+)-piperitol, (+)-sesaminol, (+)-secrisclariresinol, (+)-sesamin catecol 1 (SC1), (+)-sesamin

catecol 2 (SC2) y (+)-episesamin catecol 2 (EC2) (Nakai M, et al. (2003) J. Agric Food Chem. 51, 1666-1670).

Como resultado del análisis por HPLC, los productos fueron obtenidos en todas las soluciones de reacción del EFUGT50 de la *Perilla frutescens* una variedad de hoja roja, el SLUGT de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*, el AMUGTog10 de la *Antirrhinum majus* y el SLUGT23 de la *Sesamum indicum* (cf., FIGS. 2 a 5). En cuanto a los lignanos se obtuvieron nuevos productos cuando se usaron como sustratos SC1 y SC2. Como un resultado del análisis por LC-MS sobre la reacción del SLUGT con SC1 en la cual se obtuvieron las cifras más grandes para los productos, se eluyó la SC1 a R.T. = 10,8 minutos y se confirmó que el producto de la reacción era el SC1 monoglucurónido que mostraba R.T. = 10,8 minutos (FIG. 6) y m/z = 517.1328 $[M-H]^-$ ($C_{25}H_{28}O_{12}$, calcd. 517.1346, err. -2.5 ppm) (FIG. 7). La LC-MS se realizó en las siguientes condiciones.

Columna: Develosil C30-UG3, 3mm x 150 mm

Fase móvil: A; H_2O , B; CH_3CN , C: 1.5% $HCOOH$, 0.1 ml/min.

Gradiente: B20% → B70% (10 mins.), B70% (5 mins.), C4%

Detectado: A280 nm

Condiciones para MS: Q-TOF-Premier (Micromass, Manchester, UK) modo V, negativo, voltaje capilar: 2.3KV, voltaje del cono: 45V

Con base en los resultados anteriores, se confirmó que los glucurónidos de los estilbenos y lignanos podrían producirse por el uso del EFUGT50 de la *Perilla frutescens* una variedad de hojas rojas, el SLUGT de la *Scutellaria laeteviolacea* v.

yakusimensis, el AmUGTcg10 de la *Antirrhinum majus* y la SiUGT23 de la *Sesamum indicum* (cf., FIGS. 2 a 5) además de diversos flavonoides.

EJEMPLO 4

5 El SIUGT derivado de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*, cuando reaccionó con la quercetina (QU) dio una pluralidad de productos además del ácido 7-glucurónico (fig. 8).

Son productos característicos que no se encuentran con el
10 SIUGT23 derivado de la *Sesamum indicum*, el AmUGTcg10 derivado de la *Antirrhinum majus* y el PfUGT50 derivado de la *Perilla frutescens*. Como resultado del análisis por LC-MS, el diglucurónido de quercetina que muestra $m/z = 653.1009$ $[M-H]^-$ ($C_{27}H_{25}O_{19}$, calcd. 653.0990, err. 1.9 ppm), en el cual se detectó
15 que dos ácidos glucurónico se transferirían a la quercetina durante el tiempo de retención de 7 y 9 minutos. Durante el tiempo de retención de 9 a 11 minutos se detectaron 3 tipos de monoglucurónidos de la quercetina que muestran $m/z = 477.06$ $[M-H]^-$ en los cuales un ácido glucurónico se transferiría a la
20 quercetina. El componente que muestra un R.T. = 10,12 minutos coincidió con el producto de reacción con el GAT de la *Perilla frutescens*, al cual se purificó y analizó estructuralmente y se halló que era 7-O-glucurónido de quercetina. Además, el componente que muestra un R.T. = 10,24 minutos coincidió con el
25 flavonoide mayor de las hojas de la uva, el cual se purificó y analizó estructuralmente, y se halló que era 3-O-glucurónido de quercetina (Hmamouch, M. et al. (1996) *Ann. J. Enol. Vitic.*, 47, 186-192). El componente que muestra un R.T. = 11,3 minutos, que

es el producto principal de reacción, se halló que era el 3'-O-glucuronido de quercetina, después de la purificación por HPLC de fase inversa y el análisis estructural por NMR. Se confirmó que los 3 mayores picos representaron 7-, 3- y 3'-monoglucuronidos de la quercetina respectivamente.

Las condiciones para la LC-MS son como sigue:

Columna: Polimero YMC-pack C18, 2 mm x 150 mm, 6 μ m

Fase Móvil: A; H₂O, B; CH₃CN, C; 1.5% HCOOH, 0.2 ml/min.

Gradiente: E10% → E50% (10 minutos), E50% (5 minutos), C4%

10 Detectado: A350nm

Condiciones para MS: Q-ToF-Premier (Micromass, Manchester, UK) modo V, negativo, voltaje capilar: 3.0 KV, voltaje del cono: 30V

Los resultados anteriores revelan que puede obtenerse una variedad de glucuronidos de quercetina a partir de la quercetina empleando el SLUGT de la *Scutellaria laeteviolacea* v. *yakusimensis*.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La UDP-glucuronosiltransferasa de la presente invención tiene una amplia especificidad de sustrato y es útil para la producción de varios glucuronidos. Los glucuronidos producidos son útiles como reactivos para inspeccionar las funciones in vivo, los antioxidantes, etc.

REIVINDICACIONES

1... Un polinucleótido cualquiera de la (a) a la (f) de los que siguen;

(a) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que
5 está constituido por una secuencia de nucleótidos en las
posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada
por la SEQ ID No: 4, la secuencia de nucleótidos en las
posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada
por la SEQ ID No 12, y en la secuencia de nucleótidos en las
10 posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada
por la SEQ ID No: 22;

(b) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que
codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos
seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID Nos 5, 11,
15 13, y 23;

(c) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que
codifica una proteína constituida por una secuencia de
aminoácidos con supresión, sustitución, inserción y/o adición
de 1 a 15 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos
20 seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11,
13 y 23 y que tiene actividad de UPD-glucuronosiltransferasa;

(d) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que
codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos
seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11,
25 13 y 23 y que tiene actividad de UPD-glucuronosiltransferasa;

(e) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que

codifica una proteína que hidroliza bajo condiciones estrictas con un polinucleótido que está constituido por una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 12 y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22, y tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa; y,

(f) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que hibridiza en condiciones estrictas con un polinucleótido que está constituido por una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica una proteína constituida por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y tiene actividad de UDP-glucuronosiltransferasa;

2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es cualquiera de la (g) a la (j) de los que siguen:

(g) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína constituida por una secuencia de aminoácidos con supresión, sustitución, inserción y/o adición no mayor que 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11,

13 y 23 y que tiene actividad de UPD-glucuronosiltransferasa;

(h) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de por lo menos 90% con una secuencia
5 de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23 y que tiene una actividad de UPD-glucuronosiltransferasa;

(i) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que hibridiza en condiciones estrictas
10 con un polinucleótido que está constituido por una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4, la secuencia de
15 nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 12, y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de
20 nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22, y tiene una actividad de UPD-glucuronosiltransferasa; y,

(j) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que hibridiza en condiciones estrictas con un polinucleótido que está constituido por una secuencia de
25 nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica una proteína constituida por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23, y que tiene una actividad de

UPD-glucuronosiltransferasa.

3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende un polinucleótido que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la
5 secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4.
4. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende un polinucleótido que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID No: 10.
- 10 5. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende un polinucleótido que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID No: 12.
6. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el
15 cual comprende un polinucleótido que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1372 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID No: 22.
7. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende un polinucleótido que codifica la proteína que
20 está constituido por la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No: 5.
8. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende un polinucleótido que codifica la proteína que está constituido por la secuencia de aminoácidos representada
25 por la SEQ ID No: 11.
9. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el

cual comprende un polinucleótido que codifica la proteína que está constituido por la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No: 13.

5 **10** El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende un polinucleótido que codifica la proteína que está constituido por la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No: 23.

11. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 a 10, el cual es ADN.

10 **12.** Una proteína codificada por el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

15 **14.** Un transformador, en el cual se introduce el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

15. Un transformador, en donde se introduce el vector de acuerdo con la reivindicación 13.

16. Un método para producir la proteína de la reivindicación 12, el cual comprende el uso del transformador de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15.

20 **17.** un método para producir un glucurónido, el cual comprende la formación del glucurónido a partir del ácido UPD-glucurónico y un flavonoides que usa como catalizador la proteína de acuerdo con la reivindicación 12.

RESUMEN

La presente invención proporciona una novedosa UDP-glucuronosiltransferasa y un polinucleótido que codifica la misma (por ejemplo, un polinucleótido que comprende un
5 polinucleótido que está constituido por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que está constituido por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1359 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 4, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1365 en la
10 secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 10, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 12 y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 1371 en la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID No: 22; o
15 un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID Nos: 5, 11, 13 y 23), etc. Esto proporciona una novedosa UDP-glucuronosiltransferasa con una amplia especificidad de
20 sustrato.

FIGURA 1

Alineamientos Formateados

AmUGTg10aa	1	M E E T I V L Y A S A E H L N S M L L L A K F I S E H H P T I S V A I I S T A P N A A A S E V A D V	50
SIUSTaa	1	M E E T I V I Y T P E H L N T M A V L A K F I S E H H P S V P I I L I C T A A E S A A A S I A A V	50
FIUST50aa	1	M E G V I L L Y S A E H L N S M L L L A T F I A E H H P S I P I T I L E S A D Y G A A A S V C T L	50
S67GATaa	1	M E E T I V L Y S A E H L N S M L L L A K F I S E H H P S V P I I L I S R A P E C A A A S V A A I	50
		M E E T I V L Y S A E H L N S M L L L A K F I S E H H P S V P I I L I S A C A A A S V A	
AmUGTg10aa	51	A A I S Y Q Q L L P A T L P S E L T E N F I E L F F E I P R L D R P N L L E A L E E L S L E S E V D	100
SIUSTaa	51	P C I T Y H R L P L P R I P P S I T K D R V E L F F E L P L C N P N L R L A L Q E I S Q E A P I R	100
FIUST50aa	51	P C I T Y R K L P V A I P P S I T K R P V E A F F E I P R L Q N P N L P V A L E E I S Q E T R I R	100
S67GATaa	55	P C I S Y H E L P L P E I P P D M T T D E V E L F F E L P L S N P N L L T A L Q Q I S Q E T P I R	100
		P C I Y Y R L P I P P D T E V E L F F E P L L N P N L A L E I S Q E R I R	
AmUGTg10aa	101	A F V I D F F C N P A F E V S T C L N I P T Y F Y V S S G A F G L C G F L H F P T I D E T V E E E I	150
SIUSTaa	101	A F V I D F F C N A A F E V S T C L S I P T F Y F S S G S P T A T L V L H F P T I D E T I P G E L	150
FIUST50aa	101	A F V I D F F C N S A F E V S T C L C I P T Y F Y V C T G C A G V C I F L Y F P T T E R T V A T E I	150
S67GATaa	95	A V I L D F F C N A A F E V S T C L N I P T Y F Y F S S G T P T A I L T L Y E S T I D E T I P V D L	150
		A F V I D F F C N A F E V S T C L I P T Y Y S G L F T D E T D	
AmUGTg10aa	151	G E L N E I F I P G C P E V L C C E E P L G M F F E E S I T Y E H F L D T A E H M E R A P G I V V	200
SIUSTaa	151	E L L D F F V E I P G L P R I Y C L D I P V A L L I R Q S L V Y Q S V D I E H L R E S A G E L V	200
FIUST50aa	151	G D L E D F L E P P G C F I I N C C D L R Q L T F F R E S N V F E H M L D T C E H M Q E S S I L T	200
S67GATaa	155	G E L N E Y V R I G L P P I N C L D I P V A L C P E E S L V Y E C V D I E H L R E S A G I L V	200
		D L E E I F G P T I C D P E E C V Y E D C E H E E G I L V	
AmUGTg10aa	201	N A F D A M E F F R A E A L V N N L C V P N C P T P P V F L V G P L V G A S T T T E T T H E Q H E C	250
SIUSTaa	201	N O F D A L E F F R A E A I V N G L C V P N C P T P P V F I G P L V G D V D A K A G G E E H E C	250
FIUST50aa	201	N G F D A M E F F R A E A L T H G L C V P N C P T P P V F L V G P L V A G S H A K E H E C	250
S67GATaa	185	N G F D A L E F F R A I O C H C G R M H P N C P T P P V F I G P L V G D V I T E A G C E H E C	250
		N G F D A E F F R A E A N L C V P N C P T P P V F G P L V G T T E A E H E C	
AmUGTg10aa	251	L E W L D V Q P D R S V I F L C F G R R G L F S A D Q L E E I A I G L E N S G H R F L W S V E N P P	300
SIUSTaa	251	L E W L D T Q P S E S V I F L C F G R R G V F S A E Q L K E T A V A L E N S G H R F L W S V E N P P	300
FIUST50aa	247	L E W L D M Q P S E S V V F L C F G R R G V F S A E Q L E E M A V A L E R S G Y E F L W S V E N P P	300
S67GATaa	234	L E W L D Y Q P S E S V V F L C F G R R G V F S A E Q L E E T A A A L E N S G H R F L W S V E N P P	300
		L W L D Q P S E S V F L C F G R R G F S A Q L E E A A L E N S G H R F L W S V E N P P	
AmUGTg10aa	301	S E I H C Y N T R P E L D E L L P E G F L E R T E T R G F V I K S W A P Q K E V L S H G A V G G F	350
SIUSTaa	300	S I M E N S D E D L E L L P E G F L E R T E R G F V I K S W A P Q K E V L S H G V G G F	350
FIUST50aa	277	S E N R C P A E D P E L D E L L P E G F L E R T E D G F V V K S W A P Q K E V L S H D A V A G F	350
S67GATaa	274	S L E K A I O C E P E L D E L L P E G F L E R T E D G F V I K S W A P Q K E V L S H D V G G F	350
		E D E P D L E L L P E G F L E R T E D R G F V I K S W A P Q K E V L S H D V G G F	
AmUGTg10aa	351	V T H C G R S S I L E A V C F G V P M I G W P I Y A E Q R M N E V F M V E E M F V A L G L D E V E E	400
SIUSTaa	345	V T H C G R S S I C E G V W I G V P M I G W P V D A E Q R M L N E T V L V E E M Q V A L P M E E A E C	400
FIUST50aa	345	V T H C G R S S I L E A L V H G P M I G W P M Y A E Q R M H E V F M V D E M F V A L P L E E E D	400
S67GATaa	334	V T H C G R S S V C E G V W F G V P M I G W P V D A E L L L N P A V M V D E L Q V A L P L E E S A G	400
		V T H C G R S S I E V F G V P M I G W P L E Q R H R M V E M V A L P L E E E	
AmUGTg10aa	401	G F V T A A E L E E R V R E L M E S E H G E A V R Q R V E M E V A A E V A V E G G S E V V A L Q	450
SIUSTaa	390	G F V T A A E L E E R V R E L M E S E V G E A V R Q R V G E L E C A T A A V T G N S S I C E E E	450
FIUST50aa	395	G F V T A A E L E E R L P L M E S E T G L E V R H R V A E M E A A T A A M G E N G C A V V A L E	450
S67GATaa	374	G F V T A A E L E E R V R E L M E T E A G E A V R Q R V T E L E L A A E A V A E N G C S L N D L E	450
		G F V T A E L E E R V R E L M E S E G A V R Q R V E E A A A V N G C S L	
AmUGTg10aa	451	R F V L M V V C •	450
SIUSTaa	440	E F L L A T R D •	450
FIUST50aa	445	E F I D C V T R D •	450
S67GATaa	424	E F L L A T R D •	450
		K F D	

FIGURA 2

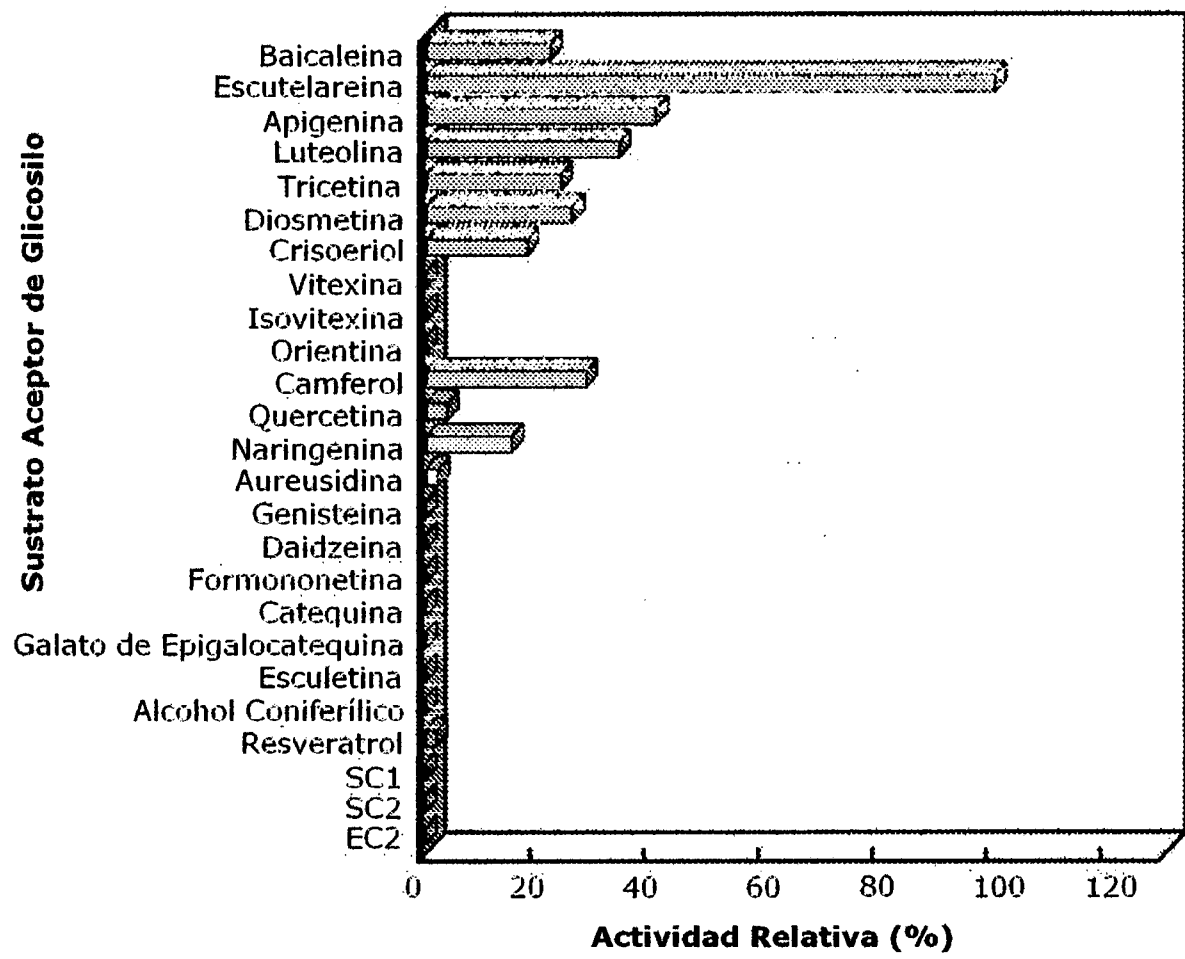


FIGURA 3

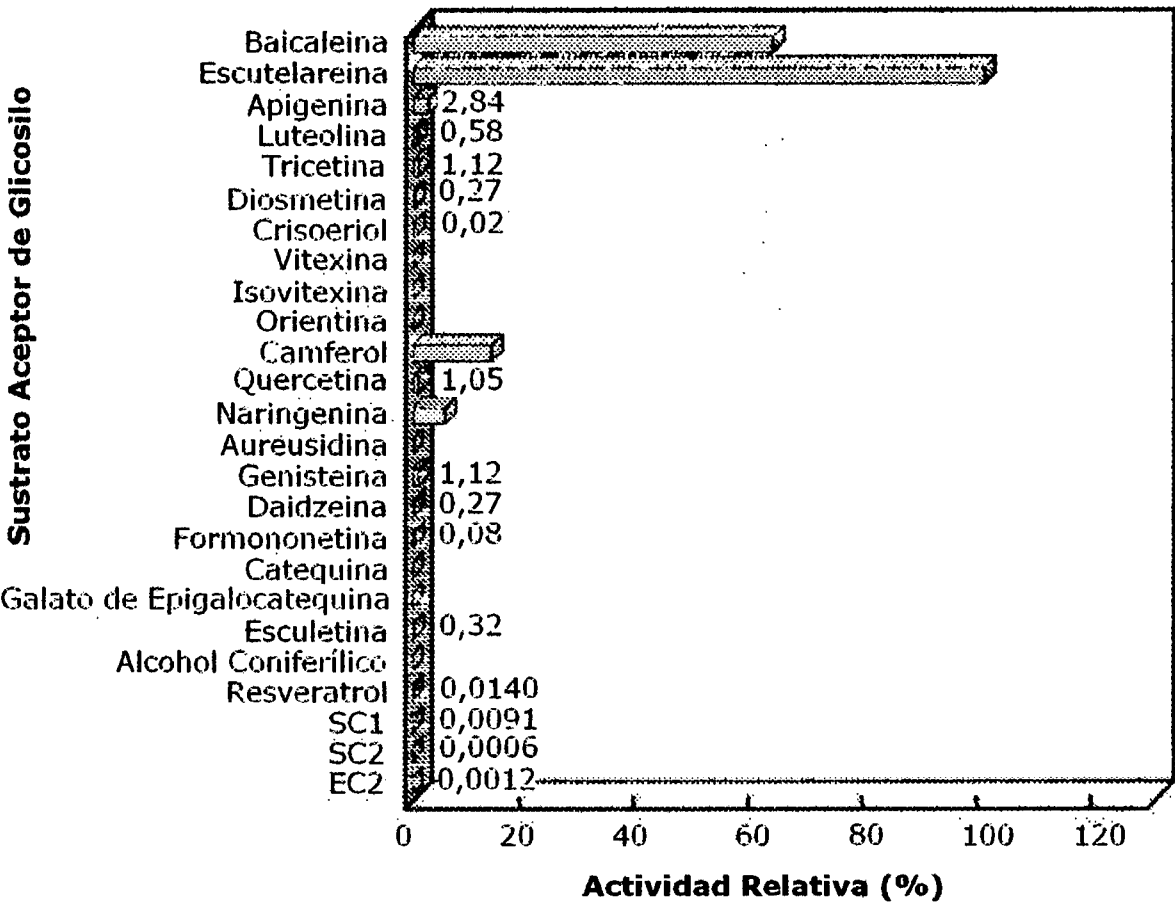


FIGURA 4

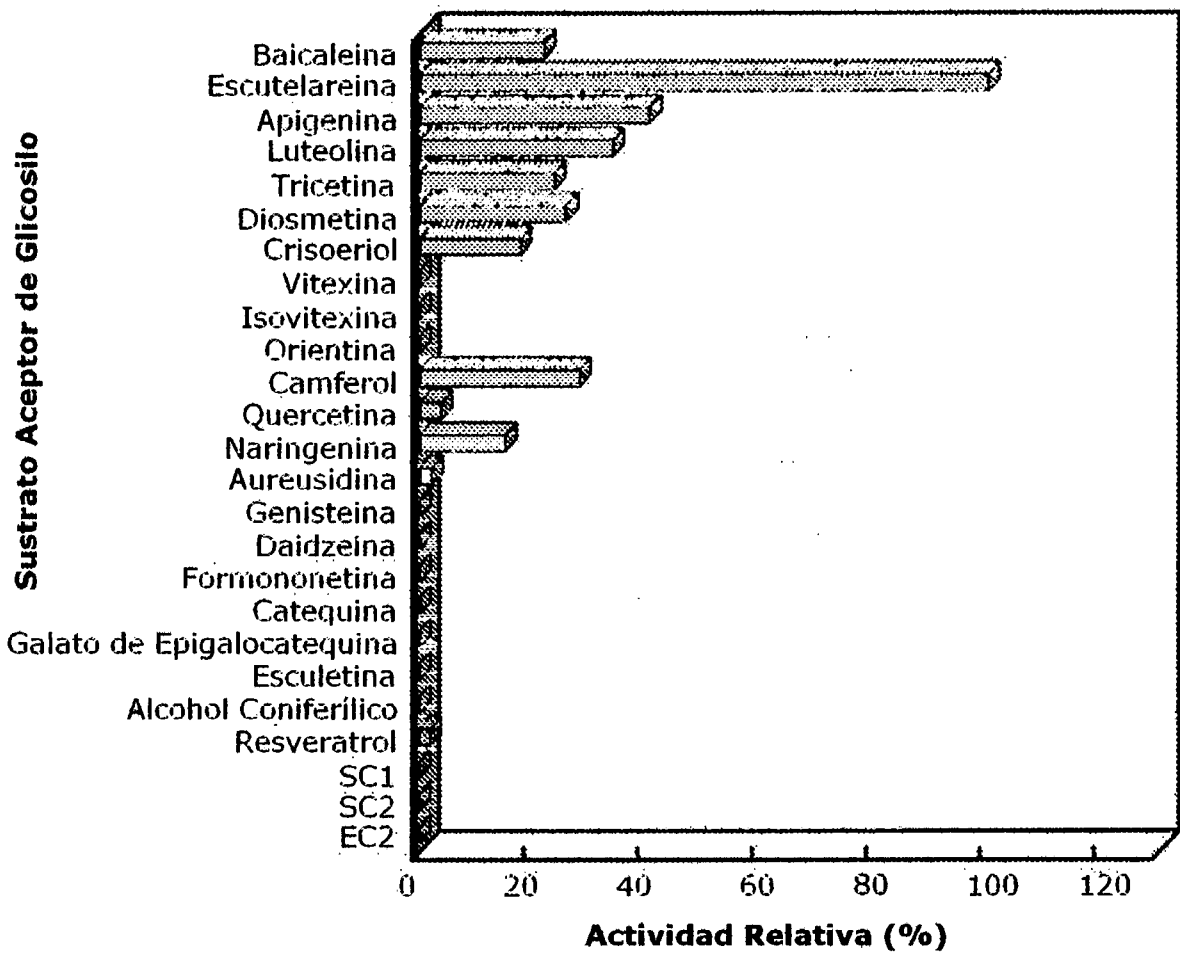


FIGURA 5

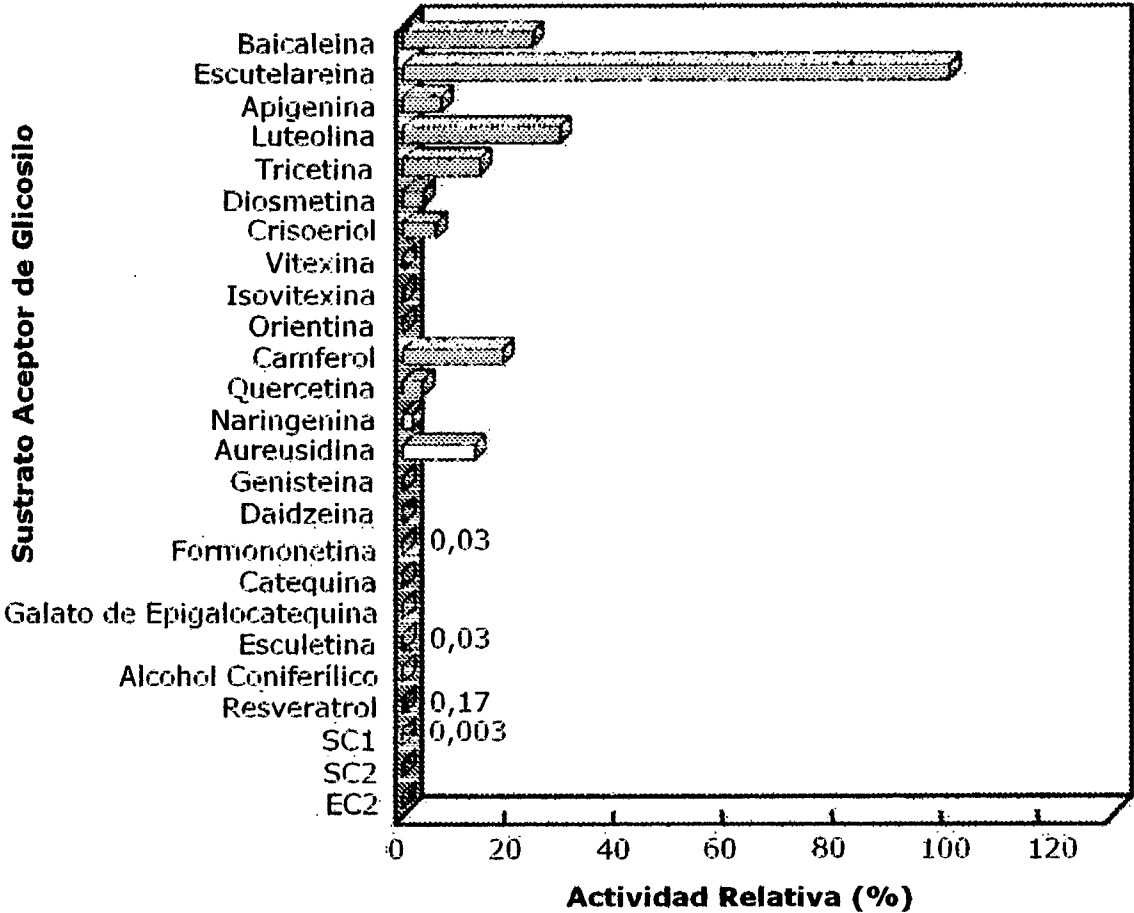


FIGURA 6

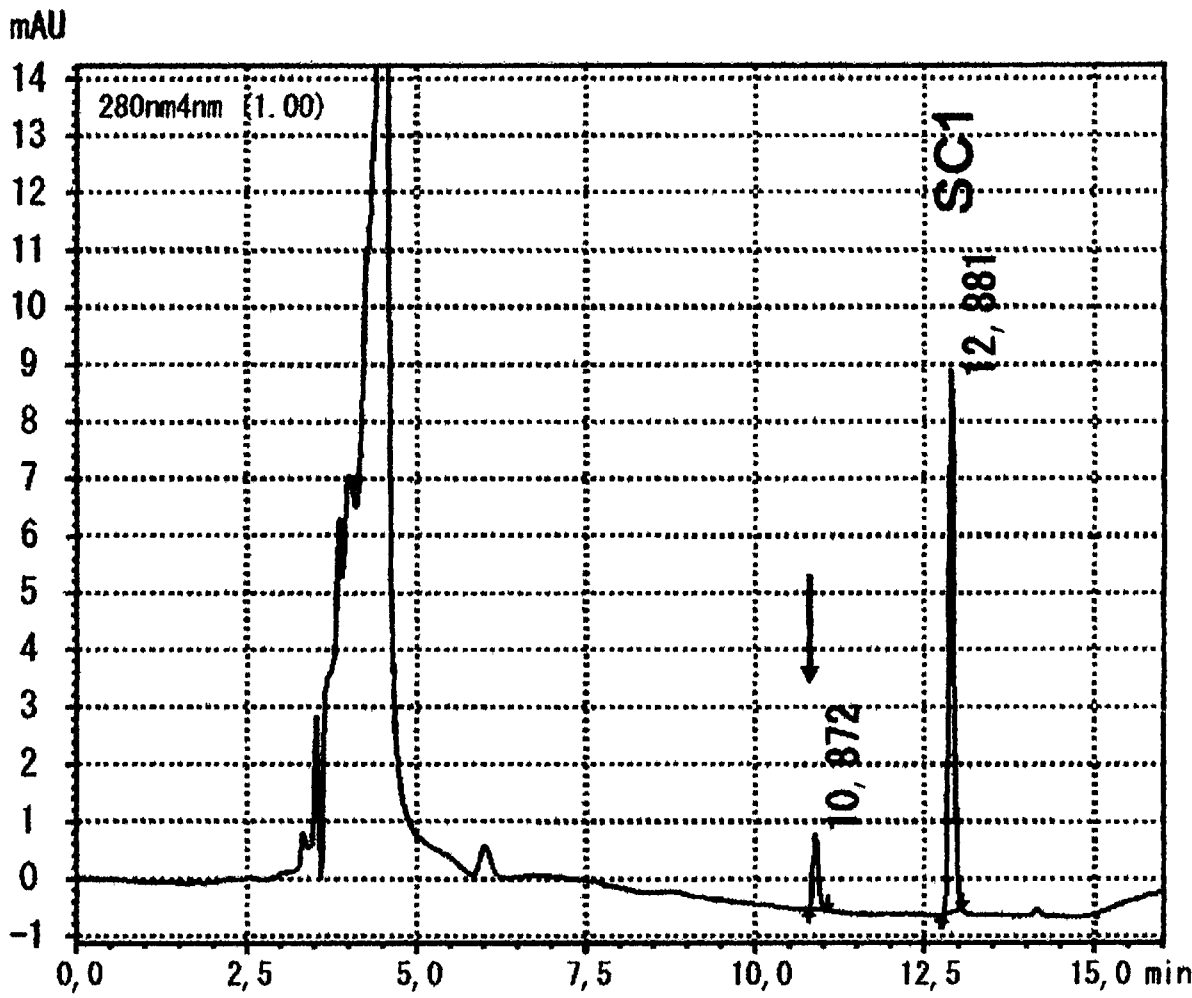


FIGURA 7

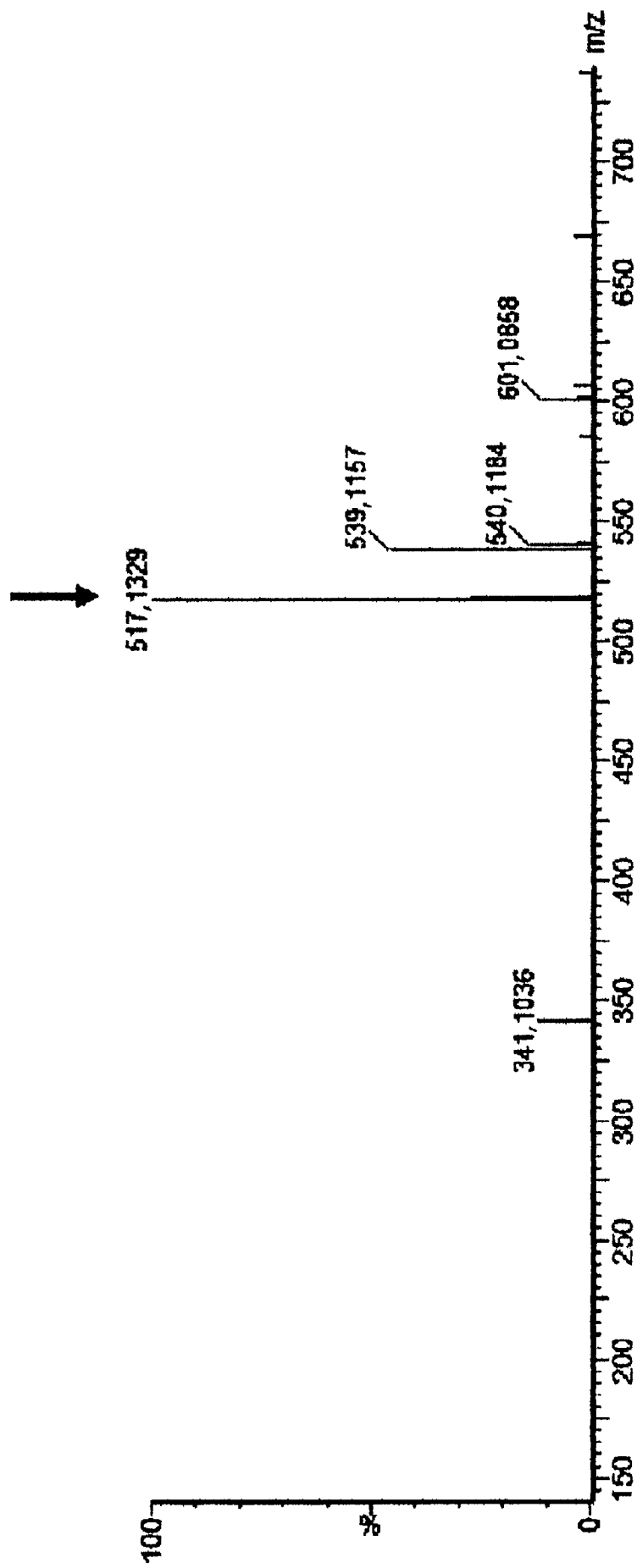
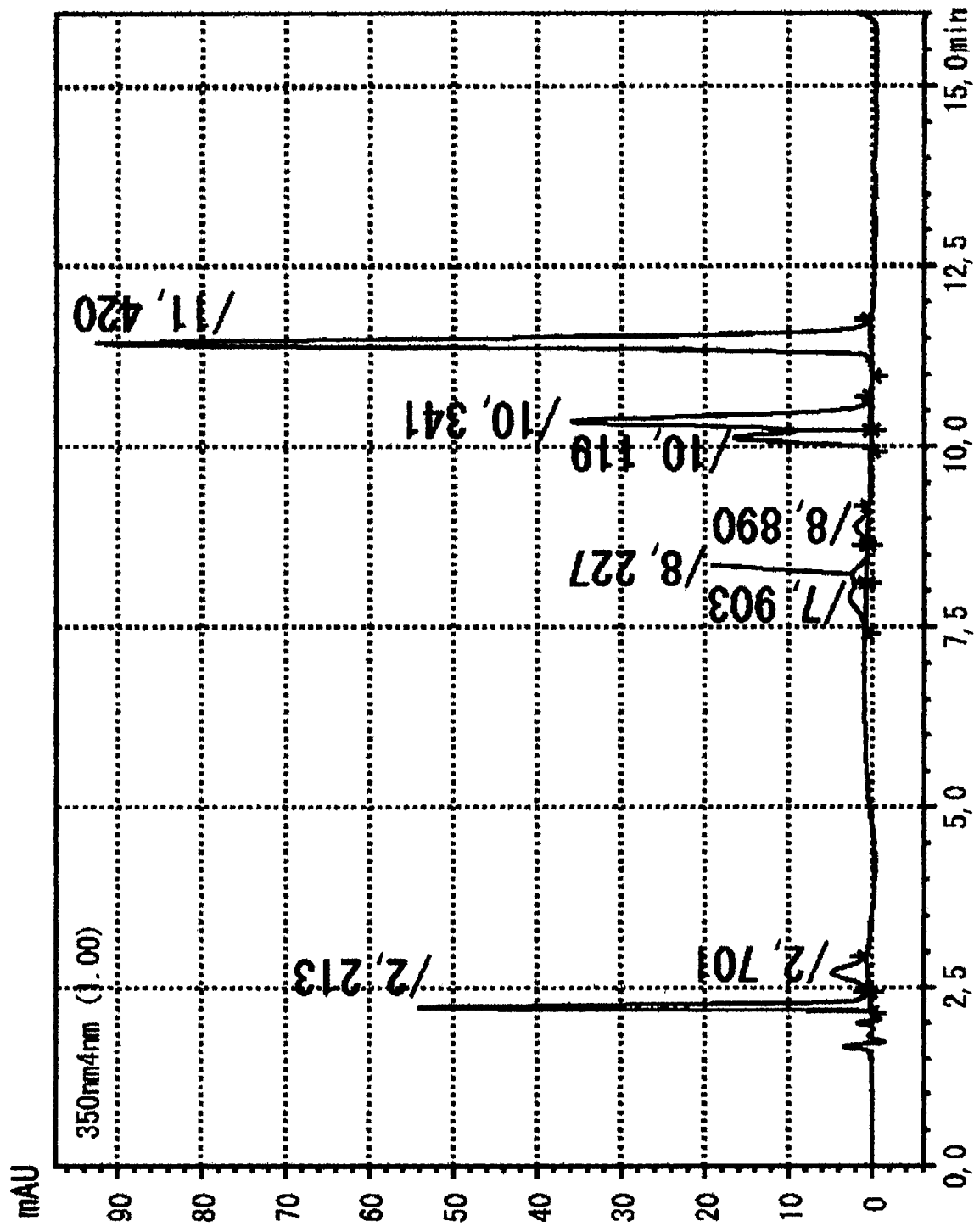


FIGURA 8



LISTA DE SECUENCIAS

<110> SUNTORY LIMITED

<120> UDP- glucuronosiltransferasa y polinucleotido que codifica a la misma

<130> PCT08-0058

<150> JP 2007-267050

<151> 2007-10-12

<150> JP 2008-067185

<151> 2008-03-17

<160> 25

<170> Patente en versión 3.4

<210> 1

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 1

aaacatatgg cggctgctggc gaagttc

27

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 2

ttttgatcat taatcccgag tggcgtgaag

30

<210> 3

<211> 1326

<212> ADN

<213> Scutellaria laeteviolacea v. yakusimensis

<400> 3

atggcgggtgc tggcgaagtt catcagcaag aaccaccct cgcgcccat catcattatc

60

agcaacgccc cggaatccgc cgcgcgctcc gtggcggcca tcccttccat ctctaccac	120
cgccitcccc tcccgagat cctcccgac atgacaacag acccggtgga gctctctto	180
gagctccctc gtctcagcaa cctaacctc ctactgctc tgcaacagat ctcccagaag	240
acaagaatca gagctgttat cctcgatttc ttctgcaacg cggcttttga ggttccgacc	300
agcctcaata taccaccta ctactacttc agcgccggaa ctccaaccgc catctcacc	360
ttgtacttgc aaaccatoga tgagaccatc cctgttgacc ttcaagaact caatgactat	420
gtcgacatcc ctggtttgcg gcgattcac tgcctcgata tcccgtggc ttgtcaccg	480
cgtaagagtc ttgtttacaa gagctccgtc gacatttoga agaacctgcg cagatcggca	540
ggcatctctg ttaatggctt cgatgcactc gactttagag ccataaggaag ccatagtcaa	600
cggcctatgc atttcaaaagg cccaactcct cgggttiact tcctcgggac attggctgga	660
gatgtcgaca ctaaggccgg cagcgaggag catgagtgtc tgagatggct tgataacag	720
ccaagtaaga gtgtcgtctt cctttgtttt gggagaaggg gtgtctctc tgctaagcag	780
ctgaaggaga cggcggcggc gttggagaac agtggccaca gtttctctg gtcagtgaga	840
aaccacccgg agttgaagaa ggcgacgggg tcgatgagc cggacctgga tgagctctc	900
cccgagggtc tcttgagag. aaccaaggat: cggggttctg: tgataaagtc: gtgggtcca:	960
cagaaggagg tgctggctca cgactcggta ggtggattcg tgactcactg tggcgggagc	1020
tccgtgtctg aagggtgtg: gttcggagtg: ccgatgatcg: ggtggccggt ggacgggag:	1080
ctgaggttga atcggccggt gatggtggat gatctgcagg tggcgtgoc gctggaggag	1140
gaggcgggtg ggttcgtgac ggcggctgag ttggagaaac: gatttagaga gttgatggag	1200
acgaaggcgg ggaaggcggg gaggcaacga gtcacgaac tgaactctc cgcagggcg	1260
gcggtggcgg agaattgata: ctogotaaat: gatttgaana: aatttcttca: cgcactcgg:	1320
gattaa	1326

<210> 4
 <211> 1490
 <212> ADN
 <213> Perilla frutescens
 <220>

<222> (1) . . (1362)

atg gaa ggc gtc ata ctt ctt tac tca tgg gct gag cac ttg aac tcc 48
Met Glu Gly Val Ile Leu Leu Tyr Ser Ser Ala Glu His Leu Asn Ser
1 5 10 15

atc aca atc ctt agc tcc gcc gac tac tca gcc gcc gcc tcc gtc tcc 144
Ile Thr Ile Leu Ser Ser Ala Asp Tyr Ser Ala Ala Ala Ser Val Ser
35 40 45

cct gac tca ata aag aac ccg gtc gaa gcc ttc ttc gaa atc cct cgt 240
Pro Asp Ser Ile Lys Asn Pro Val Glu Ala Phe Phe Glu Ile Pro Arg
65 70 75 80

ctc caa aac cca aac ctt cgc gtc gcc ctc gaa gaa atc tcc cag aag 288
Leu Gln Asn Pro Asn Leu Arg Val Ala Leu Glu Glu Ile Ser Gln Lys
85 90 95

aca aga atc aga gca ttt gtg att gat ttc ttc tgc aat tcc gca ttt 336
Thr Arg Ile Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ser Ala Phe
100 105 110

gaa gtc tog acc agc ctc agc ata ccc act tac ttc tac gtc agc acc 384
Glu Val Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Val Ser Thr
115 120 125

ggt tcc gcc ggc gtc tgc atc ttc ctc tat ttc ccc acc acc gat gag 432
Gly Ser Ala Gly Val Cys Ile Phe Leu Tyr Phe Pro Thr Thr Asp Glu
130 135 140

acc gtt gct aca gac atc gga gac ttg cgt gat ttt ctt gaa ttc cct 480
Thr Val Ala Thr Asp Ile Gly Asp Leu Arg Asp Phe Leu Glu Phe Pro
145 150 155 160

ggc tcc ccc att atc cac tca tgc gat ttg cca caa ctt aca ttt ttc 528
Gly Ser Pro Ile Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Gln Leu Thr Phe Phe
165 170 175

cgg cgg agt aat gtt ttc aag cac atg ttg gac act tcc aaa aac atg 576
Arg Arg Ser Asn Val Phe Lys His Met Leu Asp Thr Ser Lys Asn Met
180 185 190

cag aaa tct tct ggg atc ctc aca aat gga ttc gac gct atg gag ttc Gln Lys Ser Ser Gly Ile Leu Thr Asn Gly Phe Asp Ala Met Glu Phe 195 200 205	624
aga gct aag gaa gct cta act aac ggc ctc tgc gtt ccc aac gga ccc Arg Ala Lys Glu Ala Leu Thr Asn Gly Leu Cys Val Pro Asn Gly Pro 210 215 220	672
act ccg ccg gtt tac tta gtt ggg cca cta gtt gcc gga agc aac gct Thr Pro Pro Val Tyr Leu Val Gly Pro Leu Val Ala Gly Ser Asn Ala 225 230 235 240	720
aaa aaa gac cac gag tgc ctg ctg tgg ctg gac aga cag cca agt aaa Lys Lys Asp His Glu Cys Leu Leu Trp Leu Asp Arg Gln Pro Ser Lys 245 250 255	768
agc gtg gtt ttc ctt tgt ttc ggc aga agg ggt ttg ttt too ggc aag Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu Phe Ser Gly Lys 260 265 270	816
cag ttg aga gag atg gcg gtt gct cta gag aga agt ggc tac aga ttt Gln Leu Arg Glu Met Ala Val Ala Leu Glu Arg Ser Gly Tyr Arg Phe 275 280 285	864
ctg tgg tcg gtg cgg aat ccg ccg gaa aat cgt tcg ccg gcg gaa gac Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Glu Asn Arg Ser Pro Ala Glu Asp 290 295 300	912
cct gat ttg gac gag ctt ttg cct gag ggt ttt ctg gag aga act aaa Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu Arg Thr Lys 305 310 315 320	960
gat ata ggg ttt gtg gtg aag tcg tgg gcg cct cag aag gag gtg ctg Asp Ile Gly Phe Val Val Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys Glu Val Leu 325 330 335	1008
agt cat gac gcg gtg gcc ggc ttc gtg act cac tgt ggg agg agc tcg Ser His Asp Ala Val Ala Gly Phe Val Thr His Cys Gly Arg Ser Ser 340 345 350	1056
att ctg gaa gcg ctg gtg aat ggg aaa ccg atg atc ggt tgg cca atg Ile Leu Glu Ala Leu Val Asn Gly Lys Pro Met Ile Gly Trp Pro Met 355 360 365	1104
tac gcg gag cag agg atg aac aag gta ttc atg gtg gac gaa atg aag Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Lys Val Phe Met Val Asp Glu Met Lys 370 375 380	1152
gta gcg ctg ccc ttg gag gag gag gag gat ggg ttc gtg acg gcg gtc Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Phe Val Thr Ala Val	1200

385	390	395	400	
gag ttg gag aag cgg ctg aga cag ttg atg gag tcc aag aca ggg aga				1248
Glu Leu Glu Lys Arg Leu Arg Gln Leu Met Glu Ser Lys Thr Gly Arg				
405 410 415				
gat gtt cgc cac cgt gtt gcc gaa atg aaa gcc got gcc acg gcg gcg				1296
Asp Val Arg His Arg Val Ala Glu Met Lys Ala Ala Ala Thr Ala Ala				
420 425 430				
atg gga gag aat ggt tgg gcg gtg gtt got ttg cgg aag ttc att gat				1344
Met Gly Glu Asn Gly Ser Ala Val Val Ala Leu Arg Lys Phe Ile Asp				
435 440 445				
tcc gta act cgt gat taa aggattttac atatgtcgtc tattaattaa				1392
Ser Val Thr Arg Asp				
450				
tatagtaigt aacttagttg ttatttcggg aaatctaccc aagtcattga gttcaataat				1452
caaatcttcc tatgggctat gccaaattaa aaataaaaa				1490

<210> 5
<211> 453
<212> PRT
<213> Perilla frutescens

<400> 5

Met Glu Gly Val Ile Leu Leu Tyr Ser Ser Ala Glu His Leu Asn Ser	
1 5 10 15	
Met Leu Leu Leu Ala Thr Phe Ile Ala Lys His His Pro Ser Ile Pro	
20 25 30	
Ile Thr Ile Leu Ser Ser Ala Asp Tyr Ser Ala Ala Ala Ser Val Ser	
35 40 45	
Thr Leu Pro Ser Ile Thr Tyr Arg Arg Leu Pro Pro Val Ala Ile Pro	
50 55 60	
Pro Asp Ser Ile Lys Asn Pro Val Glu Ala Phe Phe Glu Ile Pro Arg	
65 70 75 80	
Leu Gln Asn Pro Asn Leu Arg Val Ala Leu Glu Glu Ile Ser Gln Lys	
85 90 95	
Thr Arg Ile Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ser Ala Phe	
100 105 110	

Glu Val Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Val Ser Thr		
115	120	125
Gly Ser Ala Gly Val Cys Ile Phe Leu Tyr Phe Pro Thr Thr Asp Glu		
130	135	140
Thr Val Ala Thr Asp Ile Gly Asp Leu Arg Asp Phe Leu Glu Phe Pro		
145	150	155 160
Gly Ser Pro Ile Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Gln Leu Thr Phe Phe		
	165 170	175
Arg Arg Ser Asn Val Phe Lys His Met Leu Asp Thr Ser Lys Asn Met		
	180 185	190
Gln Lys Ser Ser Gly Ile Leu Thr Asn Gly Phe Asp Ala Met Glu Phe		
	195 200	205
Arg Ala Lys Glu Ala Leu Thr Asn Gly Leu Cys Val Pro Asn Gly Pro		
	210 215	220
Thr Pro Pro Val Tyr Leu Val Gly Pro Leu Val Ala Gly Ser Asn Ala		
225	230 235	240
Lys Lys Asp His Glu Cys Leu Leu Trp Leu Asp Arg Gln Pro Ser Lys		
	245 250	255
Ser Val Val Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu Phe Ser Gly Lys		
	260 265	270
Gln Leu Arg Glu Met Ala Val Ala Leu Glu Arg Ser Gly Tyr Arg Phe		
	275 280	285
Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Glu Asn Arg Ser Pro Ala Glu Asp		
	290 295	300
Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu Arg Thr Lys		
305	310 315	320
Asp Ile Gly Phe Val Val Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys Glu Val Leu		
	325 330	335
Ser His Asp Ala Val Ala Gly Phe Val Thr His Cys Gly Arg Ser Ser		
	340 345	350
Ile Leu Glu Ala Leu Val Asn Gly Lys Pro Met Ile Gly Trp Pro Met		
	355 360	365
Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Lys Val Phe Met Val Asp Glu Met Lys		
	370 375	380

Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Phe Val Thr Ala Val
385 390 395 400

Glu Leu Glu Lys Arg Leu Arg Gln Leu Met Glu Ser Lys Thr Gly Arg
405 410 415

Asp Val Arg His Arg Val Ala Glu Met Lys Ala Ala Ala Thr Ala Ala
420 425 430

Met Gly Glu Asn Gly Ser Ala Val Val Ala Leu Arg Lys Phe Ile Asp
435 440 445

Ser Val Thr Arg Asp
450

<210> 6
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 6
tgggaggcaa accaggagatc togacaa 27

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 7
aatcatccaa atctttaagg t 21

<210> 8
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 8
agaaggggtg tgttctccgc tgagcaa 27

<210> 9
<211> 21

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 9
gaacagcgggt cacagatttc t 21

<210> 10
<211> 1446
<212> ADN
<213> Scutellaria laeteviolacea v. yakusimensis

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1368)

<400> 10
atg gag gac acg att gtt atc tac acc acg ccg gag cac ctg aac acc 48
Met Glu Asp Thr Ile Val Ile Tyr Thr Thr Pro Glu His Leu Asn Thr
1 5 10 15

atg gcg gtg ctc gcc aag ttc atc agc aaa cac cac ccc tcc gtc ccc 96
Met Ala Val Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His His Pro Ser Val Pro
20 25 30

atc ata ctc atc agc acc gcc gcc gaa tca gcc gcc gcc tcc atc gcc 144
Ile Ile Leu Ile Ser Thr Ala Ala Glu Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ala
35 40 45

gcc gtc ccc tcc atc acc tac cac cgc ctc ccc ctc ccc gag atc cct 192
Ala Val Pro Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Leu Pro Glu Ile Pro
50 55 60

ccc agc ctg aca aag gac cgc gtg gag ctc ttc ttc gag ctc cct cgt 240
Pro Ser Leu Thr Lys Asp Arg Val Glu Leu Phe Phe Glu Leu Pro Arg
65 70 75 80

ctc agc aac cct aat ctc cgc ctt gcc ctg caa gag atc tcc cag aaa 288
Leu Ser Asn Pro Asn Leu Arg Leu Ala Leu Gln Glu Ile Ser Gln Lys
85 90 95

gcc aga atc aga gcc ttc gtc atc gac ttc ttc tgc aac goa got ttt 336
Ala Arg Ile Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe
100 105 110

gag gtt tct acc agc ctc agt ata ccc act ttc tac tac ttc agc tct 384
Glu Val Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Thr Phe Tyr Tyr Phe Ser Ser

115	120	125	
gga tog ccc aca gcc acc ctc gtt ctg cac ttc caa acc ott gat gag			432
Gly Ser Pro Thr Ala Thr Leu Val Leu His Phe Gln Thr Leu Asp Glu			
130	135	140	
acc atc cct ggt gac ctt aaa gat ttg gat gat ttt gtc gag atc cct			480
Thr Ile Pro Gly Asp Leu Lys Asp Leu Asp Asp Phe Val Glu Ile Pro			
145	150	155	160
ggt ttg cct ccc att tac tcc ctg gat atc cct gtt gct ctg ctt acg			528
Gly Leu Pro Pro Ile Tyr Ser Leu Asp Ile Pro Val Ala Leu Leu Thr			
	165	170	175
cgt cag agc ctt gtt tac cag agc tot gtt gac atc tog aaa aac ctg			576
Arg Gln Ser Leu Val Tyr Gln Ser Ser Val Asp Ile Ser Lys Asn Leu			
	180	185	190
cgc aaa tca gca ggc ttc ctt gtt aat ggc ttc gat gcc ctc gag ttc			624
Arg Lys Ser Ala Gly Phe Leu Val Asn Gly Phe Asp Ala Leu Glu Phe			
	195	200	205
aga gct aag gaa gcc ata gtc aac ggc ctc tgc gtt ccc aat ggc ccg			672
Arg Ala Lys Glu Ala Ile Val Asn Gly Leu Cys Val Pro Asn Gly Pro			
	210	215	220
act cct ccg gtt tac ttc atc ggc cca ctc gtc gga gat gtc gat gcc			720
Thr Pro Pro Val Tyr Phe Ile Gly Pro Leu Val Gly Asp Val Asp Ala			
225	230	235	240
aaa gcc ggc ggc gaa gag cat gaa tgt ctc aga tgg ctt gat aca cag			768
Lys Ala Gly Gly Glu Glu His Glu Cys Leu Arg Trp Leu Asp Thr Gln			
	245	250	255
cca agt aag agt gtg atc ttc ctt tgc ttt ggc aga agg ggt gtg ttc			816
Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Val Phe			
	260	265	270
tcc gct gag caa ctg aag gag acg gcg gtg gcg ttg gag aac agc ggt			864
Ser Ala Glu Gln Leu Lys Glu Thr Ala Val Ala Leu Glu Asn Ser Gly			
	275	280	285
cac aga ttt ctg tgg tog gtg cga aac cca ccg gag atc atg aag aac			912
His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Glu Ile Met Lys Asn			
	290	295	300
tcc gat gag ccg gac ctg gat gag ctg ctg ccc gag ggg ttt ctg gag			960
Ser Asp Glu Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu			
305	310	315	320
aga acc aag gat cgg ggt ttc gtg atc aag tog tgg gct ccg cag aag			1008

Arg Thr Lys Asp Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys
325 330 335

gag gtg ctg agt cac gac tgg gtg ggg ggg ttc gtc act cac tgt ggg 1056
Glu Val Leu Ser His Asp Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys Gly
340 345 350

ogg agc tcc att tgg gaa ggg gtg tgg ttt ggg gtg cgg atg atc ggg 1104
Arg Ser Ser Ile Ser Glu Gly Val Trp Phe Gly Val Pro Met Ile Gly
355 360 365

tgg cgg gtg gac gcg gag cag aag ttg aat cga aca gtg ttg gtg gag 1152
Trp Pro Val Asp Ala Glu Gln Lys Leu Asn Arg Thr Val Leu Val Glu
370 375 380

gaa atg cag gtg gcg ctg cgg atg gag gag gcg gag ggt ggg ttc gtg 1200
Glu Met Gln Val Ala Leu Pro Met Glu Glu Ala Glu Gly Gly Phe Val
385 390 395 400

acg gcg gct gag ctg gag aaa cga gtt aga gag ttg atg gag tgg aag 1248
Thr Ala Ala Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu Ser Lys
405 410 415

gtg ggg aag gcg gtg agg caa cga gtc ggt gaa ttg aaa tgc tgg gcc 1296
Val Gly Lys Ala Val Arg Gln Arg Val Gly Glu Leu Lys Cys Ser Ala
420 425 430

agg gca gcg gtg acg ggg aat gga tcc tgg cta agt gat ttt aaa aag 1344
Arg Ala Ala Val Thr Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Asp Phe Lys Lys
435 440 445

ttt ctt ctg gcc acg agg gat tgatcatata ctctccatct cggtoattga 1395
Phe Leu Leu Ala Thr Arg Asp
450 455

attcataaaa gtatttttaa gacaagtttt tgtgagagaa taagttaatc a 1446

<210> 11
<211> 455
<212> PRT
<213> Scutellaria laeteviolacea v. yakusimensis

<400> 11

Met Glu Asp Thr Ile Val Ile Tyr Thr Thr Pro Glu His Leu Asn Thr
1 5 10 15

Met Ala Val Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His His Pro Ser Val Pro
20 25 30

Ile Ile Leu Ile Ser Thr Ala Ala Glu Ser Ala Ala Ala Ser Ile Ala

35	40	45
Ala Val Pro Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Leu Pro Glu Ile Pro		
50	55	60
Pro Ser Leu Thr Lys Asp Arg Val Glu Leu Phe Phe Glu Leu Pro Arg		
65	70	75
Leu Ser Asn Pro Asn Leu Arg Leu Ala Leu Gln Glu Ile Ser Gln Lys		
85	90	95
Ala Arg Ile Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe		
100	105	110
Glu Val Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Thr Phe Tyr Tyr Phe Ser Ser		
115	120	125
Gly Ser Pro Thr Ala Thr Leu Val Leu His Phe Gln Thr Leu Asp Glu		
130	135	140
Thr Ile Pro Gly Asp Leu Lys Asp Leu Asp Asp Phe Val Glu Ile Pro		
145	150	155
Gly Leu Pro Pro Ile Tyr Ser Leu Asp Ile Pro Val Ala Leu Leu Thr		
165	170	175
Arg Gln Ser Leu Val Tyr Gln Ser Ser Val Asp Ile Ser Lys Asn Leu		
180	185	190
Arg Lys Ser Ala Gly Phe Leu Val Asn Gly Phe Asp Ala Leu Glu Phe		
195	200	205
Arg Ala Lys Glu Ala Ile Val Asn Gly Leu Cys Val Pro Asn Gly Pro		
210	215	220
Thr Pro Pro Val Tyr Phe Ile Gly Pro Leu Val Gly Asp Val Asp Ala		
225	230	235
Lys Ala Gly Gly Glu Glu His Glu Cys Leu Arg Trp Leu Asp Thr Gln		
245	250	255
Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Val Phe		
260	265	270
Ser Ala Glu Gln Leu Lys Glu Thr Ala Val Ala Leu Glu Asn Ser Gly		
275	280	285
His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Asn Pro Pro Glu Ile Met Lys Asn		
290	295	300
Ser Asp Glu Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu		
305	310	315
		320

Arg Thr Lys Asp Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln Lys
325 330 335

Glu Val Leu Ser His Asp Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys Gly
340 345 350

Arg Ser Ser Ile Ser Glu Gly Val Trp Phe Gly Val Pro Met Ile Gly
355 360 365

Trp Pro Val Asp Ala Glu Gln Lys Leu Asn Arg Thr Val Leu Val Glu
370 375 380

Glu Met Gln Val Ala Leu Pro Met Glu Glu Ala Glu Gly Gly Phe Val
385 390 395 400

Thr Ala Ala Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu Ser Lys
405 410 415

Val Gly Lys Ala Val Arg Gln Arg Val Gly Glu Leu Lys Cys Ser Ala
420 425 430

Arg Ala Ala Val Thr Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Asp Phe Lys Lys
435 440 445

Phe Leu Leu Ala Thr Arg Asp
450 455

<210> 12
<211> 1374
<212> ADN
<213> Antirrhinum majus

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1374)

<400> 12
atg gag gac act atc gtt ctc tac got tca gca gag cac ott aac tcc 48
Met Glu Asp Thr Ile Val Leu Tyr Ala Ser Ala Glu His Leu Asn Ser
1 5 10 15

atg cta cta ctc ggc aaa ctc atc aac aaa cac cac ooc aca atc tcc 96
Met Leu Leu Leu Gly Lys Leu Ile Asn Lys His His Pro Thr Ile Ser
20 25 30

gtc gcc att atc agc acc gcc cca aac gcc gcc gct agt tcc gtc gcc 144
Val Ala Ile Ile Ser Thr Ala Pro Asn Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala
35 40 45

gac gtg gog gcc ata tet tat cag caa ctc aaa ccg gcc act ctc cct 192

Asp Val Ala Ala Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Lys Pro Ala Thr Leu Pro	
50 55 60	
tgc gat cta acc aaa aac cca atc gag ctc ttc ttc gaa atc cca cgt	240
Ser Asp Leu Thr Lys Asn Pro Ile Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg	
65 70 75 80	
cta cat aat cct aac ttg ctc gaa gcg ctg gaa gaa ctg tca cta aaa	288
Leu His Asn Pro Asn Leu Leu Glu Ala Leu Glu Glu Leu Ser Leu Lys	
85 90 95	
tca aaa gta agg gca ttt gtg ata gat ttc ttt tgc aat ccc gca ttt	336
Ser Lys Val Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Pro Ala Phe	
100 105 110	
gag gtt tgc act agc ttg aac ata ccc act tac ttc tat gtc agc agc	384
Glu Val Ser Thr Ser Leu Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Val Ser Ser	
115 120 125	
ggc gcg ttt ggg cta tgc ggg ttc ttg cat ttt ccg aca atc gac gaa	432
Gly Ala Phe Gly Leu Cys Gly Phe Leu His Phe Pro Thr Ile Asp Glu	
130 135 140	
act gtc gaa aaa gac atc ggt gaa ctg aac gat atc ttg gag atc ccg	480
Thr Val Glu Lys Asp Ile Gly Glu Leu Asn Asp Ile Leu Glu Ile Pro	
145 150 155 160	
ggt tgc ccc ccg gtt ttg tcc tog gat ttt ccg aaa ggt atg ttc ttt	528
Gly Cys Pro Pro Val Leu Ser Ser Asp Phe Pro Lys Gly Met Phe Phe	
165 170 175	
ccg aag agt aac act tac aag cat ttt tta gac acg gcg aaa aac atg	576
Arg Lys Ser Asn Thr Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ala Lys Asn Met	
180 185 190	
agg aga gcg aaa ggg atc gtg gtg aac gcc ttc gac gcg atg gag ttc	624
Arg Arg Ala Lys Gly Ile Val Val Asn Ala Phe Asp Ala Met Glu Phe	
195 200 205	
cga gct aaa gaa gcc ctc gtc aac aat ctg tgc gta ccc aat tgc cca	672
Arg Ala Lys Glu Ala Leu Val Asn Asn Leu Cys Val Pro Asn Ser Pro	
210 215 220	
act ccc cca gtt ttc tta gtc ggc cca ttg gtc gga gca agc aca act	720
Thr Pro Pro Val Phe Leu Val Gly Pro Leu Val Gly Ala Ser Thr Thr	
225 230 235 240	
acg aaa acc aca aac gaa cag cac gaa tgc ttg aaa tgg ctg gac gtg	768
Thr Lys Thr Thr Asn Glu Gln His Glu Cys Leu Lys Trp Leu Asp Val	
245 250 255	

cag cca gac aga agc gtg atc ttc tta tgt ttc ggt agg agg ggt ttg	816
Gln Pro Asp Arg Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu	
260 265 270	
ttc tcc gca gac caa ttg aag gaa atc gca att ggt ctg gag aac agc	864
Phe Ser Ala Asp Gln Leu Lys Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Asn Ser	
275 280 285	
ggc cac agg ttc ctg tgg tcc gtg cgt tgc cca cca agt aag cct aac	912
Gly His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Cys Pro Pro Ser Lys Pro Asn	
290 295 300	
tct tat aac act gat ccg gac ctg gac gag ctc ctg ccc gag ggg ttt	960
Ser Tyr Asn Thr Asp Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe	
305 310 315 320	
ttg tcc agg acc gag acc cgg ggt ttc gtg atc aag tcg tgg gcg cct	1008
Leu Ser Arg Thr Glu Thr Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro	
325 330 335	
cag aag gag gtg ctg agc cat ggc gcg gtt gga ggg ttc gtg acg cac	1056
Gln Lys Glu Val Leu Ser His Gly Ala Val Gly Gly Phe Val Thr His	
340 345 350	
tgt ggg agg agt tcg ata ttg gaa gcg gtg tcg ttt ggg gtg ccg atg	1104
Cys Gly Arg Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Phe Gly Val Pro Met	
355 360 365	
atc ggg tgg ccg ata tac gcg gag cag agg atg aat agg gtg ttc atg	1152
Ile Gly Trp Pro Ile Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met	
370 375 380	
gtg gag gag atg aag gtg gcg ttg cag ttg gat gag gtg gag gaa ggg	1200
Val Glu Glu Met Lys Val Ala Leu Gln Leu Asp Glu Val Glu Glu Gly	
385 390 395 400	
ttc gtg gcg gcg gtg gaa ttg gag aag aga gtg aag gag ttg atg gat	1248
Phe Val Ala Ala Val Glu Leu Glu Lys Arg Val Lys Glu Leu Met Asp	
405 410 415	
tcg aag aat ggg aga gcg gtt agg cag oga gtg aag gag atg aaa gtg	1296
Ser Lys Asn Gly Arg Ala Val Arg Gln Arg Val Lys Glu Met Lys Val	
420 425 430	
gcg gct gag gtg gcg gtt gaa aag ggt ggt tcg tca gtt gtg gcg ttg	1344
Ala Ala Glu Val Ala Val Glu Lys Gly Gly Ser Ser Val Val Ala Leu	
435 440 445	
caa cgc ttt gtt gat atg gtg gtt tct taa	1374
Gln Arg Phe Val Asp Met Val Val Ser	
450 455	

<210> 13
<211> 457
<212> PRT
<213> Antirrhinum majus

<400> 13

Met Glu Asp Thr Ile Val Leu Tyr Ala Ser Ala Glu His Leu Asn Ser
1 5 10 15

Met Leu Leu Leu Gly Lys Leu Ile Asn Lys His His Pro Thr Ile Ser
20 25 30

Val Ala Ile Ile Ser Thr Ala Pro Asn Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala
35 40 45

Asp Val Ala Ala Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Lys Pro Ala Thr Leu Pro
50 55 60

Ser Asp Leu Thr Lys Asn Pro Ile Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg
65 70 75 80

Leu His Asn Pro Asn Leu Leu Glu Ala Leu Glu Glu Leu Ser Leu Lys
85 90 95

Ser Lys Val Arg Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Pro Ala Phe
100 105 110

Glu Val Ser Thr Ser Leu Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Ala Phe Gly Leu Cys Gly Phe Leu His Phe Pro Thr Ile Asp Glu
130 135 140

Thr Val Glu Lys Asp Ile Gly Glu Leu Asn Asp Ile Leu Glu Ile Pro
145 150 155 160

Gly Cys Pro Pro Val Leu Ser Ser Asp Phe Pro Lys Gly Met Phe Phe
165 170 175

Arg Lys Ser Asn Thr Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ala Lys Asn Met
180 185 190

Arg Arg Ala Lys Gly Ile Val Val Asn Ala Phe Asp Ala Met Glu Phe
195 200 205

Arg Ala Lys Glu Ala Leu Val Asn Asn Leu Cys Val Pro Asn Ser Pro
210 215 220

Thr Pro Pro Val Phe Leu Val Gly Pro Leu Val Gly Ala Ser Thr Thr

225	230	235	240
Thr Lys Thr Thr Asn Glu Gln His Glu Cys Leu Lys Trp Leu Asp Val			
	245	250	255
Gln Pro Asp Arg Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu			
	260	265	270
Phe Ser Ala Asp Gln Leu Lys Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Asn Ser			
	275	280	285
Gly His Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Cys Pro Pro Ser Lys Pro Asn			
	290	295	300
Ser Tyr Asn Thr Asp Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Glu Gly Phe			
305	310	315	320
Leu Ser Arg Thr Glu Thr Arg Gly Phe Val Ile Lys Ser Trp Ala Pro			
	325	330	335
Gln Lys Glu Val Leu Ser His Gly Ala Val Gly Gly Phe Val Thr His			
	340	345	350
Cys Gly Arg Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Phe Gly Val Pro Met			
	355	360	365
Ile Gly Trp Pro Ile Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met			
	370	375	380
Val Glu Glu Met Lys Val Ala Leu Gln Leu Asp Glu Val Glu Glu Gly			
385	390	395	400
Phe Val Ala Ala Val Glu Leu Glu Lys Arg Val Lys Glu Leu Met Asp			
	405	410	415
Ser Lys Asn Gly Arg Ala Val Arg Gln Arg Val Lys Glu Met Lys Val			
	420	425	430
Ala Ala Glu Val Ala Val Glu Lys Gly Gly Ser Ser Val Val Ala Leu			
	435	440	445
Gln Arg Phe Val Asp Met Val Val Ser			
	450	455	

<210> 14

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>	ADN sintético	
<400>	14	
aaacatatgg	aaggcgtcat	acttc
		25
<210>	15	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	ADN sintético	
<400>	15	
ttttgatcat	taatcacgag	ttacggaatc
		30
<210>	16	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	ADN sintético	
<400>	16	
aaacatatgg	aggacacgat	tgttatc
		27
<210>	17	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	ADN sintético	
<400>	17	
ttcatatgtc	aatccctcgt	ggccagaag
		29
<210>	18	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	ADN sintético	
<400>	18	
aaacatatgg	aggacactat	cgttctc
		27

<210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN sintético

<400> 19
 ttggatcctt aagaaaccac catatcaac 29

<210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN sintético

<400> 20
 ggccaaacgc gccggagctg atgtaga 27

<210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN sintético

<400> 21
 agtgggtata ttcaagcctg t 21

<210> 22
 <211> 1433
 <212> ADN
 <213> Sesamum indicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1374)

<400> 22
 atg gaa gac acc gtt gtc ctc tac act tgg gca gag cac ttg aat tcc 48
 Met Glu Asp Thr Val Val Leu Tyr Thr Ser Ala Glu His Leu Asn Ser
 1 5 10 15

atg tta gtg ctg gcc aaa ttc att agc aaa cat tat ccc tcc atc ccc 96
 Met Leu Val Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His Tyr Pro Ser Ile Pro
 20 25 30

ctc cta atc ctt tgc tcc gcc ccc gag tcc gcc ggc gct tcc gtc gcc	144
Leu Leu Ile Leu Cys Ser Ala Pro Glu Ser Ala Ala Ala Ser Val Ala	
35 40 45	
acc gtg cct tcc atc act tac cac cgc ctc cca cct ccc gct ctt cct	192
Thr Val Pro Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Pro Pro Ala Leu Pro	
50 55 60	
ccc aac ttg acc acc aat cct ctt gaa ctc tta ttc gaa ata cct cgt	240
Pro Asn Leu Thr Thr Asn Pro Leu Glu Leu Leu Phe Glu Ile Pro Arg	
65 70 75 80	
ctc aac aac cca aat gtt agc aaa gcc ctt caa gag atc tcc cag aag	288
Leu Asn Asn Pro Asn Val Ser Lys Ala Leu Gln Glu Ile Ser Gln Lys	
85 90 95	
toa aga atc aaa gca ttt gtc att gat ttc ttc tgc aat cca gtt ttt	336
Ser Arg Ile Lys Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Pro Val Phe	
100 105 110	
gaa gtt tot aca ggc ttg aat ata ccc act tac ttc tac atc agc tcc	384
Glu Val Ser Thr Gly Leu Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Ile Ser Ser	
115 120 125	
ggc ggc ttt ggc ctt tgc ccc ttt ctg aat ttc ccc act atc gag gaa	432
Gly Ala Phe Gly Leu Cys Pro Phe Leu Asn Phe Pro Thr Ile Glu Glu	
130 135 140	
acc gtt cct gga gac ott got gac ttg aat gat ttt gtc gaa att cct	480
Thr Val Pro Gly Asp Leu Ala Asp Leu Asn Asp Phe Val Glu Ile Pro	
145 150 155 160	
ggc tgc cca ccc gtt cac tca tca gat ttc ccc gag gct atg att cat	528
Gly Cys Pro Pro Val His Ser Ser Asp Phe Pro Glu Ala Met Ile His	
165 170 175	
cgt aag agt aat atc tac aaa cat ttt atg gac gcc gca aga aac atg	576
Arg Lys Ser Asn Ile Tyr Lys His Phe Met Asp Ala Ala Arg Asn Met	
180 185 190	
gca aaa tca acc gga aac ctg gta aac gca ttt gat ggc ctc gag ttt	624
Ala Lys Ser Thr Gly Asn Leu Val Asn Ala Phe Asp Ala Leu Glu Phe	
195 200 205	
agg gct aag gaa gca ctg ata aac ggt ttg tgc att ccc aat ggc cca	672
Arg Ala Lys Glu Ala Leu Ile Asn Gly Leu Cys Ile Pro Asn Ala Pro	
210 215 220	
aca cgc cct gtt tac ttg gtt gga ccc tta gtt ggt gat agc aac cgt	720
Thr Pro Pro Val Tyr Leu Val Gly Pro Leu Val Gly Asp Ser Asn Arg	

225	230	235	240	
aac aac ggc tgc ata cag cat gaa tgc ctg aag tgg ctt gat tgc cag				768
Asn Asn Gly Cys Ile Gln His Glu Cys Leu Lys Trp Leu Asp Ser Gln				
	245	250	255	
ccc agc aaa agc gtg att ttc ctg tgc ttg ggc agg agg ggc ttg ttt				816
Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu Phe				
	260	265	270	
tcc gtt gaa cag ctt aaa gaa atg gcg ctt ggt ctg gaa aat agc ggc				864
Ser Val Glu Gln Leu Lys Glu Met Ala Leu Gly Leu Glu Asn Ser Gly				
	275	280	285	
tat aga ttt ctt tgg tcc gtg cgc agt cca ccg ggc aag cag aat tca				912
Tyr Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Ser Pro Pro Gly Lys Gln Asn Ser				
	290	295	300	
gca gcg gcg gag cca gac ttg gat gag ctg cta cca aag ggt ttc ctg				960
Ala Ala Ala Glu Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Lys Gly Phe Leu				
305	310	315	320	
gag aga act aaa gac agg ggc ttc ata att aag tca tgg gcg ccg cag				1008
Glu Arg Thr Lys Asp Arg Gly Phe Ile Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln				
	325	330	335	
acg gaa gtg ctg agt cac gat tgc gtg ggt ggg ttc gtg aca cac tgc				1056
Thr Glu Val Leu Ser His Asp Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys				
	340	345	350	
ggt agg agc tca att ctg gaa gcg gtg tgc ctg ggg gtg ccg atg atc				1104
Gly Arg Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Leu Gly Val Pro Met Ile				
	355	360	365	
ggg tgg ccg ttg tac gcg gag cag agg atg aat cgg gtt ttc atg gtg				1152
Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met Val				
	370	375	380	
gag gaa atg aag gtg gcg ctg cca tia gag gag acg gcg gat ggg tia				1200
Glu Glu Met Lys Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Thr Ala Asp Gly Leu				
385	390	395	400	
gtg acg gcg gtt gag ttg gag aag cga gtc aga cag ttg atg gac tcc				1248
Val Thr Ala Val Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Gln Leu Met Asp Ser				
	405	410	415	
cag acg gga aga got gtg cga cac cga gtg acc gaa ttg aaa agc tcc				1296
Gln Thr Gly Arg Ala Val Arg His Arg Val Thr Glu Leu Lys Ser Ser				
	420	425	430	
gct gcg gcg gcg gtg cgg aag aat gga tgc tgc cta gtg gcg ttg caa				1344

Ala Ala Ala Ala Val Arg Lys Asn Gly Ser Ser Leu Val Ala Leu Gln
 435 440 445

aat ttc att ggc tgc gtg act ogg gtt tga gtgatgttat tactocaagt 1394
 Asn Phe Ile Ala Ser Val Thr Arg Val
 450 455

aataaaattt aattaccgtg taataaaaaaa aaaaaaaan 1433

<210> 23
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Sesamum indicum

<400> 23

Met Glu Asp Thr Val Val Leu Tyr Thr Ser Ala Glu His Leu Asn Ser
 1 5 10 15

Met Leu Val Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His Tyr Pro Ser Ile Pro
 20 25 30

Leu Leu Ile Leu Cys Ser Ala Pro Glu Ser Ala Ala Ala Ser Val Ala
 35 40 45

Thr Val Pro Ser Ile Thr Tyr His Arg Leu Pro Pro Pro Ala Leu Pro
 50 55 60

Pro Asn Leu Thr Thr Asn Pro Leu Glu Leu Leu Phe Glu Ile Pro Arg
 65 70 75 80

Leu Asn Asn Pro Asn Val Ser Lys Ala Leu Gln Glu Ile Ser Gln Lys
 85 90 95

Ser Arg Ile Lys Ala Phe Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Pro Val Phe
 100 105 110

Glu Val Ser Thr Gly Leu Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Tyr Ile Ser Ser
 115 120 125

Gly Ala Phe Gly Leu Cys Pro Phe Leu Asn Phe Pro Thr Ile Glu Glu
 130 135 140

Thr Val Pro Gly Asp Leu Ala Asp Leu Asn Asp Phe Val Glu Ile Pro
 145 150 155 160

Gly Cys Pro Pro Val His Ser Ser Asp Phe Pro Glu Ala Met Ile His
 165 170 175

Arg Lys Ser Asn Ile Tyr Lys His Phe Met Asp Ala Ala Arg Asn Met

180	185	190
Ala Lys Ser Thr Gly Asn Leu Val	Asn Ala Phe Asp Ala Leu Glu Phe	
195	200	205
Arg Ala Lys Glu Ala Leu Ile Asn Gly Leu Cys Ile Pro Asn Ala Pro		
210	215	220
Thr Pro Pro Val Tyr Leu Val Gly Pro Leu Val Gly Asp Ser Asn Arg		
225	230	235 240
Asn Asn Gly Cys Ile Gln His Glu Cys Leu Lys Trp Leu Asp Ser Gln		
245	250	255
Pro Ser Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Leu Phe		
260	265	270
Ser Val Glu Gln Leu Lys Glu Met Ala Leu Gly Leu Glu Asn Ser Gly		
275	280	285
Tyr Arg Phe Leu Trp Ser Val Arg Ser Pro Pro Gly Lys Gln Asn Ser		
290	295	300
Ala Ala Ala Glu Pro Asp Leu Asp Glu Leu Leu Pro Lys Gly Phe Leu		
305	310	315 320
Glu Arg Thr Lys Asp Arg Gly Phe Ile Ile Lys Ser Trp Ala Pro Gln		
325	330	335
Thr Glu Val Leu Ser His Asp Ser Val Gly Gly Phe Val Thr His Cys		
340	345	350
Gly Arg Ser Ser Ile Leu Glu Ala Val Ser Leu Gly Val Pro Met Ile		
355	360	365
Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met Val		
370	375	380
Glu Glu Met Lys Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Thr Ala Asp Gly Leu		
385	390	395 400
Val Thr Ala Val Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Gln Leu Met Asp Ser		
405	410	415
Gln Thr Gly Arg Ala Val Arg His Arg Val Thr Glu Leu Lys Ser Ser		
420	425	430
Ala Ala Ala Ala Val Arg Lys Asn Gly Ser Ser Leu Val Ala Leu Gln		
435	440	445
Asn Phe Ile Ala Ser Val Thr Arg Val		

450	455	
<210>	24	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	ADN sintético	
<400>	24	
caccatatgg aagacaccgt tgtcctcta		29
<210>	25	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	ADN sintético	
<400>	25	
ggatcctaac atcaactcaaa ccgagtca		29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/067613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/00(2006.01)i, C07H17/07(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/00, C07H17/07, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10, C12N15/09, C12P7/62 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 term used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	Database GenBank [online], Accession no. AB042277, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?37359709:OLD16:517464 >, 02-Oct-2003 uploaded [retrieved on 08-Oct-2008], NAGASHIMA S., et al., Definition: Scutellaria baicalensis UBGAT-I mRNA for UDP-glucuronate:baicalein 7-O-glucuronosyltransferase, complete cds	1-17												
A	NAGASHIMA S., et al., Purification and characterization of UDP-glucuronate: baicalein 7-O-glucuronosyltransferase from Scutellaria baicalensis Georgi. cell suspension cultures., Phytochemistry, 2000, vol. 53, no. 5, p. 533-538	1-17												
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
<table><tr><td>* Special categories of cited documents:</td><td>"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</td></tr><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"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</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td><td>"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</td></tr><tr><td>"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)</td><td>"&" document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td></td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			* Special categories of cited documents:	"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	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	"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													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 09 October, 2008 (09.10.08)		Date of mailing of the international search report 21 October, 2008 (21.10.08)												
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer												
Facsimile No.		Telephone No.												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/067613

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	Eiichiro ONO et al., "Lamiales ni Okeru Flavonoid 7-i Haitotaika Koso no Kinc Bunka", Proceedings of the Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 15 March, 2003 (15.03.03), vol. 49th, page 137 (1pE04(141))	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/067613

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: The matter common to claims 1-17 is a "UDP-glucuronyl transferase in the Lamiaceae", however, Document 1 (Database GenBank: [online], Accession No. AB042277, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?37359709:OLD16:517464>, 02-Oct-2003 uploaded [retrieved on 03-Oct-2008]) describes a specific amino acid sequence of glucuronyl transferase protein derived from <i>Scutellaria baicalensis</i> of the Lamiaceae and a nucleotide sequence of a gene encoding the protein. Therefore, the common matter falls within the scope of the prior art, and the "UDP-glucuronyl transferase in the Lamiaceae" is not a special technical feature under PCT Rule 13.2. 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Remark on Protest the ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2008/067613

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

KOBAYASHI, Hiroshi
ABE, IKUBO & KATAYAMA
Fukuoka Bldg. 9th Fl.
8-7, Yaesu 2-chome
Chuo-ku, Tokyo
1040028
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 23 April 2009 (23.04.2009)
Applicant's or agent's file reference PCT08-0058
International application No. PCT/JP2008/067612

IMPORTANT NOTIFICATION
International filing date (day/month/year) 29 September 2008 (29.09.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:				
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent	☐ the common representative	
Name and Address SUNTORY LIMITED 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 5308203 Japan		State of Nationality JP	State of Residence JP	
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		E-mail address		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:				
☒ the person	☐ the name	☐ the address	☐ the nationality	☐ the residence
Name and Address SUNTORY HOLDINGS LIMITED 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 5308203 Japan		State of Nationality JP	State of Residence JP	
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized		
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to:				
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority			
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned			
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned			
	☐ other:			

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Kunz Aiko e-mail pt07.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 07
Facsimile No. +41 22 338 90 90	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-056061- -00000-0000

Fecha: 2010-05-11 10:25:37 Dep. 2020 DIR. NUEVASOR
 Tra. 11 PATENTEIYII Evs: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 182

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 4,301
 FECHA : ENERO 18 DE 2010

***** C O N S I D E R A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	V. PAGO
CANCELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325571032	18/01/2010	47.164.000.00

***** C O N T R O L *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	667.000.00
	*** CANCELACION REGISTRO MARCARO POR	667.000.00
	TOTAL :	667.000.00

SON: SEISCIENTOS SESENTA Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA AFILIADO : EXPERIMENTO AL

COLO. 17511-84-C01-8

183

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-056061- -00000-0000

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 34,501

FECHA : MAYO 4 DE 2010

Fecha: 2010-05-11 16:25:37 Dep. 2020 DIP. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE/II Eva. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 182

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175534520	03/05/2010	\$1,670,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	
		*** N.CREACION PRORROGA DE TERMINOS O	\$3,000.00
		TOTAL :	\$ 83,000.00

SON: OCHENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0020.17511-841-001-8



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-056061- -00000-0000

Fecha: 2010-05-11 16:25:27 Dep. 2030 DIR.NUEVASOR
Tra: 11 PATENTE/II Evt: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 182

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐ Indicación que se solicita una patente.

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐ Indicación que se solicita una PCT

☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐



2020

Bogotá D.C.,

Doctor(a)

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

Apoderado(a) y/o Representante de
SUNTORY HOLDINGS LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	10 56061
	Solicitud internacional	PCT/JF2008/067613
	Fecha inicio fase nacional	12/05/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	10835
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase

Dado en Bogotá DC,

13 JUL 2020

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

adpall