

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-505603

(P2004-505603A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 B O 3 O
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00	A 4 B O 1 8
A 2 3 L 1/05	A 2 3 L 1/30	B 4 B O 2 4
A 2 3 L 1/30	A 6 1 K 31/715	4 B O 4 1
A 6 1 K 31/715	A 6 1 K 31/732	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 163 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-558473 (P2001-558473)	(71) 出願人	502290864 ポアリス エイ/エス デンマーク、ディケイ-1871 フレデリクスバーグ シー、ソーヴァルセンズヴェイ 40 Thorvaldsensvej 40, DK1871 Frederiksberg C, Denmark
(86) (22) 出願日	平成13年2月12日 (2001.2.12)		
(85) 翻訳文提出日	平成14年8月9日 (2002.8.9)		
(86) 国際出願番号	PCT/DK2001/000093		
(87) 国際公開番号	W02001/059137		
(87) 国際公開日	平成13年8月16日 (2001.8.16)		
(31) 優先権主張番号	00610020.0	(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
(32) 優先日	平成12年2月10日 (2000.2.10)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ウルフスコフ、ペター デンマーク、ディケイ-2920 シャルロッテンブルンド、ハストベイ 10
(31) 優先権主張番号	09/544, 988		
(32) 優先日	平成12年4月7日 (2000.4.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物における細胞壁多糖構造の再構築方法

(57) 【要約】

細胞壁複合多糖類—修飾酵素、例えばエンドーラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ、エンドーラムノガラクトツロナンリアーゼ、エンドーガラクタナーゼ、エンドーアラビナナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、β-ガラクトシダーゼのようなガラクトシダーゼ、キシロシダーゼ及びエキソ-ガラクトツロシダーゼの生産を改変するヌクレオチド配列で植物細胞を形質転換することからなる、野生型状態に対して、ペクチン及びヘミセルロースを含む細胞壁複合多糖類構造が修飾されており、修飾が、全体的なグリコシド結合パターン又は単糖プロファイルであるトランスジェニック植物及びその部分の製造方法。修飾は、インビボ又は収穫後に行うことができ、後者の場合、修飾酵素は、例えばゴルジ、小胞体又は液胞に酵素を標的化することによって、その基質から生育中に植物で分離されるか、あるいは、植物では不活性な形態である。収穫後に、酵素をその基質と接触させるか、又は活性化させて、細胞壁多糖類の望ましい修飾を収穫後に得る。トランスジェニック植物物質は、改善された機能を有し、食品及び飼料の製造ならびに医薬もしくは医療上活性な物質として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 核酸構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも 1 つの目的の細胞壁多糖類－修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列からなる核酸構築物を準備し、

(i i) 核酸構築物で植物細胞を形質転換し、かつ

(i i i) その形質転換した植物細胞から、少なくとも 1 つの細胞壁多糖類－修飾酵素の生産が変化している植物細胞培養物、植物組織又はトランスジェニック植物を得て、野生型植物に対して、標的とされる基質細胞壁多糖類が修飾され、少なくとも 1 つの単糖の割合が少なくとも 10 % 変化しているか、又は少なくとも 1 つのグリコシド結合の割合が少なくとも 10 % 変化している単糖プロフィルを有するトランスジェニック植物細胞、植物組織又は植物を得ることからなる、野生型状態に対して、細胞壁複合多糖類構造が修飾されており、その修飾が全体的なグリコシド結合パターン及び単糖プロフィルの少なくとも 1 つである、トランスジェニック植物物質の製造方法。 10

【請求項 2】

構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも 1 つの目的の細胞壁多糖類－修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列が、標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする配列である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

コード配列が、コード配列の発現を管理するプロモーターに操作可能に連結されている請求項 2 に記載の方法。 20

【請求項 4】

生産が改変される、少なくとも 1 つの目的の細胞壁多糖類－修飾酵素が内因性酵素である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも 1 つの目的の細胞壁多糖類－修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列が、標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする内因性配列の発現を調節する配列である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする内因性配列の発現を調節する配列が、リプレッサーの発現を低下させるか、又は内因性の目的細胞壁多糖類－修飾酵素の阻害剤の生産を低下させるアンチセンス配列をコードする配列である請求項 5 に記載の方法。 30

【請求項 7】

標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする内因性配列の発現を調節する配列が、組換え事象後に、内因性の目的の細胞壁修飾酵素に操作可能に連結し、細胞壁－修飾酵素のコード配列の発現を管理できる新たな又は修飾プロモーターの挿入を生じる配列である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも 1 つの目的の細胞壁多糖類－修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列が、組換え事象後に、標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする内因性配列の発現を異なる位置に標的化させる配列である請求項 4 に記載の方法。 40

【請求項 9】

多糖類－修飾酵素が、微生物又は真菌由来である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

核酸構築物が、植物細胞への導入後に、細胞ゲノムに組み込まれないウイルスベクターである請求項 1～6 及び 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

プロモーターが、植物由来である請求項 3 に記載の方法。 50

【請求項 1 2】

プロモーターが、貯蔵器官特異的プロモーターを含む、組織又は器官特異的プロモーターである請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

プロモーターが、顆粒結合型澱粉合成酵素（GBSS）プロモーター及び B 3 3 プロモーターからなる群から選択されるプロモーターを含む、ポテトの塊茎での発現を管理し得るプロモーターである請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

標的とされる細胞壁複合多糖類が、ペクチン及びヘミセルロース多糖類からなる群から選択される請求項 1 ～ 1 3 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 5】

多糖類－修飾酵素が、エンドーラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ、エンドーラムノガラクトツロナンリアーゼ、エンドーガラクタナーゼ、エンドーアラビナナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、例えば β -ガラクトシダーゼ、キシロシダーゼ及びエキソガラクトツロナーゼ及びその類似体又はイソ型からなる群から選択される請求項 1 ～ 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも 1 つの目的の細胞壁多糖類－修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列が宿主植物の内因性遺伝子と十分に異なり、同時抑制を生じない、前記請求項のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 1 7】

補助酵素が目的の細胞壁多糖類－修飾酵素と同時に発現し、同時発現により、多糖類－修飾酵素の基質への接触が促進される前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8】

補助酵素が、メチルエステラーゼ及びアセチルエステラーゼを含むエステラーゼ、ならびにアラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、キシロシダーゼ又はフコシダーゼのようなポリマーからひとつの単糖を除くグリコシダーゼからなる群から選択される請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

(i) 植物細胞での発現により、少なくとも 1 つの細胞壁多糖類－修飾酵素を、通常は存在しない植物細胞の区画に標的化させるか、又は植物細胞で天然に生産され、細胞壁多糖類の生合成に影響を及ぼすポリペプチドの発現を変えるヌクレオチド配列からなる核酸構築物を準備し、

30

(i i) 植物細胞を核酸構築物で形質転換し、かつ

(i i i) 形質転換植物細胞から、少なくとも 1 つの細胞壁多糖類－修飾酵素が野生型植物に対して異なる区画に生じる植物細胞培養物、植物組織又はトランスジェニック植物を得ることからなる、

少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類の植物細胞における生合成を修飾し、野生型状態に対して、細胞壁複合多糖類構造が修飾されており、修飾が全体的なグリコシド結合パターン及び単糖プロフィルの少なくとも 1 つである、トランスジェニック植物物質を得る方法。

40

【請求項 2 0】

得られるトランスジェニック植物細胞、植物組織又は植物において、標的とされる基質細胞壁多糖類が、野生型植物に対して、少なくとも 1 つの単糖の割合が少なくとも 1 0 % 変化するか、又は少なくとも 1 つのグリコシド結合の割合が少なくとも 1 0 % 変化する単糖プロフィルを有するように修飾されている、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

少なくとも 1 つの細胞壁多糖類－修飾酵素が、ゴルジスタックと融合しているか、又はそれから分離している膜小胞を含むゴルジ装置に標的化されている請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

50

植物細胞での発現により、少なくとも1つの細胞壁多糖類－修飾酵素がゴルジ装置に標的化されるヌクレオチド配列が、少なくとも1つの細胞壁多糖類－修飾酵素からなるキメラ遺伝子産物をコードする配列及びゴルジにキメラ遺伝子産物を標的化しうる配列である請求項21に記載の方法。

【請求項23】

標的化配列が、タイプI膜アンカーゴルジタンパク質又はそのフラグメント又は可溶性ゴルジ標的化タンパク質又はそのフラグメントである請求項22に記載の方法。

【請求項24】

可溶性ゴルジ標的化タンパク質が、アカエンドウマメ可逆的グリコシル化性ポリペプチド(RGP1)である請求項23に記載の方法。

10

【請求項25】

タイプI膜アンカーゴルジタンパク質が、シアリルトランスフェラーゼ、N－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ及びガラクトシルトランスフェラーゼからなる群から選択される請求項23に記載の方法。

【請求項26】

植物細胞での発現により、少なくとも1つの細胞壁多糖類－修飾酵素を通常は存在しない植物細胞の区画に標的化させるヌクレオチド配列が、導入される植物細胞ゲノムのプロモーターに操作可能に連結している請求項19～25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

20

(i) 核酸構築物の植物細胞への導入後に、非アポプラスト又は非ゴルジ区画で細胞壁多糖類－修飾酵素を発現させるか、又はインビボの条件では不活性であるが、植物細胞由来の植物物質の収穫後に活性化することのできる形態で、細胞壁多糖類－修飾酵素を発現させるヌクレオチド配列からなる核酸構築物を準備し、

(ii) その核酸構築物で植物細胞を形質転換し、かつ

(iii) 少なくとも1つの細胞壁複合多糖類を、非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素と接触させることにより、又はインビボで不活性な形態で発現される酵素が活性化される条件に収穫した植物物質を付すことにより、適当な収穫後の条件下で、少なくとも1つの細胞壁複合多糖類を収穫後に酵素的に処理できるトランスジェニック植物物質を前記の形質転換植物細胞から得ることからなる、
少なくとも1つの細胞壁複合多糖類が植物物質自体に存在する酵素により収穫後に酵素的に処理される部分を含むトランスジェニック植物を得る方法。

30

【請求項28】

核酸構築物の植物細胞への導入後に、細胞壁多糖類修飾酵素を非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現させるヌクレオチド配列が、植物の生育中に細胞壁多糖類－修飾酵素を液胞、小胞体、細胞質及びプラスチドからなる群から選択される細胞区画に標的化させる配列である請求項27に記載の方法。

【請求項29】

非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素が、植物細胞に導入される核酸構築物に含まれる配列によってエンコードされる請求項28に記載の方法。

40

【請求項30】

非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素が、核酸構築物が導入される細胞ゲノムに存在する内因性配列によってエンコードされる請求項28に記載の方法。

【請求項31】

細胞壁多糖類－修飾酵素が、エンドーポリガラクトツロナーゼ、エンドーペクチンリアーゼ、ペクチートリアーゼ、ラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ、ラムノガラクトツロナンリアーゼ、エンドーグルカナーゼ、エンドーキシラナーゼ及びそのイソ型もしくは類似体からなる群から選択される請求項27～30のいずれかに記載の方法。

【請求項32】

50

細胞壁多糖類－修飾酵素の発現が、植物プロモーターによって管理される請求項 27～31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

植物物質自体に存在する酵素によって収穫後に酵素的に処理される少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類が、ペクチン及びヘミセルロース多糖類からなる群から選択される請求項 27～32 のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

ペクチンの収穫後プロセッシングが、ラムノガラクトツロナンとホモガラクトツロナン領域間の領域である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

植物細胞が、植物物質自体に存在する酵素によって収穫後に酵素的に処理される細胞壁多糖類を含む少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類の構造をインビボで修飾し得る酵素を発現させる核酸配列でさらに形質転換される請求項 27～34 のいずれかに記載の方法。

【請求項 36】

少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類の構造をインビボで修飾し得る酵素を発現させる核酸配列が、細胞壁多糖類－修飾酵素をコードする配列である請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類の構造をインビボで修飾し得る酵素を生じる核酸配列が、細胞壁多糖類－修飾酵素をコードする内因性配列の発現に影響を及ぼす生産物をコードする配列である請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

細胞壁多糖類－修飾酵素がアポプラストに標的化されている請求項 36 又は 37 に記載の方法。

【請求項 39】

少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類の構造をインビボで修飾し得る酵素が、エンドーラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ、エンドーラムノガラクトツロナンリアーゼ、エンドーガラクタナーゼ、エンドーアラビナナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、例えば β -ガラクトシダーゼ、キシロシダーゼ及びエキソ-ガラクトツロナーゼ、その類似体又はイソ型からなる群から選択される請求項 35～38 のいずれかに記載の方法。

【請求項 40】

(i) 請求項 28～39 のいずれかに記載の方法を用いて、トランスジェニック植物を準備し、

(ii) その植物を培養して、収穫し、少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類を植物物質自体に存在する酵素によって収穫後に酵素的に処理できる部分を、植物から単離し、

(iii) その部分を、非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素をその細胞壁多糖類基質と接触させる条件、又はインビボ条件下で不活性な形態で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素が活性化されて修飾細胞壁多糖類を生じる条件に付し、かつ

(iv) 修飾細胞壁多糖類物質を単離することからなる、

野生型状態に対して、構造及び組成が修飾されている、植物細胞壁多糖類物質を得る方法

【請求項 41】

得られる物質中の得られる修飾細胞壁多糖類が、少なくとも 1 つの単糖の割合が少なくとも 10% 変化しているか、又は少なくとも 1 つのグリコシド結合の割合が少なくとも 10% 変化している単糖プロフィルを有するように修飾される請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類が植物物質自体に存在する酵素によって収穫後に酵素的に処理される植物部分が、ポテトの植物部分である請求項 40 又は 41 に記載の方法。

【請求項 43】

収穫後に修飾される細胞壁多糖類が、ペクチンである請求項 39～42 のいずれかに記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 4 4】

請求項 3 9～4 3 の何れかの方法によって得られる、野生型状態に対して構造及び組成が修飾された植物細胞壁多糖類物質。

【請求項 4 5】

請求項 1～1 8 のいずれかの方法によって得られるトランスジェニック植物、又はその植物の子孫もしくはその一部。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載のトランスジェニック植物又はその子孫又は一部から得られる植物細胞壁多糖類含有物質。

10

【請求項 4 7】

対応する野生型細胞壁多糖類を含む物質に対して、少なくとも 1 つの機能特性が変化している、請求項 4 6 に記載の植物細胞壁多糖類－含有物質。

【請求項 4 8】

変化した機能特性が、薬理活性、水結合能、加工性、ゲル化性、粘稠特性及び消化性からなる群から選択される請求項 4 7 に記載の植物細胞壁多糖類－含有物質。

【請求項 4 9】

食品、飼料製品、医薬品又は医療品及び化粧品からなる群から選択される製品の製造における、請求項 4 5 に記載のトランスジェニック植物又はその植物の子孫又はその一部、あるいは請求項 4 6～4 8 のいずれかに記載の植物細胞壁多糖類－含有物質の使用。

20

【請求項 5 0】

医薬組成物、インプラント物質、医療器具、創傷ドレッシング及び外科粘着剤からなる群から選択される製品を含む、請求項 4 6～4 8 のいずれかに記載の植物細胞壁多糖類－含有物質からなる医薬品又は医療品。

【請求項 5 1】

請求項 1 9～3 9 のいずれかに記載の方法によって得られるトランスジェニック植物又はその植物の子孫又はその一部。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載のトランスジェニック植物又はその子孫又は一部から得られる植物細胞壁多糖類－含有物質。

30

【請求項 5 3】

対応する野生型細胞壁多糖類を含む物質に対して、少なくとも 1 つの機能特性が変化している請求項 5 2 に記載の植物細胞壁多糖類－含有物質。

【請求項 5 4】

変化した機能特性が、薬理活性、水結合能、加工性、ゲル化性、粘稠特性及び消化性からなる群から選択される請求項 5 3 に記載の植物細胞壁多糖類－含有物質。

【請求項 5 5】

食品、飼料製品、医薬品又は医療品及び化粧品からなる群から選択される製品の製造における、請求項 5 1 に記載のトランスジェニック植物又はその植物の子孫又はその一部、あるいは請求項 5 2～5 4 のいずれかに記載の植物細胞壁多糖類－含有物質の使用。

40

【請求項 5 6】

医薬組成物、インプラント物質、医療器具、創傷ドレッシング及び外科粘着剤からなる群から選択される製品を含む、請求項 5 2～5 4 のいずれかに記載の植物細胞壁多糖類－含有物質からなる医薬品又は医療品。

【請求項 5 7】

(i) 請求項 1～1 8 及び 1 9～3 9 のいずれかに記載の方法を用いて、培養可能なトランスジェニック植物、又は培養可能なその子孫を準備し、

(i i) 適当な植物培養条件下でそのトランスジェニック植物又はその子孫を培養し、修飾構造及び／又は修飾組成を有する少なくとも 1 つの細胞壁複合多糖類からなる植物物質を得て、かつ

50

(i i i) 修飾細胞壁多糖類からなる物質を培養した植物から単離することからなる、野生型状態の対応する細胞壁多糖類に対して、修飾構造及び／又は修飾組成を有する、植物細胞壁複合多糖類からなる物質の製造方法。

【請求項 5 8】

培養される植物又はその子孫がポテト植物である請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

培養植物から単離される物質が、野生型植物に対して、少なくとも 1 つの単糖の割合が少なくとも 1 0 % 変化しているか、又は少なくとも 1 つのグリコシド結合の割合が少なくとも 1 0 % 変化している単糖プロフィルを有するように修飾されている細胞壁多糖類からなる、請求項 5 7 又は 5 8 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

発明の分野

この発明は、多糖－修飾酵素をインビボで発現させることによる、高等植物における細胞壁の多糖構造の再構築方法に関する。

【0 0 0 2】

技術的背景、従来技術及び本発明の顕著な特徴

高等植物の細胞壁は、セルロース、大部分がヘミセルロースポリマーの構造を有する内部連結荷、ペクチンマトリクスポリマー及び球状ならびに非球状のタンパク質からなる。球状タンパク質という潜在的な例外のほかは、全てのポリマー群は、細胞壁で構造上の役割を果たしている。細胞壁が成熟するにつれて、鎖間及び鎖内双方の架橋結合が形成され、ついにはリグニンが細胞壁に堆積して、細胞壁をかなり安定化し、この結果、その成分への分離、消化及び処理が困難なものとなっている。

20

【0 0 0 3】

この発明は、細胞壁の複合多糖類構造に関してインビボでのコントロールを獲得することに関する。細胞壁ポリマーのうち、半結晶性のセルロースマイクロフィブリル単体は、表皮細胞壁に見られる非糖分子、つまりタンパク質、リグニンならびにスベリン及びワックスから構築される種々の種類のポリマーのように、この群から除かれる。ヘミセルロース及びペクチンは広義では細胞壁の複合多糖類群を規定するが、特定の種又は組織で特に豊富であるか又は重要である場合により狭い分類を示す名称によって称される場合がある。少数の例を示せば、カラムツ木のアラビノガラクトン及び穀物種のβ－グルカンである。この発明の関係で、細胞壁複合多糖類群から除かれるのは、構造上の成分ではないが、他の目的、一般には種子の発芽中に再移動される炭水化物の貯蔵に資する多糖類群である。グアー中にあるようなガラクトマンナン、及びタマリンド中にあるようなキシログルカンが 2 つの例である。

30

【0 0 0 4】

ヘミセルロースポリマーは、一方で、イネ科の草本、カヤツリグサ及びそれらに密接に関連する群に属する植物、及び他方で維管束植物群の種類と数度を異にしている。C a r p i t a と G i b e a u t (1 9 9 3) は、タイプ－I 細胞壁として非草本型細胞壁、及びタイプ－I I 細胞壁として草本型細胞壁を挙げている。タイプ－I の一次細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース及びペクチンがほぼ等量であることによって特徴付けられる。未分化細胞で優勢なヘミセルロースポリマーは、キシログルカン（上記の種子貯蔵キシログルカンと混同すべきではない）である。

40

キシログルカンは、タイプ－I I 細胞壁では少数のヘミセルロース多糖類であり（～5 % ）、ペクチンもタイプ－I 細胞壁に比較して多くはない。ヘミセルロースポリマー、つまりキシラン、アラビノキシラン及びグルカンの広範囲な群は、タイプ－I I 細胞壁のヘミセルロースポリマーの残りを構成する。これらのヘミセルロースポリマーは、タイプ－I I 細胞壁の多糖構造の再建に用いる場合、本発明に特に関連する目的物である。タイプ－I 細胞壁については、本発明は、マトリクスポリマー、つまりペクチン用に特に開発されている。

50

【0005】

ペクチンは、2つの基本部分、つまりガラクトツロン酸残基からなる本質的に非分枝のポリマー（ホモガラクトツロナン、平滑領域としても公知）、及び、長い中性側鎖で置換され得る、ラムノシル及びガラクトツロノシル残基が交互になっているポリマー（ラムノガラクトツロナンI、「毛（hair）」を有し、毛状（hairy）領域としても公知）からなる。ペクチン多糖類は、双子葉植物細胞壁の30～50%を構成する（Carpita 及びGibeaut 1993）。植物細胞壁のペクチンマトリクスは、ホモガラクトツロナン（HGA）、ラムノガラクトツロナンI（RG-I）及びラムノガラクトツロナンII（RG-II）ポリマーの複合混合物である（Voragenら、1995）。HGAは、特異にメチルエステル化及び／又はアセチル化され得る1, 4 結合 α -D-ガラクトツロン酸（GalA）残基の非分枝鎖である。比較的エステル化されていないHGAの長さ（接合領域）は他のHGA分子の類似領域と Ca^{2+} 架橋結合し、ゲルを形成し得るポリマー及び高次構造を形成できるが、高度にエステル化されたHGAはカルシウム促進ゲル化の可能性を低減させる。他の機序によるゲル化は、しばしばメチルエステル含量の高さに依存している。RG-Iは1, 2- α -L-ラムノース（Rha）と1, 4- α -D-GalA 残基が交互になった分枝ヘテロポリマーで（Lauら、1985）、RG-I 骨格のラムノース（Rha）残基に優性に結合している1, 4- β -D-ガラクトース（Gal）及び／又は1, 5- α -L-アラビノース（Ara）残基の中性側鎖を有している。それらは、単一の単位（ β -D-Galp-（1（4））又はアラビノガラクトタンI及びアラビナンのようなポリマーであってもよい。アラビノガラクトタンの別のタイプである、アラビノガラクトタンIIは、主にタンパク質（アラビノガラクトタンタンパク質）と結合している。毛の分枝パターンは、種依存性である。RG-Iの側鎖は、フェルラ酸のようなヒドロキシシナミン酸残基を介したエステル結合によって他のペクチン分子に架橋結合していてもよい（Fry 1986）。ホモガラクトツロナン（HG）とラムノガラクトツロナンI（RG-I）は共有結合していることが、一般に認められている。しかし、平滑領域及び毛状領域の正確な配列ストレッチは、決定されるべき状態のままである。高度に保存されたRG-II分子は、ジエステルホウ酸架橋結合で二量体化しうる、既知の糖と結合が最も多様な側鎖で装飾されたホモガラクトツロナン骨格を有している（O'Neillら、1996）。

【0006】

細胞壁の孔度を決定するほかに、シグナル分子（オリゴサッカリン）源としての（Cotte 及びHahn 1994）、細胞付着の制御、細胞膨張（McCann 及びRoberts 1994）、細胞壁の機械特性（Chanliaud 及びGidley 1997）及び細胞の分化ならびに器官形成における関与（Sato 1998）を含むさらなる役割がペクチンポリマーに提案されている。食品での適用に対するペクチンの適性は、その分子量、中性糖含量、毛状領域に対する平滑領域の割合、メチル及びアセチルエステル化の程度、ならびにホモガラクトツロナン骨格に沿ったこれらのエステル基の分布を含む多くのパラメータによって監督下に置かれている（Daasら、1998, Bracciniら、1999）。例えば、 Ca^{2+} とのホモガラクトツロナンの架橋は、毛がごく少量しか存在しない場合に促進され、その結果、安定性を増したゲルが形成される。

【0007】

多くの豊富な源、例えばポテトの塊茎及びビート糖に由来するペクチンの一次構造は、例えばリング又は柑橘系のペクチンと比較すると、食品への適用に対し品質が劣っている。特に、ポテトペクチンの毛状領域の割合は極めて高く、メチルエステル化の程度が極めて低い（Rydenら、1990）。後者は、収穫後に作用するペクチンメチルエステラーゼによって引き起こされている可能性がある。内因性酵素活性に伴う別の問題は阻止できないので、ポテトのペクチン構造の調整は、十分なゲル化特性を生じさせ、高品質なペクチンと競合させる必要がある。ヒトの細胞及び組織に生理的に作用する幾つかのペクチン製剤は植物から抽出されており

、ヒト由来の高分子複合体との生化学的作用が立証されている (Paulsen 2000)。例えば、毛状領域由来の化合物はインビトロで補体系と相互作用することが示され、この結果、これらの化合物が免疫系に作用する(免疫調節)可能性があることが推論されている (Samuelsonら、1998, 1999, Yamada 及び Kiyohara 1999)。しかし、多くの医薬上の要求は、活性製剤があまり特徴付けられていないために疑問視されている。したがって、ペクチン構造に関するコントロールの欠如は、これらの生化学的/生理学的活性に対する正確な構造-活性関係の決定を排除している。

【0008】

ペクチンの製造において、又は現在の新たな適用に合うように多糖類の特性を変える手段として、ペクチン及び他の植物細胞壁多糖類を酵素で処理する概念は、最近20年にわたってかなりの注目を集めるものとなっている。これらの酵素には、特にグルカナーゼ、キシログルカナーゼ、セルラーゼ、フコシダーゼ、キシラナーゼ、エンドーポリガラクトツロナーゼ(エンドーPGつまりEPG)、ペクチンエステラーゼ、アセチル基で装飾された多糖類の種々の群に特異的なアセチルエステラーゼ、ペクチンリアーゼ、エキソポリガラクトツロナーゼ及びペクテートリアーゼが含まれる。また、ラムノガラクトツロナーゼ、ラムノガラクトツロナンリアーゼ、ガラクタナーゼ、アラビナナーゼ及び相当するフラノシダーゼの新たな群が注目を集めている。 α -及び β -特異的酵素のいずれも、興味深い。一例としてガラクトシダーゼを用いると、幾つかのイソ形態の α -ガラクトシダーゼがガラクトマンナンを移動させることができ、特定の β -特異的な変異体がペクチンガラクトタン

10

20

【0009】

上記の点から、問題の多糖類、例えばペクチンが細胞壁の非常に複雑な成分で、個々の多糖類の微細な構造がますます理解されていることは明らかである。ポリマーの複雑さを考慮すれば、その分解に多くの酵素が関わっていることは驚くに値せず、それは翻って、大きな「ツールボックス」がこれらのポリマーの再建に利用可能であることを意味している。

30

しかし、植物細胞壁多糖類の修飾に現在利用可能な概念は、主として収穫後の方法に基づいている。これは収穫後の方法を用いてペクチンを修飾する事例で、その方法では、ペクチンを由来植物から最初に抽出し、その後のみ、所定の適用に対して所望の特徴をもつ修飾ペクチンが得られるようにペクチンを修飾に付す。

【0010】

これに対し、現在利用可能でないか、又は技術的及び/又は経済的理由から実行できない種々の可能性の範囲を広げるので、例えばペクチンに関しては、ペクチン構造、例えば毛状領域の構造を修飾することによって、インビボで細胞壁多糖類を修飾できる利点がある。したがって、本発明のひとつの主たる目的は、生植物におけるペクチン構造を含む複合多糖構造に関しコントロールを獲得し、それによって、親植物に比較して新たな細胞壁多糖類構造を有する再構築された細胞壁多糖類を含む植物物質を得ることである。ここで用いられるように、用語「新たな多糖類構造」及び「新たなペクチン構造」は、新たな配置を有する、及び/又はポリマーの単糖構築ブロックの割合が変化した、ポリマーを意味する。後述するように結合パターンを決定する際には、(例えば熟成中にみられるような)分子量のシフトダウンに起因する新たな末端基の定量的に些細な量を見逃し、大きさのみが変えられたポリマーを新たな構造物としてはここではみなさない。単糖プロフィル及び結合パターン双方の決定では、非糖置換基での装飾も見逃し、例えばメチルエステル化の増加によってのみ異なる多糖類を新たな構造物とみなさない。したがって、この発明は、現在の技術に対し、上記の新規な細胞壁複合多糖類構造のインビボでの生成を提供する。

40

【0011】

50

以下（及び以下の実施例）で、インビボで植物細胞壁複合多糖類構造を修飾する可能性を、一例としてポテトを用いるペクチン構造に関して例示する。この発明は、ペクチン又はポテトにいかなる方法でも限定されないが、この発明は、大きな範囲の細胞壁多糖類を修飾するのに有用であり、多くの穀物種及び塊茎に加えて多くの植物器官に関連している。しかし、ポテトはそれ自体（ボイルして、焼いて等）として、又は加工（フレンチフライ、チップ、ピューレ）した後に消費されるのみならず、多くの産業上の適用に使用できる高品質の澱粉を生産するので、多くの国で重要な穀物である。ポテトの塊茎から澱粉を抽出後、主として動物飼料で適用される実質量の（線維及びタンパク質のような）副産物が残る。しかし、これらの副産物は、より高い価値のある製品を生じる可能性のある成分を含んでいる。ポテトの線維画分は、細胞内容物のパッケージング物質、つまり植物細胞壁をともに形成する種々の多糖類の集まりである。これらのうち、ペクチンは、多くの食品での適用において既知のゲル化剤であるので、おそらくもっとも興味深いポリマーである（Visser 及び Voragen 1996, Daasら、1998）。

10

【0012】

この発明によれば、例えばエステル基でのホモガラクトツロナンの装飾よりむしろ、ペクチンの毛状領域に特に焦点が当てられている。毛状領域の量は、ウロン酸に対する中性糖の割合を決定づける。この割合が高い場合には、ペクチンの水結合能も高い。これは、幾つかの食品での適用ならびに非食品での適用に望ましい可能性がある。この割合が低ければ、ペクチンの構造は、食品産業に通常好ましい柑橘系ペクチンの構造に近づく。したがって、ウロン酸に対する中性糖の割合を低下させることは、例えばポテトの澱粉及びビート

20

糖の生産に由来する髄質副産物の物価維持安定策に重要である。したがって、この発明の別の重要な目的は、遺伝修飾によって生育しているペクチンの毛状領域の割合を低下させることである。ポテトペクチンのゲル化特性の改善に加えて、これは、澱粉の抽出処理を容易にし、その結果澱粉の収率を高くするはずである。

【0013】

別の目的は、粘度の低い食品（例えばドリンク型ヨーグルト及び類似乳製品）にそれらを用いるため、ペクチンの毛状領域を調整し、回復させることである。「自己プロセッシング」塊茎（又は一般に自己プロセッシング植物物質）として表されるこの発明の詳細な具体例は、この要求に応える別の技術を提供している。「自己プロセッシング」は、植物組織が、収穫後の崩壊によって、細胞内に貯蔵された酵素を放出する性質を意味する。放出された酵素は、細胞壁物質の修飾、一般には容易な回復のために当該多糖類又はオリゴ糖類の切除を触媒する。この技術は、調整されたペクチンポリマー及びこれらから誘導されるオリゴマーの医療用途にも適用できる。

30

【0014】

分解酵素を利用するペクチンポリマー構造の収穫後修飾とは対照的に、インビボの修飾は、生合成酵素をエンコードする遺伝子又はシンセターゼ複合体の成分をも利用することができる。シンセターゼ又は装飾（decorative）酵素の活性をアップー又はダウンレギュレーションすることは、設計の選択肢を広げるものと認められる。少数の装飾トランスフェラーゼが同定されており、この点で価値のあることが分かっている（Perrinら、1999, Edwardsら、1999, WO 99/60103）。このような酵素は、この発明によるペクチン修飾の候補である。

40

ヌクレオチド糖の相互変換に関与する酵素は幾つかが知られており、特徴付けられた変異体に基づけば（以下参照）、これらの酵素をエンコードする遺伝子は、ペクチン及び他の細胞壁多糖類の生合成に関する間接的な操作に有用であると考えられる。しかし、インビボでペクチンを修飾する好ましい手段は、現在、収穫後のペクチン修飾に有用であることが既に立証されている多糖類－修飾酵素をエンコードする遺伝子である。

【0015】

修飾細胞壁表現型を示す幾つかのシロイヌナズナ（*Arabidopsis*）変異体が、単離されている。これらの幾つかは、ヌクレオチド糖プールのレベルで影響を受けている。既存の細胞壁突然変異体のうち唯一のmur 8は、ラムノースを欠いているので、特

50

異的なペクチン突然変異体であると思われ (Reiterら、1997)、mur 1 (フコース欠損) 及び mur 4 (アラビノース還元) (Mayer 1998) は、他の細胞壁多糖類のうちでペクチンに影響を及ぼしていると思われる。しかし、このような突然変異体は、シロイヌナズナでは管理できるが、細胞壁多糖類の修飾に関わる穀物植物では管理できない、ランダムな方法で生じる。

WO 91/08299号は、果実熟成のコントロールを目的にアンチセンス技術を用いる植物細胞での遺伝子産物の生産阻害方法を開示している。目的遺伝子には、ペクチンエステラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ及びキシラナーゼが含まれる。したがって、この開示は、ここで提供される、新たな細胞壁複合多糖類のインビボでの製造に関連していない。

10

【0016】

WO 99/07857号は、ペクテートリアーゼ活性が変化している植物及びトランスジェニック植物ならびにその部分及びその子孫由来の、ペクテートリアーゼをエンコードする核酸を開示している。植物でのペクテートリアーゼ活性の増加がペクチンに変化をもたらすことは明らかであるが、この変化は、ペクチンポリマーの分子量変化が生じ得る意味で唯一である。しかし、これは、ここに記載するような新たなペクチン構造をもたらすものではない。

WO 93/13212号は、例えばペクチンエステラーゼ活性を低下させるトマトの形質転換用のペクチンエステラーゼイソ酵素をエンコードするDNAを開示している。

【0017】

Sorensenら (1999) によって示された "Modification of pectin by expression of a fungal endo-beta-1,4-galactanase in potato" と題されたポスターは、RG-Iのラムノース残基に結合した線状ガラクトサンの量を低下させることによって、ポテトペクチンの毛状領域を修飾することが望ましく、またアスペルギルス・アキュリータス (*Aspergillus aculeatus*) 由来の真菌性エンドーガラクタナーゼによって、これらのガラクトサンを分解できることが期待されることを示唆している。このポスターは、顆粒結合型澱粉合成酵素 (GBSS) のプロモーター又はパタチンのプロモーターの制御下、葉及び塊茎でガラクタナーゼ遺伝子を発現するトランスジェニック植物が生産されるが、細胞壁多糖類におけるガラクタナーゼ発現の潜在的な作用は、理論的にも実験によっても目的とされていなかったことを報告している。

20

30

つまり、従来技術は、植物細胞壁で熟成過程をコントロールできること、またこれらの操作は、ポリマーの分子量分布及びメチルエステル化のような置換での装飾を変えることができることを示唆している。熟成についてのこのコントロールの獲得が可能であることは、熟成が進行速度に関してすでに制御されている植物の自然の過程であるから、驚くに値しない。しかし、この明細書で、このような変化は、新たな細胞壁多糖類構造によって伴われるので、無視される。

【0018】

何人かの研究者は、細胞壁の性質における遺伝子発現についてむしろ不特定の下流での作用を提案しているが、特定技術は開発されていない。植物が、積極的に、注意深く制御された方法で、生育中にその細胞壁を代謝することを考慮すれば、細胞壁の代謝の自然な進行の単なる加速又は減速以上の細胞壁の再構築を植物が許容できることは、極めて驚くべきことである。しかし、ポリマーのエステル化と分子量変化が優勢である一方、ポリマー組成は大部分同じままの従来技術で立証されるように、熟成の遅延に伴う細胞壁の代謝の速度変化と、標的とされる細胞壁複合多糖類を調整し、例えばメチル化分析によって測定される単糖プロフィル及び／又は全体的な結合パターンにおいて高度に予測可能な変化を生じる新たな技術を提供するこの発明の達成とは、明らかに区別する必要がある。

40

したがって、この発明は、植物細胞壁複合多糖類について標的とされる、特異的な再構築又は修飾のための新たな技術に関する。一般に、この技術の利点は、4つの広いカテゴリーに分けられる。

50

【0019】

1. 穀物植物の作物特性の改良

修飾植物の構造。

細胞壁の代謝経過での選択的な干渉は、細胞の分化、形態及び生育に影響を及ぼす。自己剪定 (Self-pruning) 植物は、例えば細胞の運命及び生育の経過の決定に重要な細胞壁成分を修飾して設計してもよい。

稔性。

細胞の分離が種子の散布 (WO 97/13865)、花粉の散布及び花柱中央のラメラに沿った花粉管の成長のように重要な生育過程である場合、生育過程は、細胞壁の修飾によって変化し得る。

10

病原体の侵入。

病原性の真菌及び細菌は、宿主細胞壁の構造に合う一連の多糖類分解酵素の組織的な展開によって植物組織に侵入する。この技術は、侵入を遅らすように細胞壁を変える手段を提供する。シグナル分子、いわゆるオリゴサッカリンは病原体の侵入中に細胞壁から放出されるので、新たな細胞壁構造は細胞壁からのオリゴサッカリンの放出について種々のパターンを生じ、この結果、病原の進路を変更する。症状の進行の低下が達成されるであろう。

【0020】

2. 植物生産物の改良

食物繊維。

20

細胞壁の修飾を用いて、食品中の食物繊維の数度を増し、不溶性食物繊維と、頻繁に多くの健康上の要求が伴われる可溶性食物繊維との割合を変えてもよい。

テクスチャー。

細胞壁は、野菜及び果実のテクスチャーの原因で、貯蔵に伴うテクスチャー変化において役割を果たしている。したがって、テクスチャー及び貯蔵寿命の双方が、本発明を用いる修飾の対象である。貯蔵寿命に関わるが、ここに提示される技術は、従来技術に記載されるようなトランスジェニック修飾による熟成のコントロール（加速又は遅延）を補完している。

材料特性。

木及び線維の構造特性は、全体的な植物解剖学、線維細胞結合構造、二次細胞壁形成、木化及び構成している多糖類ポリマーに依っている。後者から生ずる植物物質特性は、この発明によって可能となった標的とされる細胞壁の設計によって改善することができる。インプラント及び幾つかの医療器具のコーティング用の医療用物質、ハイドロコロイドに関連する特性には、水結合能が含まれる。水結合能は、例えば本発明によって可能となったようなペクチン構造の修飾によってコントロールすることができる（以下の4.「調整ペクチン」参照）。

30

【0021】

副産物に対する付加価値。

紙又は繊維の製造、醸造、澱粉又は糖の製造に由来する髄質が、特定産業の用途基準を満たさない植物複合多糖類の多い由来源である場合、この発明を問題の穀物植物の設計に用い、それを価値の高い多糖類源にすることによって、髄質の物価を維持安定させることができる。その一例は、以下に例示するようなペクチン画分での物価維持安定策を目的とすることである。

40

機能的飼料の細胞壁組成は主として消化性、及びそれにより家畜及び家禽での窒素の使用効率を決定づけている。特に、非反芻動物、例えば若い子豚及び家禽では、細胞壁多糖類の消化性は、効率的な飼料利用の点で制限因子である。ここに示される新たな技術を適用することにより、消化性に優れた飼料品がもたらされ、この結果、動物の成長速度を改善することができる。反芻動物では、多糖類及び細胞壁成分の消化性の増加は、反芻動物でのタンパク質分解に影響を及ぼす。というのは、反芻動物の微生物は、タンパク質の代わりに放出されたサッカリンを利用し、こうしてタンパク質を第一胃であまり分解せず、ア

50

ンモニアをあまり生ぜず、こうして増加した多糖類及び細胞壁成分の消化性が第一胃での分解からタンパク質を助け、それにより多くのタンパク質成分が腸内で溶解されるためである。こうして改善された細胞壁成分及び多糖類の消化性は、タンパク質の利用を増し、第一胃の分解タンパク質からのアンモニア又は窒素の排出を低下する。

【0022】

3. プロセッシング特徴の改善

飲料濾過特性。

植物物質の液化は、例えば収率を増し、フィルターの凝固を妨げるための食品産業酵素を用いて、ジュース及びワインの製造に適用される。この発明は、これらの実践を補完したり、又はこれに替わって、そのような処理のあいだ問題を引起こす多糖類画分を減少／除去する点で有用である。 10

麦芽製造特性。

麦芽製造中、澱粉は分解するが、穀果の分化した細胞壁のβ-グルカンのみが可溶化され、ビールの透明性に問題を生じる可能性がある。この問題に対する大部分の生物科学的な技術方法はβ-グルカンを完全に消化できる酵母を設計で製造することに向けられているが、この発明を利用すると、細胞壁のβ-グルカン成分のプロセッシング特性を改善し、一般に麦芽製造中のプロセッシングを改良して、さらに最終製品を改良することができる。

【0023】

ベーキング特性。

ドウの流動学的特性は、細胞壁多糖類に作用するキシラナーゼ及びグルカナーゼの活性が多い技術的な酵素を用いてしばしば変えられる。細胞壁多糖類がこの発明を用いて望ましいようにすでに修飾されている原料物質は、技術的酵素を付加する実践を補完するか、又はこれに替わることができる。さらに、多糖類及び細胞壁成分の他の修飾は、ドウの特性を改善し、ベーキング特性を改良する。 20

繊維の軟化。

例えば亜麻の繊維は、産業上の酵素処理を用いて、又は軟化（retting）として既知の伝統的な「発酵」処理によって単離される。繊維自体、又は繊維が埋め込まれている組織が、この発明によって可能となったような細胞壁特性に関して修飾されている繊維植物を用いて、取って替わるか、又は補完してもよい。さらに、織物として用いられる他の植物繊維（綿、麻など）の（プロセッシングを含む）改良も、この発明の技術を用いて行うことができる。 30

【0024】

4. 単離された多糖類

食品成分及び添加剤としての調整ペクチン。

計画的なペクチンは、例えば上記のような品質の劣っているペクチンを通常含む植物物質から、この発明を用いて得ることができる。一般に、このような技術の利点には、低粘度のペクチンの生理活性の維持、エステル分布の均一性、低粘度の高分子量ペクチンの製造、排水からの酸の除去及び分子量の損失がない少量のエステルペクチンの製造が含まれる。他の利点には、簡単なプロセッシング、高収率、高強度、安価な原材料の利用、緩やかな処理条件、回収の容易性、低コスト、プロセッシングに関する低い環境衝撃及び高品質が含まれる。さらに、この技術は、例えば嗜好に合わない外観の形成に関わる望ましくない多糖類及び細胞壁成分を除き、低品質成分の「材料」の品質を改善できるので、（例えば従来の抽出手法の大部分をなくして製造される）非精製品も利用する。 40

【0025】

医療材料及び医薬品としての調整ペクチン。

ペクチンを含む細胞壁多糖類から得られる生物活性な多糖類及びオリゴ糖は、多くが外来植物の幾つかの植物種で検出される。この発明は、細胞壁多糖ポリマー構造に関する有意なコントロールを提供し、例えば穀物植物の多糖類及びオリゴ糖類をデザインし、その結果、生物活性にすることができる。例えば、1以上の特定の穀物植物について最適化されている、製糖所、澱粉の製造所、醸造所などの周知のプロセッシング工程を用いるプロセシ 50

ングで、効率がよく、コストが低いことは、利点に含まれる。

【0026】

発明の要約

最初の観点において、この発明は、野生型状態に対して、細胞壁複合多糖類構造が修飾されており、その修飾が全体的なグリコシド結合パターン及び単糖プロフィルの少なくとも1つである、トランスジェニック植物物質の製造方法に関する。その方法は、(i) 核酸構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも1つの目的の細胞壁多糖類—修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列からなる核酸構築物を準備し、(ii) 核酸構築物で植物細胞を形質転換し、かつ(iii) その形質転換した植物細胞から、少なくとも1つの細胞壁多糖類—修飾酵素の生産が変化している植物細胞培養物、植物組織又はトランスジェニック植物を得て、野生型植物に対して、標的とされる基質細胞壁多糖類が修飾され、少なくとも1つの単糖の割合が少なくとも10%変化しているか、又は少なくとも1つのグリコシド結合の割合が少なくとも10%変化している単糖プロフィルを有するトランスジェニック植物細胞、植物組織又は植物を得る工程からなる。

10

【0027】

ひとつの具体例において、構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも1つの目的の細胞壁多糖類—修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列は、そのような酵素、コード化配列がコード化配列の発現を管理するプロモーター（例えば植物組織のような植物由来のプロモーター又はある貯蔵器官に特異的なプロモーターを含む器官特異的なプロモーター）に操作可能に連結されている具体例を含む、標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る、真菌又は微生物由来の細胞壁多糖類—修飾酵素をコードする配列である。この明細書において、興味深いプロモーターは、顆粒結合型澱粉合成酵素（GBSS）プロモーター及びB33プロモーターからなる群から選択されるプロモーターを含む、ポテトの塊茎で細胞壁多糖類—修飾酵素の発現を管理できるプロモーターである。

20

【0028】

さらなる具体例において、その生産が改変される、少なくとも1つの目的の細胞壁多糖類—修飾酵素は、内因性酵素、つまり、核酸構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも1つの目的の細胞壁多糖類—修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列が、標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする内因性配列の発現を調節する配列である具体例を含む、形質転換植物細胞で天然に生産される酵素である。そのような具体例の一例として、標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする内因性配列の発現を調節する配列は、リプレッサーの発現を低下させるか、又は内因性の目的の細胞壁多糖類—修飾酵素の阻害剤の生産を低下させるアンチセンス配列をコードする配列である。別の例において、標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする内因性配列の発現を調節する配列は、組換え事象後に、内因性の目的の細胞壁—修飾酵素に操作可能に連結し、細胞壁—修飾酵素のコード配列の発現を管理できる新たな又は修飾プロモーターの挿入を生じる配列である。

30

【0029】

上記方法の別の具体例で、構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも1つの目的の細胞壁多糖類—修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列は、組換え事象後に、標的とされる細胞壁多糖類を修飾し得る酵素をコードする内因性配列の発現を、そのような酵素が通常は存在しない植物細胞での位置に標的化させる配列である。

40

上記方法の有用な具体例では、核酸構築物は、植物細胞への導入後に、細胞ゲノムに組み込まれないウイルスベクターである。

上記方法の詳細な具体例では、細胞壁多糖類—修飾酵素によって修飾される標的とされる細胞壁複合多糖類は、ペクチン又はヘミセルロース多糖類である。適当なペクチン又はヘミセルロース修飾酵素には、エンドーラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ、エンドーラムノガラクトツロナンリアーゼ、エンドーガラクタナーゼ、エンドーアラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、例えばβ-ガラクトシダーゼ、キシロシダーゼ及びエキソーガラクトツロナーゼ及びその類似体（ortholog）又はイソ型が含まれる

50

。

【0030】

上記方法のさらに別の具体例では、構築物の植物細胞への導入後に、少なくとも1つの目的の細胞壁多糖類—修飾酵素の生産を改変するヌクレオチド配列は、宿主植物の内因性遺伝子と十分に異なり、同時抑制（*co-suppression*）を生じない。

上記方法のさらに別の具体例では、補助酵素には、一例としてメチルエステラーゼ、アセチルエステラーゼ又はアラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、キシロシダーゼもしくはフコシダーゼのようなポリマーからひとつの単糖を除くグリコシダーゼが含まれるが、これは目的の細胞壁多糖類—修飾酵素とともに同時発現され、その同時発現によって多糖類—修飾酵素のその基質への接触を促進する。

10

【0031】

さらなる観点では、この発明は、少なくとも1つの細胞壁複合多糖類の植物細胞における生合成を修飾し、野生型状態に対して、細胞壁複合多糖類構造が修飾されており、修飾が全体的なグリコシド結合パターン及び単糖プロフィルの少なくとも1つである、トランスジェニック植物物質を得る方法に関する。この方法は、以下の工程からなる：（i）植物細胞での発現により、少なくとも1つの細胞壁多糖類—修飾酵素を、通常は存在しない植物細胞の区画に標的化させるか、又は植物細胞で天然に生産され、細胞壁多糖類の生合成に影響を及ぼすポリペプチドの発現を変えるヌクレオチド配列からなる核酸構築物を準備し、（ii）植物細胞を核酸構築物で形質転換し、かつ（iii）形質転換植物細胞から、少なくとも1つの細胞壁多糖類—修飾酵素が野生型植物に対して異なる区画に生じる植物細胞培養物、植物組織又はトランスジェニック植物を得る。

20

【0032】

上記方法には、得られたトランスジェニック植物細胞、植物組織又は植物において、標的とされる基質の細胞壁多糖類が野生型植物に対し、少なくとも1つの単糖の割合が少なくとも10%変化しているか、又は少なくとも1つのグリコシド結合の割合が少なくとも10%変化している単糖プロフィルを有するように修飾されている具体例が含まれる。

【0033】

上記方法のさらなる具体例において、少なくとも1つの細胞壁多糖類—修飾酵素は、ゴルジスタックと融合しているか、又はそれから分離している膜小胞を含むゴルジ装置に標的化されている。これには、植物細胞での発現により、少なくとも1つの細胞壁多糖類—修飾酵素がゴルジ装置に標的化されるヌクレオチド配列が、少なくとも1つの細胞壁多糖類—修飾酵素からなるキメラ遺伝子産物をコードする配列及びゴルジにキメラ遺伝子産物を標的化しうる配列である具体例が含まれる。このような標的化遺伝子は、例えばそのフラグメントを含むタイプII膜アンカーゴルジタンパク質、例えばシアリルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ又はガラクトシルトランスフェラーゼ、又は可溶性ゴルジ標的化タンパク質、例えばアカエンドウマメ（*Pisum sativum*）可逆的グリコシル化性（*glycosylatable*）ポリペプチド（*RGP1*）又はそのフラグメントである。

30

【0034】

細胞壁多糖類の生合成を修飾するための上記方法の別の具体例では、植物細胞での発現により、少なくとも1つの細胞壁多糖類—修飾酵素を、通常は存在しない植物細胞の区画に標的化させるヌクレオチド配列は、導入される植物細胞ゲノムのプロモーターに操作可能に連結される。

40

【0035】

別の観点では、この発明は、少なくとも1つの細胞壁複合多糖類、例えばペクチン又はヘミセルロース多糖類が植物物質自体に存在する酵素により収穫後に酵素的に処理される部分からなるトランスジェニック植物、つまり「自己プロセッシング」植物を得る方法に関する。その方法は、以下からなる：（i）核酸構築物の植物細胞への導入後に、植物細胞の非アポプラスト又は非ゴルジ区画で細胞壁多糖類—修飾酵素を発現させるか、又はイン

50

ビボの条件では不活性であるが、植物細胞由来の植物物質の収穫後に活性化することのできる形態で、細胞壁多糖類－修飾酵素を発現させるヌクレオチド配列からなる核酸構築物を準備し、(i i) その核酸構築物で植物細胞を形質転換し、かつ(i i i) 少なくとも1つの細胞壁複合多糖類を、非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素と接触させることにより、又はインビボで不活性な形態で発現される酵素が活性化される条件に収穫した植物物質を付すことにより、適当な収穫後の条件下で、少なくとも1つの細胞壁複合多糖類を収穫後に酵素的に処理できるトランスジェニック植物物質を、前記の形質転換植物細胞から得る。

【0036】

ひとつの詳細な具体例で、核酸構築物の植物細胞への導入後に、細胞壁－多糖類修飾酵素を非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現させるヌクレオチド配列は、植物の生育中に、細胞壁多糖類－修飾酵素を、液胞、小胞体、細胞質及びプラスチドからなる群から選択される細胞区画に標的化させる配列である。これには、非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素が、植物細胞に導入される核酸構築物に含まれる配列によって、又は核酸構築物が導入される細胞ゲノムに存在する内因性配列によってエンコードされる例が含まれる。

収穫後に自己プロセシング植物を得るための上記方法に有用な具体例では、細胞壁多糖類－修飾酵素は、エンドーポリガラクトツロナーゼ、エンドーペクチンリアーゼ、ペクテートリアーゼ、ラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ、ラムノガラクトツロナンリアーゼ、エンドーグルカナーゼ、エンドーキシラナーゼ、及びそのイソ型又は類似体からなる群から選択される。有用な具体例では、このような酵素の発現は、植物プロモーターによって管理される。

【0037】

収穫後に処理される細胞壁多糖類がペクチンである上記方法の具体例において、ペクチンのプロセシングは、ラムノガラクトツロナンとホモガラクトツロナン領域間の領域である。収穫後に「自己プロセシング」植物を得る方法において、ひとつの有用な具体例は、植物物質自体に存在する酵素によって収穫後に酵素的に処理される細胞壁多糖類を含む、少なくとも1つの細胞壁複合多糖類構造をインビボで修飾し得る酵素を発現させる核酸配列で、植物細胞をさらに形質転換する例である。このような核酸配列は、例えば、細胞壁多糖類－修飾酵素をコードする配列又は細胞壁多糖類－修飾酵素をコードする内因性配列の発現に影響を及ぼす生成物をコードする配列である。有用な具体例では、細胞壁多糖類－修飾酵素は、アポプラストに標的化される。

【0038】

少なくとも1つの細胞壁複合多糖類構造をインビボで修飾し得る有用な酵素には、エンドーラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ、エンドーラムノガラクトツロナンリアーゼ、エンドーガラクタナーゼ、エンドーアラビナナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、例えばβ-ガラクトシダーゼ、キシロシダーゼ及びエキソ-ガラクトツロナーゼ及びその類似体又はイソ型が含まれる。

【0039】

さらに別の観点では、この発明は、野生型状態に対して、構造及び組成が修飾されている、植物細胞壁多糖類物質を得る方法に関する。この方法は、(i) 収穫後に「自己プロセシング」植物を得る上記方法を用いて、トランスジェニック植物、例えばポテトの植物を準備し、(i i) その植物を培養して、収穫し、少なくとも1つの細胞壁複合多糖類、例えばペクチンを、植物物質自体に存在する酵素によって収穫後に酵素的に処理できる部分を、植物から単離し、(i i i) その部分を、非アポプラスト又は非ゴルジ区画で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素をその細胞壁多糖類基質と接触させる条件、又はインビボ条件下で不活性な形態で発現される細胞壁多糖類－修飾酵素が活性化されて修飾細胞壁多糖類を生じる条件に付し、かつ(i v) 修飾細胞壁多糖類物質を単離する工程からなる。

この方法の有用な具体例で、得られる物質中の修飾細胞壁多糖類は、少なくとも1つの単

糖の割合が少なくとも10%変化しているか、又は少なくとも1つのグリコシド結合の割合が少なくとも10%変化している単糖プロフィルを有するように修飾される。

【0040】

さらなる観点で、この発明は、野生型の状態に対して、構造及び組成が修飾されており、上記方法によって得られる植物細胞壁多糖類物質を提供する。

また、対応する野生型細胞壁多糖類を含む物質に対して、少なくとも1つの機能特性が変化している、例えば薬理活性、水結合能、加工性、ゲル化性、粘稠特性及び消化性が変化しているようなトランスジェニック植物物質を含む、野生型の状態に対して、細胞壁複合多糖類構造が修飾されているトランスジェニック植物物質、及びかかるトランスジェニック植物又はその子孫又は一部から得られる植物細胞壁多糖類—含有物質を得るためのこの発明の第一の観点による方法によって得られるトランスジェニック植物、又はその植物の子孫又はその一部が提供される。

10

【0041】

さらに別の観点で、この発明は、上記のトランスジェニック植物又はその植物の子孫もしくはその一部あるいは植物細胞壁多糖類—含有物質を、食品、食品添加物、飼料製品、医薬品又は医療品及び化粧品ならびに、医薬組成物、インプラント物質、医療器具及び外科粘着剤を例として含む、上記の植物細胞壁多糖類—含有物質からなる医薬品又は医療品の製造で用いることに関する。

また、対応する野生型細胞壁多糖類を含む物質に対して、少なくとも1つの機能特性が変化している、例えば薬理活性、水結合能、加工性、ゲル化性、粘稠特性及び消化性が変化しているようなトランスジェニック植物物質を含む、少なくとも1つの細胞壁複合多糖類の植物細胞での生合成を修飾するための上記方法によって得られるトランスジェニック植物又は植物のその子孫又はその一部及びかかるトランスジェニック植物又はその子孫又は部分から得られる植物細胞壁多糖類—含有物質が提供される。

20

【0042】

さらに別の観点で、この発明は、上記トランスジェニック植物又はその植物の子孫もしくはその一部あるいは植物細胞壁多糖類—含有物質を、食品、食品添加物、飼料製品、医薬品又は医療品及び化粧品ならびに、医薬組成物、インプラント物質、医療器具及び外科粘着剤を例として含む、上記の植物細胞壁多糖類—含有物質からなる医薬品又は医療品の製造で用いることに関する。

30

【0043】

さらに別の観点で、野生型状態の対応する細胞壁多糖類に対して、修飾構造及び／又は修飾組成を有する、植物細胞壁複合多糖類からなる物質の製造方法が提供される。その方法は、(i) この発明の第一の観点による方法、又は少なくとも1つの細胞壁複合多糖類の植物細胞での生合成を修飾するための上記方法を用いて、培養可能なトランスジェニック植物、例えばポテト植物、又は培養可能なその子孫を準備し、(ii) 適当な植物培養条件下で、そのトランスジェニック植物又はその子孫を培養し、修飾構造及び／又は修飾組成を有する少なくとも1つの細胞壁複合多糖類からなる植物物質を得て、かつ(iii) 修飾細胞壁多糖類からなる物質を培養した植物から単離する工程からなる。この方法の有用な具体例では、培養植物から単離される物質は、野生型植物に対して、少なくとも1つの単糖の割合が少なくとも10%変化しているか、又は少なくとも1つのグリコシド結合の割合が少なくとも10%変化している単糖プロフィルを有するように修飾される細胞壁多糖類からなる。

40

【0044】

発明の詳細な開示

以下の記載及び添付の請求の範囲をとおして、発明を定義するためにいくつかの一般的かつ具体的な用語及び表現を用いる。以下にこのような用語及び表現を定義し、説明する。用語「新たな多糖類構造」及び「新たなペクチン構造」は、新たなグリコシド結合の配置を有する、及び／又はポリマーの単糖構築ブロックの割合が変化した、つまり単糖プロフィルが変化したポリマーを意味する。結合パターンを測定する際、(例えば熟成中に認め

50

られるような) 分子量のシフトダウンから生じる新たな末端基の定量的にごくわずかな量
を無視し、大きさのみが変えられたポリマーを新たな構造物とみなさない。単糖プロフィ
ル及び結合パターン測定 of 双方について、非糖置換での装飾をも無視し、例えばメチルエ
ステル化の増加によってのみ異なる多糖類を新たな構造物とみなさない。

【0045】

多糖類又は多糖類混合物の単糖プロフィルは、ウロン酸についての個別の比色 (colorimetric) 測定を用いるか、又は用いないで、例えば多糖類水解物のアジトールアセテート誘導体のガスクロマトグラフィーによって、又はHPAECによって、測定される。結合分析は、ガスクロマトグラフィー用の加水分解及び誘導化に先立って全ての遊離のヒドロキシル基を完全にメチル化することにより、多糖類又はオリゴ糖類の非糖装飾を除いて通常行われる。単糖プロフィル及び結合パターンの測定 of 双方について、不完全な澱粉の除去が結果を歪曲する可能性があるので、実験者がこのランダムでない変化の原因を評価する必要がある。単糖プロフィルは量的成分と質的成分を持つ性質であるが、結合パターンは主として質的特性である。特に、定性特性は生物学的変化を受けやすい。この発明は、細胞壁複合多糖類にここで記載されるような新たな構造物を導入でき、これらは、野生型の対照と比較して認識される(以下参照)。形質転換体は、ある単糖において単糖プロフィルが少なくとも15モル%、少なくとも20モル%又は少なくとも25モル%を含む少なくとも10モル%異なるか、又は野生型植物に対して結合パターン分析が少なくとも1残基において、少なくとも15モル%、少なくとも20モル%又は少なくとも25モル%を含む少なくとも10モル%異なるならば、野生型状態とは異なるものと認識される。単糖プロフィル及び結合パターン双方の同時変更は、必要でないが、生じててもよい。幾つかの考えられる修飾は配列のみを留意して、新規な結合でのみ明確にされているが、他は、単糖プロフィルが1個のみ変化している純粋な組成修飾である。

10

20

【0046】

用語「トランスジェニック」又は「形質転換」植物は、遺伝的な形質転換処理により、通常は植物に存在しないDNA-メチル化パターンを含む核酸配列、又は通常は植物に存在する配列に付加される核酸配列、又は通常植物に存在するが、天然の配列と比較して変化しているDNA配列が含まれている植物を意味する。この明細書で、変化には、そのDNAメチル化パターンの変更又はゲノム中の配置の変更も含まれる。

用語「野生型」は、安定的に形質転換されておらず、外来遺伝物質を過渡的に発現するように操作されてもいない植物を意味する。野生型植物は、生物学的変化を測定し、この結果比較により、真に新たな表現型を示す操作された植物の同定を可能にするために用いられる。野生型の対照植物は、この発明の状況で適当な対照として役立たせるために、研究中の修飾植物と同じ栽培品種で、本質的に同一条件で成長させるべきである。対照分析の器官及び組織は、同様の生育段階にある実験植物及び対照植物からサンプリングされる。

30

【0047】

用語「核酸」は、植物における遺伝物質の維持又は遺伝及び/又はDNA-メチル化パターンを変え得るDNA、RNA、LNA (ロック型核酸)、PNA、RNA、dsRNA、RNA-DNA-ハイブリッドを含む核酸物質を意味する。また、天然に存在しないヌクレオシドからなる核酸も含まれる。

40

用語「核酸構築物」は、植物細胞を形質転換して、トランスジェニック植物の子孫を得るために用いられる遺伝配列を意味する。核酸構築物は、植物での発現のために、少なくとも5'及び3'制御配列に操作可能に連結されている所望の遺伝子産物のコード領域からなる。このような構築物はキメラ、つまり異なる由来からの配列混合物であってもよく、又はキメラでなくともよい。コード領域の方向付けは、問題の遺伝子産物の意図される機能に応じて、センス又はアンチセンスの方向のいずれであってもよい。

【0048】

同種組換えによる形質転換は、高等植物で可能であることが最近明らかにされている (Kempinら、1997)。上記定義にしたがってトランスジェニック植物を得る方法を変更し、網羅するのにこれを期待することは道理に合っている。したがって、「核酸構築

50

物」の定義は、これらの新たな技術を包含するものとして理解されるべきである。同種組換えを用いてこの発明を実施するための特に技術的な手法には、プロモーター配列の置換又はリプレッサーのノックアウトによる内因性細胞壁多糖類—修飾酵素の補充が含まれるが、これに限定されない。これは、一般に植物に許容されるか、あるいは少なくとも問題の遺伝子が1以上のイソ型で存在する場合に許容される。同じ理論的解釈にしたがえば、内因性遺伝子産物の細胞下標的化は、そのシグナル配列の置換によって変更できる。最後に、異種遺伝子全体又はそのコード領域は、内因性遺伝子の置換によって植物のゲノムに導入することができる。

【0049】

また、例えば外来遺伝物質を植物に保有させ、この結果、感染細胞での遺伝子発現を修飾するために植物ウイルスを使用することは実行可能であり、実際に、安定的に形質転換した植物の生産なしでの植物の遺伝的修飾について魅力的な経路となっている。成熟植物を収穫後まもなく感染させることができ、所望の表現型が現れるやいなや、修飾組織を回収した。形質転換細胞の直接的な利用をここで言及する場合、示唆されるのは、これらの過渡的な修飾細胞である。

用語「アンチセンス」は、センス鎖の配列に相補的で、構造遺伝子によってエンコードされるポリペプチドに翻訳できないDNA鎖の配列を意味する。この発明の目的のため、アンチセンスは逆方向の配列の全て又は一部とともにプロモーターに操作可能に連結される核酸構築物を意味し、RNA分子への転写後、センス及びアンチセンス配列間にハイブリダイゼーションを生じ、それにより問題のポリペプチドのレベルを低下させる。ここで用いられる用語「センス」は、mRNA分子コピーに転写され、次いで構造遺伝子でエンコードされるポリペプチドに翻訳される構造遺伝子のDNA鎖の配列を意味する。

【0050】

用語「操作可能に連結」は、コード配列の発現に必要な制御配列が、コード配列の発現に影響を及ぼすように、コード配列に対して適当な位置で核酸分子に位置していることを意味する。あるいは、コード配列は、コード配列で形質転換される細胞のゲノム中の制御配列に操作可能に連結することができる。ここで用いられる用語「プロモーター」は、DNAのRNA分子への転写を生じるか、又はその必要があるDNA配列を意味する。プロモーターは、組織特異的又は器官特異的なプロモーター、特定の生育段階で活性なプロモーターであってもよく、あるいは、誘導性プロモーター、例えば後述する誘導性プロモーター又は当該分野で公知の別の誘導性プロモーターの1つ、又はカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターのような構成プロモーター又は当該分野で公知の別の構成プロモーターであってもよい。

【0051】

用語「ベクター」は、細胞で複製可能（又は例えばPCR法によってインビトロで増幅可能）な核酸分子を意味し、これに別の核酸配列を操作可能に連結して、結合した核酸配列を複製させることができる。一般に用いられるベクターは後述するものであり、細菌プラスミド及びバクテリオファージが含まれる。

【0052】

上記の核酸構築物は、従来の組換え核酸技術を用いて植物細胞に導入することができる。一般に、そのような技術は、挿入されたタンパク質コード配列の転写及び翻訳に必要な部位及び形質転換した細胞又は植物の選択を容易にするための1以上のマーカー配列を含む発現ベクターに核酸を挿入することを伴う。いったん核酸構築物を発現ベクターにクローンすると、当業者に公知の従来の形質転換方法を用いてそれを植物細胞に導入することができる。これらには、一般にPlant Tissue Culture Manual (Lindsey, 1992, Kluwer Academic Pubs., Dordrecht)に記載されるような、アグロリウムベクター、例えばエイ．ツメファシエンズ及びエイ．リゾゲネス(A. rhizogenes)の使用、プロトプラストのPEG処理、遺伝子銃を用いる(bioblastic)DNAデリバリー、核酸構築物で被覆した金粒子での照射(bombardment)、プロトプラストのエレクトロポレーション

10

20

30

40

50

ョン又は直接的な核酸の取り込みが含まれるが、これに限定されない。所定の場合における形質転換の適当な方法が形質転換される植物に依存していることは、当業者には明らかである。ここで用いられるように、用語「形質転換」は、核酸の形質転換細胞ゲノムへのその後の導入が生じるか否かに関わらず、植物細胞に核酸を導入する事象を意味する。

【0053】

用語「植物細胞」は植物から得られる細胞を包含し、カルス及び培養懸濁物、ならびに植物種子、花粉又は植物胚のような未分化組織を含むことを意味する。形質転換に適当な植物組織には、葉組織、根茎組織、分裂組織、プロトプラスト、胚軸、子葉、胚盤、茎端、根茎、未成熟胚、カルス、体細胞、胚発生構造物、花粉及び葯が含まれる。

用語「標的化」は、インビボの細胞壁多糖類の再建又は修飾の方法に関連する場合に、この発明を、本来天然にランダムな突然変異手法と区別し、また発明を多糖類前駆体プールが改変されるトランスジェニック手法と区別することを意味する。後者の方法は、影響を受けている構築ブロックを用いて全ポリマーの単糖プロフィルを同時に変えることができるが、この発明は、特定の細胞壁ポリマーが具体的に修飾され得るという点を目的とする。さらに、用語「標的化」は、標的化多糖類の組成への副作用、例えば細胞壁のフィブリルセルロース又はリグニンの量の低下が、ランダムな修飾としてみなされることを意味する。主要成分が低下した後の細胞壁の残留物は、しばしば他の細胞壁の構築ブロックでの単純な補充をもたらすであろう。

10

【0054】

用語「細胞壁複合多糖類」は、この発明に係わる維管束植物に由来する一群のポリマーを意味する。細胞内の複合多糖類、澱粉及びフルクタンは、含まれない。種子の二次細胞壁に堆積されるマンナン、ガラクトマンナン及び貯蔵キシログルカンによって例示される分化した種子貯蔵多糖類も含まれない。セルロースの単純で結晶性のフィブリルは、この明細書では「複合」とはみなされない。例えば、後述するヘミセルロース及びペクチンの広範囲な群が定義により含まれる。

20

用語「ヘミセルロース」又は「ヘミセルロース多糖類」は、（貯蔵キシログルカンに相対する）構造的なキシログルカン、キシラン、アラビノキシラン及び種々の非セルロース性β-グルカンを意味する。

用語「ペクチン」又は「ペクチン多糖類」は、上記した、ペクチンとして一般に知られる一群の多糖類、つまりホモガラクトツロナン、キシログラクトツロナン、ラムノガラクトツロナン及びアラビノガラクトタンポリマーの混合物形態の植物細胞壁に認められる多糖類物質を意味する。

30

【0055】

用語「平滑領域」は、一般にO-アセチル及びO-メチル基でのエステル化の程度が色々なガラクトツロン酸単位を含む、ホモガラクトツロナンからなるペクチンの一次的に直線状の非分枝領域を意味する。平滑領域は、さらにキシログラクトツロナン及びラムノガラクトツロナンIIのストレッチを含んでいてもよい。

用語「毛状領域」は、骨格がGalAとRhaからなり、その種々の側鎖が主要成分としてアラビノース及びガラクトースを含むラムノガラクトツロナンIからなるペクチンの分枝鎖領域を意味する。

40

【0056】

用語「多糖類-修飾酵素」は、細胞壁複合多糖類構造又はその一部を修飾し得る酵素を意味する。多糖類構造は、上記のように新たな構造物を示す場合に新規とみなされる。できるだけ多くの非糖装飾を、新たな多糖類の定義で無視し、これらの分子の移動の原因となる酵素は多糖類修飾酵素とみなさない（以下の「補助酵素」の定義参照）。多糖類骨格の生合成に係わるグリコシルトランスフェラーゼは、多糖類-修飾酵素とはみなされない。合成酵素の発現の操作は、実際、多糖類構造に主たる変化を生じ得るが、この発明に比較すれば、これは、修飾に依らない技術を、新たな多糖類を得るための基本的に異なる方法としてみなす。さらに、多糖類のひとつの糖残基の装飾で役割を有する遺伝子を同定することは、この発明に関連している（以下の「装飾酵素」の定義参照）。多糖類修飾酵素は

50

、一般に多糖類の変性又は代謝回転に関与する酵素のカテゴリーに属する。これらの酵素の非限定的な例には、エンドーラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ、エンドーラムノガラクトツロナンリアーゼ、エンドーポリガラクトツロナーゼ、エンドーペクテートリアーゼ、エンドーペクチンリアーゼ、エンドーガラクタナーゼ、エンドーアラビナナーゼ、エンドーキシログルカナナーゼ、エンドーグルカナナーゼ、キシラナーゼ、アラビノキシラナーゼ、キシログラクトツロナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フコシダーゼ、エキソーガラクトツロナーゼ及びキシロシダーゼが含まれる。興味深い特定の多糖類修飾酵素の具体的な取得には、アスペルギルス・アキュリータスのエンドーガラクタナーゼ（A C 番号 L 3 4 5 9 9）又はそのイソ型もしくは類似体、例えばアスペルギルス・ツビジェンシス（*Aspergillus tubigenensis*）由来の類似体 A J 0 1 2 3 1 6 ； ラムノガラクトツロナンリアーゼ（A C 番号 L 3 5 5 0 0）又はそのイソ型もしくは類似体； 及びアスペルギルス・アキュリータスのエンドー 1, 5- α -アラビナナーゼ（W O 9 4 / 2 0 6 1 1 の S E Q I D # 1）又はそのイソ型もしくは類似体、例えばアスペルギルス・ニガー由来の類似体 L 2 3 4 3 0 が含まれる。

10

20

30

40

50

【0057】

用語「装飾酵素」は、ペクチン骨格又は側鎖に、ひとつの単糖側鎖又は非糖置換基、一般にフェロイル、アセチル又はメチルエステルを付加する、トランスフェラーゼのような酵素を意味する。したがって、装飾酵素は、トランスフェラーゼでもあり、ペクチン骨格（ホモガラクトツロナンと交互になったラムノガラクトツロナン骨格）ならびに長い側鎖（ガラクトタン及びアラビナンがかなり豊富）のポリマー化を受ける合成酵素複合体とは別に設定される。

【0058】

用語「補助酵素」は、上記の装飾酵素の定義から理解されるように、ペクチンの装飾を除く酵素を意味する。装飾は、しばしばペクチンを多糖類修飾酵素に接触不能にし、このためにマッチングする補助酵素との後者の同時発現が可能になり、一次酵素とそのペクチン基質間の相互作用を最適化する。補助酵素の例には、エステラーゼ、例えばホモガラクトツロナン又はラムノガラクトツロナンに特異的なメチルエステラーゼ又はアセチルエステラーゼ、ならびにポリマー、例えばアラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、キシロシダーゼ又はフコシダーゼからひとつの単糖を除くグリコシダーゼが含まれる。

【0059】

「分子農業」は、野菜、果実又はその画分（例えばジュース又は穀粉）の製造に対する、特定分子の製造用の製造手段として植物を用いる実施を意味する。十分に明らかにされている分子を回収するための植物の製造物の一般的な例は、植物油、糖及び澱粉である。トランスジェニック技術は、植物で農作できる分子の範囲を劇的に広げており、用語は特にこれらの広い展望に関してここで用いられる。

用語「類似体」は、異なる生物由来の2つの（酵素をエンコードする）遺伝子間の以下の関係を示すために用いられる： 遺伝子は、配列類似性が進化上の関連性（但し、限界の）を示し、その遺伝子産物が同じ反応を触媒し、2つの生物において本質的に類似するか又は重複する生理学的目的に資する場合に、類似体とみなされる。

【0060】

用語「イソ型」は、同じ生物由来の2つの遺伝子間の以下の関係を示すために用いられる： 遺伝子は、配列類似性が進化上の関連性を示し、エンコードされる酵素が同様の反応を触媒する場合に、同じ遺伝子産物のイソ型をエンコードする。イソ型は、生物において異なる生理学的機能に資するものであってもよく、又はそうでないものであってもよい。用語「組織特異的」及び「器官特異的」は、同化性の誘導性プロモーターも含まれるようにプロモーターに関して用いられる。同化性の誘導性プロモーターは、その同化、例えばショ糖の誘導によってのみ、埋没器官（*sink organ*）での発現をしばしば管理する。全ての実際的な目的に対しては、これらは、この明細書で特異的な貯蔵器官と考えられる。

【0061】

細胞壁複合多糖類は、細胞壁、つまりプロトプラストの外側に堆積するが、生合成の主要工程はゴルジ装置で生じる。したがって、多糖類修飾酵素は、これらの位置のいずれかで基質と接触し、基質によって作用して、ゴルジからアポプラストに移動する。

ある観点において、この発明は、一般に適当な細胞下の局在性を確保するのに必要な修飾に全く構わずに、植物遺伝子の異所性発現、又は微生物遺伝子の異種発現に関する。植物遺伝子によってエンコードされるアポプラスト酵素のシグナル配列は、キメラ構築物で遺伝子産物が通常蓄積しない器官への発現を管理するのに用いられる場合でも、植物種にわたって一般に機能している。植物細胞で発現される場合には、分泌される真菌酵素でさえアポプラストを通る。当業者は、アポプラストへの分泌が天然の遺伝子を用いては機能しない遺伝子を設計するために利用可能な技術、つまり一般には機能が知られている植物又は真菌配列で非機能性シグナル配列を置換することによる技術又は置換しないで前記配列を有する遺伝子を得る技術に習熟しているであろう。

10

【0062】

当業者は、ゴルジにおける導入遺伝子産物を確実に位置付ける植物のシグナル配列を用いて、適当な配列を用いて導入遺伝子を設計し、合成部位のペクチンを含む細胞壁多糖類の修飾を完了することができると考えられる。以下の実施例8はこの発明の具体例を記載しており、その実施例では、ラットの遺伝子の一部を用いてゴルジが確実に標的化されている系統発生的に大きな隔たりにわたって、シグナル配列がしばしば正確に作動するという事実が利用されている。

この発明の別の観点は、多糖類の所望の再構築を触媒する酵素基質への接触を容易にするために、特定種のペクチンの装飾を除く酵素をエンコードする遺伝子を同時発現することに関する。この発明の具体例は、補助酵素を用いて言及している。後述する実施例9は、関与する設計及び形質転換を例示している。

20

【0063】

一般に（酵素が適当な活性のために補助酵素を要しない限り）一对の酵素の同時発現に関する別の観点は、自己プロセシング植物物質（例えばポテトの場合には自己プロセシング塊茎）に関する。この具体例は、標的とされる細胞壁多糖類、例えばペクチンの予備選択部分又はフラグメントの酵素的な切除を伴うが、その一部又はフラグメントは再構築に付されていても、付されていなくてもよい（後者の場合、技術は同時発現を伴わなくともよい）。収穫後の予備選択部分又はフラグメントの切除は、基質から個別に植物細胞で貯蔵される酵素、つまり生育植物中の細胞壁多糖類構造の変化を全く触媒しない酵素によって行うことができる。切除を行う酵素が局在する可能性のある位置についての非限定的な例には、液胞、小胞体、細胞質及びプラスチドが含まれる。その位置は、植物における安定性及び問題の遺伝子産物の植物に対する潜在的な毒性に基づいて選択される。しかし、環境温度で実質的に不活性であるか、又は植物のアポプラストにみられるpH範囲（pH 3～7.5）で実質的に不活性な酵素を利用することによって、基質との（結合とは別の）相互作用を回避でき、所望の場合に酵素を適当な条件変化によって活性化できるならば、酵素はアポプラストに直接貯蔵されてもよい。活性化処理には、熱、塩の添加、有機化合物の添加、物理的処理（pH変化）、プロテアーゼの添加（例えば修飾酵素の阻害部分を切出すプロテアーゼ）、タンパク質の添加（例えば修飾酵素の別の本質的なサブユニット）が含まれる（しかし、これに限定されない）。

30

40

【0064】

要約すれば、標的とされる多糖類は望ましい場合にはインビボで再構築される。植物は、切除を触媒する酵素の要件に必要な条件下に、浸潤した植物物質の培養工程を導入することによって収穫後に処理され、この結果、貯蔵された酵素がその基質によって作用することができる。放出されたフラグメントは、次いで精製に適した状態で回収される。この技術は、2つの点で技術的な酵素を用いるよりも優れている：技術的な酵素は、副活性が存在するため、生成物を分解せずに多糖類の所望の部分又はフラグメントを切除することによってのみ作用するのに十分なほど純粋ではない。多くの植物器官、ポテトの塊茎のような貯蔵器官は、内因性の多糖類修飾酵素について極めて低いバックグラウンドを生じる

50

。さらに、切除を行う酵素は、植物組織の有効な均質化に依存しているので、外部から添加される技術的な酵素に比較して、その基質に非常によく接近するが、酵素がその基質又は基質と密接に結合している区画とともにすでに存在している場合には、そのようなことがない。

【0065】

以下の実施例3及び10は、小胞体における細胞壁多糖類—修飾酵素の保持及びそのような酵素の液胞への標的化を例示している。以下の実施例12は、ガラクタナーゼ修飾毛状領域を放出するポテトの塊茎を含む自己プロセッシング植物物質を設計するための詳細なストラテジの例を示しており、この例は、細胞質における遺伝子産物の蓄積をも立証している。

10

これまでに示されている技術の適用には、調整したオリゴ糖と多糖類の分子農業が含まれる。なんらかの領域でこの技術を用いることにより、他の産業からの副産物の物価が維持安定され得る。ビート糖の製造から生ずる髓質及び澱粉の製造から生ずる髓質は、天然の状態では価値が低いが、その価値をこの発明によって改善できるペクチンを含む、細胞壁多糖類の多い副産物の非限定的な例である。

【0066】

医療上の適用には、創傷ドレッシング、移植又はインプラント用物質、生物適合性外科接着剤、免疫調節化合物及び血液凝固調節剤などの医薬化合物ならびに医療物質の提供が含まれる。ここに示される技術の使用は、最終製品の分子農業に限定されないが、発見段階ですでに重要である。ペクチンのような調整多糖類を生産する植物は、医療適用上の構造活性の余地をカバーする、つまり研究中の適用に対する機能特性を保持すると同時に構造上の変化を表すポリマー及びオリゴマーのライブラリーの系統的な作成に用いることができる。当該分野では、そのようなライブラリーの評価からのデータに対する、化学計測（chemometric）多変量分析、QSAR（定量構造活性関係）及びQSPR（定量構造特性関係）の適用方法自体が知られている。

20

【0067】

この発明の目的のため、被子植物の単子葉及び双子葉植物の双方を含む維管束植物に属する植物の再構築、つまり細胞壁複合多糖類の酵素修飾が考えられる。例えばペクチンの調整に関して、双子葉植物及び非—コメリノイド（commelinoid）の単子葉植物が特に重要である。逆に、ヘミセルロースポリマーの再構築は、後者のカテゴリーの幾つかの種、特に飼草及び穀類では極めて関連性がある。この発明によって修飾され得る、市場で重要な植物のさらに非限定的な例には、大豆、タバコ、パセリ、ニンジン、カリフラワー、キャベツ、ブロッコリー、ポテト、サツマイモ、インゲン豆、エンドウ、チコリ、レタス、ビート、蕪、ラディッシュ、ハウレンソウ、タマネギ、ニンニク、コショウ、セロリ、柳、ポプラ、カボチャ、ペポカボチャ、ズッキーニ、キュウリ、リンゴ、ナシ、メロン、プラム、チェリー、桃、ネクタリン、アプリコット、イチゴ、ブドウ、ラズベリー、ブラックベリー、パイナップル、アボガド、パパイヤ、マンゴー、バナナ、柑橘種、シロイヌナズナ、ウキクサ及びトマトが含まれる。非維管束植物には、藻及び海藻が重要である。

30

【0068】

詳細な具体例では、この発明は、例えば平滑領域から毛状領域を切断するか、及び／又は毛状領域の個々の側鎖を除くか短くすることによって、ペクチンの毛状領域を修飾する酵素を用いることに関する。この理由のため、そのような酵素を発現し、ペクチンが毛状領域にインビボで修飾されているトランスジェニック植物を生ずるヌクレオチド配列は、重要である。「自己プロセッシング植物物質」として表されるこの発明の詳細な具体例では、ポリマーの一部を可溶性にするか、又は細胞壁のマトリクスからポリマーを放出する酵素は重要である。ここでの焦点は、問題の多糖類のポリマー構造を切断する酵素にある。

40

【0069】

当業者が気づいているように、問題の細胞壁多糖類は、植物細胞壁の定量的かつ機能的に

50

重要な成分である。このため、その性質により、可能な修飾の程度について限界を設定する必要があると考えられる。したがって、この発明に関連して行われる修飾が、生存できない植物を生じるような、あまり強烈なものであるべきではないことは明らかである。雄性の不稔性及び既述の他の望ましい特性に対する手段として、成長を損なう細胞壁の変化から生じる何らかの生育変化を利用し、局所的に細胞を切除してもよい。他方、上記のように、発明者らは、細胞壁多糖類の単糖プロフィール及び全体的な結合パターンについて有意な修飾が可能であるが、依然として生存可能な植物が維持されることを驚くべきことに見出した。これらの意外な知見に基づけば、この技術を用いることにより、広範囲な種々の修飾細胞壁多糖類を、植物の生存性を犠牲にせずに行うことができると考えられる。

【0070】

10

細胞壁複合多糖類の修飾方法

この発明によれば、細胞壁複合多糖類は、幾つかの異なる方法で問題の植物物質の生育中に又は収穫後に修飾することができる。これらは、手短に言えば以下に要約される：

(i) 細胞壁複合多糖類の生合成、例えば移動及び重合化工程に直接関わる植物遺伝子の調節による、プールサイズ (pool size) の操作及び基質分子の輸送による、又は翻訳及び分泌経路への参加後に、その生合成位置でペクチン又はヘミセルロースの炭水化物を代謝回転させる、ゴルジ装置に保持される多糖類—修飾酵素の発現によってポリマー生合成へ緩衝することによる、生合成の操作。

【0071】

(i i) アポプラストの空間、その結果、細胞壁への直接的な翻訳後輸送を確保し、細胞壁へのその並置後又は填充生長後に問題の酵素基質と直接的に相互作用するシグナルを備えた適当な多糖類—修飾酵素の発現による堆積後修飾。

20

(i i i) 生育中に生産され、その後、生植物ではなく、収穫後条件下でのみ活性な酵素の選択を間接的に介して、適当な細胞小器官又は区画で翻訳後蓄積する1以上の多糖類—修飾酵素の収穫後放出。

【0072】

細胞壁多糖類—修飾酵素の器官／組織特異的発現

この発明の多糖類—修飾酵素の発現、及びこの結果、所定植物のある部分のみに対する修飾細胞壁多糖類の製造を目的とするストラテジは、いっそう大きな範囲のインビボでの細胞壁多糖類修飾を可能にするものと考えられる。例えば、ポテトでは、塊茎のみで多糖類—修飾酵素を発現させ、他の植物部分は天然の多糖類構造を維持しているのが有利であると考えられる。

30

このようにして標的とされるこの発明による多糖類—修飾酵素の発現は、組織特異的調節配列を用いて適宜行うことができる。多くのそのような組織特異的配列は、当該分野で知られている。

【0073】

US 5, 723, 757号は、例えば所望のDNA配列の「埋没組織」特異的発現を確実に行う植物遺伝子の5' 転写制御因子の使用を開示している。このような転写制御領域は、「埋没器官」、つまり根茎、種子、果実又は塊茎のような植物の光合成不活性部分に特に生じさせるために、所望のDNA配列を発現させる。その結果、当該遺伝子産物が、ある組織で発現又は阻害される。制御領域は、クラスIパタチン遺伝子に属するパタチンタンパク質をコードする遺伝子から特に得られる。

40

US 5, 436, 393号は、ポテトのパタチン遺伝子、特にパタチン遺伝子のB33プロモーター配列に由来するポテト塊茎特異的制御領域からなる発現カセットのDNA配列を開示している。発現カセットを用いてポテト細胞を形質転換することにより、B33プロモーター配列に融合した異種由来のDNA配列が塊茎特異的な方法で発現されるトランスジェニックポテト植物を生産することができる。

【0074】

塊茎への発現を管理する他の公知のプロモーターには、ポテト由来の推定上のメタロカルボキシペプチダーゼ阻害剤 (受入れ番号U30388)、ポテトリボキシゲナーゼ (受入

50

れ番号X 9 5 5 1 3) 及びカテプシンD阻害剤(受入れ番号X 7 4 9 8 5)が含まれる。当業者は、所望の特異性を有する他のプロモーター領域を切出し、所望の多糖類一修飾酵素でキメラ遺伝子構築物を調製することができる。少なくとも幾つかの塊茎特異的プロモーターはその器官特異性をショ糖誘導に負っているので、これらのプロモーターが、ショ糖を蓄積している他種の器官、例えばビートの根茎でしばしば操作性であることは驚くに当たらない(タバコの葉におけるGBSSプロモーターの活性をここで実施例10に例示する)。逆に、ショ糖誘導性プロモーターが他種から同定でき、由来する種に特異的な唯一の貯蔵器官であるだけでなく、ポテトに塊茎特異性を付与することが見出されたことは、当業者に意外なことではない。例えばポテトの塊茎で高度な発現を確実に行うプロモーターには、GBSS及びB33プロモーターが含まれる。

10

【0075】

植物細胞壁多糖類の生合成の修飾

ペクチン又はヘミセルロース多糖類の再構築の機会は、異なる合成レベルで作用する酵素を用いて入手できる：(i)ヌクレオチド糖のプールの維持、(ii)特定骨格のポリマー化、及び(iii)種々の置換基(グリコシル残基、メチル及びアセチル基)でのこれらの骨格の装飾。

生合成への干渉は、この発明によれば、生合成を干渉するゴルジ装置に多糖類一修飾酵素を標的化して行うことができる。酵素は設計して、膜に固定され、この結果ゴルジに保持されるか、あるいは最終的にはアポプラストに細胞壁多糖類と共に分泌されるような可溶性酵素としてゴルジに標的化させることができる。ゴルジ膜に固定化される酵素が、自身が膜に結合している生合成複合体と上手く相互作用しているというのは、意外な知見であった。したがって、膜固定及び可溶性変化はいずれも興味深く、前者はきわめて特異的であることが予想される。また、この具体例は、幾つかの分泌される多糖類ヒドロラーゼの植物に対する潜在的な毒性に起因する問題に可能性のある解決策を提供している。

20

【0076】

何通りかの証拠が、エリシター酵素による植物細胞壁の酵素分解を介して放出されるオリゴガラクトロニドが植物細胞で特異的応答を誘発できるとの知見を支持している(Moishokら、1992)。したがって、植物細胞のインビボでの修飾に対し潜在的な候補である、この発明による1以上の酵素は、オリゴガラクトロニドについて認められる知見に似た応答を開始できる炭水化物オリゴマーを放出するものと考えられる。

30

【0077】

タバコのN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI由来のN-末端77アミノ酸は、ニコチアナ・ベンタミアナ(Nicotiana benthamiana)細胞のゴルジ装置でレポータータンパク質を保持するのに十分であることが分かっている。Esslら(1999)とDhuggaら(1997)が、多糖類合成で役割が暗示されているポリペプチドをクローンしたところ、これらのポリペプチドは、内在性タンパク質(アカエンドウマメ可逆グリコシル化性ポリペプチド(RGP1)U31565)を伴わないゴルジである。シロイヌナズナからは、アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼAJ243198及びキシロシルトランスフェラーゼAJ272121が同定されている。シロイヌナズナのゲノムを完全にシーケンシングすることにより、当業者は、さらなるゴルジ標的化遺伝子産物についてゲノムを研究する方法を知るのであろう。さらに可溶性で完全な植物のゴルジタンパク質が特徴付けられるので、ゴルジの標的化について多糖類一修飾酵素を設計するために配列を利用できる。現在、ほとんど関連していない種間で少なくとも幾つかのゴルジ標的化配列が機能的である事実を利用してよい。この発明の詳細な具体例で、ラット遺伝子由来の配列は、この実施例8で立証されるようにそのまま用いることができる。

40

【0078】

細胞壁多糖類の堆積後修飾

以下の実施例5は、ペクチンの毛状領域によって例示されるように細胞壁多糖類について予め選択した部分又はフラグメントの単糖プロファイルについて標的とされた変化に対し真

50

菌のガラクタナーゼを用いることを例示している。ガラクトン側鎖は、側鎖がもはや酵素の基質ではない程度まで短くされる。植物は、ウロン酸の相対的含量及び絶対含量を増し、アセチル化の程度を増すことによって補償する。

この場合、ガラクトンは、短い単糖側鎖での装飾（もっとも一般的には、アラビノシル装飾）を少し含むか、又は全く含まず、補助酵素の同時発現が不要であった。必要な場合には、この発明の詳細な具体例は、プロセシング中に同時に作用する補助酵素に加えて、当該再構築酵素が付いた二重構築物（double construct）を利用している（以下の実施例 4 及び 9 参照）。

【0079】

この実施例 2 及び 7 は、ラムノガラクトツロナンリアーゼ、つまりペクチン毛状領域骨格に軽い傷を負わせる酵素の発現を例示し、この酵素がアセチル及びメチルエステルでの装飾に関わらず、ペクチンポリマーを切断できることを立証している。これが該当しない場合、補助酵素、一般的なラムノガラクトツロナン又はホモガラクトツロナンアセチルエステラーゼ又はメチルエステラーゼは、骨格に軽い傷を負わせる一次再構築酵素とともに同時発現される。

【0080】

収穫後修飾及び自己プロセシング植物物質

自己プロセシング植物物質、例えば塊茎は、収穫後に所望の画分を除きながらインビボで基質との相互作用を妨げるように、既に説明したような植物組織に 1 以上の酵素を貯蔵することによってデザインされる。この発現は、生育中に目的の細胞壁多糖類の再構築を触媒する別の酵素の発現で調整することができる。上記のように、植物の生育中のプロセシング酵素の隔離は、例えば液胞、小胞体、細胞質及び／又はプラスチドであってもよく、あるいは化学的な隔離によるものであってもよい。内部に貯蔵される酵素は、例えば K D E L 保持シグナルを用いて小胞体に、又はパタチンもしくはスポラミンから得られるシグナル配列を用いて液胞に標的化されてもよい。

【0081】

収穫後に、処理、一般に均質化又は浸潤形態の物理的処理に付すことによって、内部に貯蔵された酵素を細胞壁多糖類と接触させ、細胞壁物質の収穫後修飾を触媒する。収穫後修飾の重要で興味深い具体例は、インビボで修飾されるポリマーの髄質物質からの放出である。一例として調整ペクチン毛状領域を用いると、これらは、ペクチンの平滑領域を切断する酵素の作用によって放出される。以下の実施例 12 は、細胞質、液胞に対する植物又は真菌のエンドーポリガラクトツロナーゼの標的化、及び小胞体（ER）での保持を例示している。細胞内部分は、酵素の各部位での安定性と達した蓄積ならびに異なる位置に蓄積された場合の酵素の植物に対する毒性の可能性に基づいて選択される。自己プロセシングのための植物物質の浸潤及び培養条件は、内部貯蔵酵素の性質、植物組織中の干渉性内因性酵素の存在及び回収されるポリマー又はオリゴマーの安定性の可能性によって選択される。酵素が補助酵素を要し、したがって三次又はより高等なベクター構築物が得られ、この結果、この発明の具体例を拡張できることは、前記の記載から理解される。

【0082】

細胞壁多糖類メッシュからペクチン多糖類を放出できる所望の特性を有する酵素は、特に、多糖類骨格を切断する（補助酵素によって任意に助けられる）酵素からなる。ペクチン及びペクテートヒドロラーゼ及びリアーゼ、ラムノガラクトツロナンヒドロラーゼ及びリアーゼは、この性質を有する既知の酵素のカテゴリーである。キシロガラクトツロナンに対する酵素活性は同様に有用であり、多糖類骨格の分化した構造上の特徴に新たな活性を例示するものとしてみなされるべきである。ペクチン側鎖を除くことのできる酵素は、この明細書で再構築酵素として最初に考察される。しかし、側鎖の除去が特定のオリゴ糖を可溶化する例が十分あり得ることも明らかである。

酵素の内部貯蔵を可能にする技術がそれ自身のために酵素の分子農業に有用であることは、明らかである。また、技術が機能性飼料の製造に有用なことは明らかである。「機能性飼料」は、1 以上の細胞内に蓄積された多糖類－修飾酵素が植物物質自体ならびに混合さ

れている他の飼料成分の消化性を増す家畜及び家禽用の食物を意味する。実施例 10 は、タバコの葉の ER におけるアラビナナーゼの蓄積を立証している。

【0083】

修飾ペクチン又はそのフラグメントの食品産業上の適用

ペクチンは、重要な食品の添加物及び成分であり、植物物質のテクスチャーを決定付ける重要な要因であることが知られている。その構造、特に分子が多量に分枝している領域（毛状領域）での構造の修飾は、ポリマーの物理特性及び細胞壁物質の性質を変える。この技術により、ホモガラクトンに対する中性糖の側鎖の割合を操作することができる。この割合と相関し、食品産業において主たる注目を集めているペクチン相の機能特性はゲル化、ゲル安定性及び水結合効率であり、後者は毛状領域の割合が高いポリマーに偏っており、最初の 2 つはホモガラクトン含量が高いポリマーに偏っている。 10

【0084】

ポテトペクチンは、中性糖含量が高く、ゲル化を妨げるアセチル基が存在するために、食品産業には全く用途が見出せていない。歴史的観点から、高品質のレモン及びライムのペクチンの使用は、通常、一方ではゼリー、ジャムなど（高メチルエステルペクチン）、他方、低糖製品（ペクチンカルシウムのような低メチルエステルペクチン）の用途に向けられている。しかし、最近 10 年のあいだ、適用分野は広げられ、今や乳化剤及び安定化剤、ならびにフライに先立つ製品のコーティングとしての使用が含まれている。ペクチンから得られる分子の新たな適用には、飲食可能な食物繊維としての使用が含まれる。したがって、ペクチンがむしろ高い粘性を生じるという問題がある。しかし、ペクチンのホモガラクトン部分を分解する時に、ラムノガラクトン部分（修飾毛状領域-MHR）がかなり低い粘度で同じ繊維作用を維持していることが示されている（EP 0868854-A2）。同様の MHR は、ポテトスによって生産される調整ペクチンからこの発明にしたがって得ることができる。ここで、キーワードは低コスト及び大量の原材料であり、いずれもポテトの髄質原材料の特徴である。理想的には、澱粉のプロセッシング中に活性化される PG-活性を導入し、ポテトのジュースに直接修飾毛状領域を生じるポテト、つまり、自己プロセッシング塊茎が関連しているポテトを生産することができる。これは、澱粉のプロセッシングを簡単にし、低コストで修飾毛状領域を生じる。澱粉プロセッシングの容易化は、促進された抽出性、又は「あまりまとまっていない」塊茎細胞、つまり直接的な細胞壁の薄化が細胞壁の意図的な調整又はペクチン再構築の副作用として生じる細胞に起因している。当然、澱粉の貯蔵器官のみに関連する澱粉の抽出とは別に、幾つかの（豊富な）源に由来する低品質のペクチンに関連した問題やここに示される技術によって成される解決は、いずれもポテトに特異的ではない。その技術は、他の穀物植物、例えばビート糖にも関連している。 20 30

【0085】

より専門化した食品上の適用には、ポリマー溶液の水結合能及び粘度ならびに「食感（mouth feel）」に関するコントロールが必要である。天然の又は調整されたラムノガラクトン部分は、ミルクシェーク、ドリンク型ヨーグルトなどの粘性の低い製品としての使用が見出される。さらに、ペクチンの設計は、ジュース、サイダー及びワインの産業に有用で、このため 40
ぶどう、りんご及び他の果実に関連している。ジュースと果膠は、ハイドロコロイド及び懸濁されたオリゴ糖ならびに多糖類を除き、ジュースを清澄にし、後の加工段階で濁ったり、沈殿物が生じるのを妨げるためにしばしば濾過される。濾過は、可溶性を増したり、あるいは逆に沈澱性を増すために、ペクチンを調整することによって容易化することができる。この発明は、可溶性で懸濁されるペクチンポリマーに依存しているジュース及び果膠の特性に対するコントロールを獲得するための新たな機会を提供している。

【0086】

最後に、ペクチンは細胞壁孔度を媒介するので（Baron-Epelら、1988）、調整ペクチンは、カルシウムの固定化及び缶詰化に関連する同様の処理に影響を及ぼす可能性がある。したがって、この発明は、例えばここに記載するように修飾ペクチンで植 50

物物質を用いることによって、例えば缶詰化、カルシウム固定、ろ過等に関する一般的な植物物質の食品産業上の加工性を改善する方法を提供する。

【0087】

修飾植物細胞壁多糖類の医療上の適用

種々の産業上の適用のためにペクチン多糖類を修飾するための上記した種々の可能性に加えて、修飾ペクチン物質を含む修飾細胞壁多糖類は、医薬及び医療分野での種々の用途に有用であることも考えられる。例えば、この発明は、インビボで細胞壁多糖類の構造を修飾して、例えば免疫調節に関する特異的な性質を有するように修飾された多糖類を生産することができる。さらに、この発明にしたがって開発され、生産される修飾細胞壁多糖類が、原因がどのようなものでも、物理的ダメージ、化学剤及び細菌、真菌、ウイルスなら

10

【0088】

調整された細胞壁複合多糖類の使用は、2つの基本領域、医薬及び医療用物質の適用に分かれる。慢性的な治癒しない創傷、乾癬（疾患に対する自己免疫成分を有する）によって引起こされる創傷、壊疽を伴う創傷用の創傷ドレッシングの製造及び人工肛門形成製品に現在用いられている材料は、ほとんど完全に、（一般に多くのペクチン及びヘミセルロースポリマーと共有している）その物理特性のために選択されるアルギン酸塩及び修飾セルロースに依存している。種々の形態の慢性的な創傷の治療を目的とした創傷ドレッシングには、物理化学特性が重要である。これらには、ゲル化能及びゲル強度、水結合能、帯電

20

【0089】

別の興味深い展望は、移植片として使用される培養皮膚細胞から再成長皮膚用の足場としてペクチン膜を使用することである。

自己免疫過程を阻害するか、又は自己免疫過程の作用を妨げるか、もしくは治療するための薬剤としての使用は、広範囲な疾患に適用可能であると考えられる。ある種の潰瘍は自己免疫的な態様を伴うと考えられており、これらの場合にも、ラムノガラクトソナンと思われるペクチン構造は活性であることが分かっている（Sakuraiら、1998）。さらに、そのような自己免疫関連症状の非限定的な例には、自己免疫肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性溶血性貧血、グレイブズ疾患、重症筋無力症、I型真性糖尿病、炎症性ミオパシー、多発性硬化症、橋本甲状腺炎、自己免疫副腎炎、クローン疾患、潰瘍性腸炎、糸球体腎炎、進行性全身性硬化（強皮症）、シェーグレン疾患、エリトマトーデス、原発性脈管炎、慢性関節リウマチ、若年性関節炎、混合連結組織疾患、乾癬、天疱瘡、類天疱瘡、皮膚ヘルペスなどが含まれる。

30

【0090】

また、幾つかのタイプの癌と闘うための修飾ペクチン及び他の多糖類の使用が考えられる。例えば、修飾された柑橘系のペクチン（MCP）がメラノーマ（皮膚癌）及び前立腺癌を含む種々のタイプの癌に対抗できることが示唆されているのは明らかである。この作用は、転移の初期段階にMCPによって生じる細胞増殖抑制性又は「抗粘着性」の作用を伴うと考えられる（Ralph W. Moss, <http://ralphmoss.com/mcp.html>）。修飾ペクチン多糖類を同定し、生産するための、ここに概説する方法を用いることによって、抗癌剤としての使用に適した修飾ペクチンを含む新たな修飾細胞壁多糖類物質を得て、例えば分子農業技術によって市場で生産することができると考えられる。

40

【0091】

50

医療分野での適用は、医薬物質及び医療物質の製造に限定されず、以前の発見段階にも、例えば細胞壁のオリゴ糖及び多糖類のライブラリーの作成用ツールとして、またそのようなオリゴ糖及び多糖類の所望の医薬活性の構造上の要件を決定するツールとして関連している。例えばペクチンポリマーは、交互に他の小さな繰り返し構造からなる反復単位として合成される。ここに記載される再構築技術はペクチンポリマーがあまり十分に特徴付けられていないという事実を変えはしないが、分子間の相違がかなり正確に知られている分子群を生産することができる。例えば、実施例 5 に記載されるエンドーガラクタナーゼを発現する塊茎由来のラムノガラクトツロナンは、ガラクトタン毛の長さ、アセチル化の程度及びウロン酸含量によって相当する野生型ポリマーと異なる。それ故、これらの特徴が認められる生物活性に必須であるかどうかを正確に決定付けることができる。

10

【0092】

一例としてペクチンを用いる場合、参加物 (entry) 間の相違が知られているライブラリーを (たとえ正確な構造が知られていなくても)、以下の工程を用いて作成することができる：

- 1) 調整ペクチンを、十分に確立された方法で修飾された多糖類を生じる、ある範囲の各トランスジェニック植物から回収し、
- 2) 工程 1 の試料を分けて、インビトロで酵素を用いて収穫後に処理し、
- 3) 工程 2 の試料を分けて、化学処理、ケン化及び例えば部分的な加水分解、及びインビトロでの誘導化によって修飾する。パーメチル化、アセチル化、エポキシ化及びアミド化は、後者の非限定的な例である。誘導化のタイプ及び方法は、食品成分産業、繊維産業及び有機合成ならびに炭水化物の分光光学からそれ自体公知である。

20

【0093】

工程 2 及び 3 は、望ましい場合には、化学修飾が、酵素反応に対して分子の幾つかの部分を保護するか又は曝す目的に役立つように、逆の順序で行ってもよい。

ライブラリーの参加物は、次いで当該分野でそれ自体公知のスクリーニング方法を用いて医薬活性のスクリーニングに付される。特定化合物の構造－機能関係は明らかなので、これは、収穫後 (工程 2) に用いられる酵素処理の幾つかを (植物による補償が可能な) 植物に移転し、それにより、ペクチンのインビボでのプロセッシングによって植物でできるだけ調整される原料物質について分子農業用形質転換植物を得るか否かを決定するのに有用な情報を与える。

30

この発明を、以下の非限定的な実施例及び図面によってさらに例示する。

【0094】

図 1 は、アスペルギルス・アキュリータスのエンドーガラクタナーゼを発現する 2 つのトランスジェニックのポテト植物 $T_{11.1}$ 及び $T_{13.1}$ を野生型と識別するための予備的な主成分分析 (PCA) の使用を例示する。それは、第三及び第五主成分 (PC) スコアを用いて、 $T_{13.1}$ と野生型との比較を示している。

図 2 は、野生型ポテト塊茎 (WT) 及びトランスジェニックポテト植物 $T_{11.1}$ ならびに $T_{13.1}$ の細胞壁から、それぞれ真菌性 EPG と PME の組合わせ処理によって特別に抽出されるラムノガラクトツロナン I (RGI) のサイズ排除クロマトグラフィー分析 (屈折率によって検出) (不定単位) を示す。この EPG/PME 処理は、野生型と比較して形質転換塊茎の細胞壁からほぼ 2 倍のウロン酸 (UA) を放出した。野生型細胞壁から EPG/PME によって抽出される RGI は、UA 含量及び屈折率検出によって示されるように 2 つの主画分：画分 (分子量 > 500 kDa) 及び画分 C (分子量 $0.2 \sim 8$ kDa) を含んだ。 $T_{11.1}$ 及び $T_{13.1}$ の EPG/PME 抽出物は、画分 A をあまり含まず、実質的には画分 C が多く、さらに野生型抽出物には存在しない ~ 120 kDa のフラグメント (画分 B) を含む、野生型とは異なるプロフィルを有する。＊は、ペクチン物質が全くない試料の緩衝塩が存在することに起因する、大きなピークを示す。

40

【0095】

図 3 は、モノクローナル抗体 LM5 でゴールドラベル (gold labeled) し

50

、銀で増強し、反射共焦走査顕微鏡（A， B）で及び透過型電子顕微鏡（C， D）で可視化した、野生型（A， C）及びエンドーガラクターナーゼ発現（ T_{13-1} ）（B， D）ポテト塊茎の切片を示す。野生型柔組織細胞壁は強く標識されている（Aの白色、Cの黒色粒子）が、 T_{13-1} の塊茎では、ラベル密度は非常に減少し、原形質膜に近い（Dの矢印）幾つかの細胞の角（Bの矢じり）にのみ局在している。＊は、澱粉顆粒によっていったんは占有された空間を示す。MLは、これらの角で満ちた拡張したミドルメラを示す。スケールバー：A及びB 100 μ m、C 及びD 2 μ m。

【0096】

実施例

材料と方法

試薬及び酵素

一般的な分子生物学的方法に用いられる酵素は全て、特に断らない限りBoehringer（Denmark）から購入した。細胞壁の特徴付け用の薬品及び試薬は、Sigmaから購入した。ブタの膵臓 α -アミラーゼはMerck（Darmstadt， Germany）から購入し、バシラス・アシドプルリティカス（*Bacillus acidopullulyticus*）のポルラーゼ（pullulanase）とアスペルギルス・ニガーのエンドーポリガラクトナーゼは、Megazyme International（Bray， Ireland）から購入し、アスペルギルス・アキュリータスの精製組換えペクチンメチルエステラーゼ（PME）は、Dr. Kirk Schnorr（Novo Nordisk A/S， Bagsvård， Denmark）からの寄贈物であった。

【0097】

植物の形質転換

ニコチアナ・タバカム（*Nicotiana tabacum*）（L.） cv. Xanthi. のリーフディスクの形質転換は、本質的にHorschら（1985）によって記載されるようにして行なった。形質転換体及び野生型植物双方のインビトロの植物由来の節間を温室に移し、成熟植物を得た。葉を回収し、分析に用いた。ポテトcv Posmo 及び Karnicoを、アグロリウム・ツメファシエンス媒介性形質転換に用いた（Visser， 1991）。トランスジェニック及び対照のクローンの苗条をインビトロで温室に移し、成熟植物を得た。

【0098】

DNA分析

DNAは、Rogers 及びBendlich（1988）によって記載されるようなCTABプロトコルにしたがって、液体 N_2 中ですり潰した葉から抽出した。トランスジェニッククローン中の導入遺伝子の存在を決定付けるために、単離したゲノムDNAを、cDNA内で2度切断するEcoRIと、cDNA内で1度切断するKpnIで消化した。消化したDNAを電気泳動で分離し、Sambrookら（1989）によって記載されるようなアルカリ条件下でHybond N膜（Amersham）にブロットした。膜は、Salehuzzamanら（1992）に記載されるように、ラムノガラクトナーゼ/pYES2の³²P-ATPラベル1 kb KpnI-XbaI cDNAフラグメントでハイブリダイズさせた。

【0099】

RNA分析

RNAは、Kuipersら（1994）によって記載されるように各トランスジェニック系の1塊茎から抽出した。組織（5 g）を液体 N_2 ですりつぶし、5 mlの抽出緩衝液（50 mM Tris， pH 9.0， 10 mM EDTA， 2 % SDS）及び5 mlのフェノールと混合した。混合物を遠心分離し（2，000 gで10分）、上清を5 mlのフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出し、混合物を再度遠心分離した。核酸を5 mlのイソプロパノールで沈澱させ、遠心分離した（2000 gで10分）。ペレットを1125 μ lの H_2O に溶解した。RNA

10

20

30

40

50

を、一晚 0℃で 375 μl の 8 M LiCl を用いて沈澱させ、遠心分離した (13, 000 g で 10 分)。RNA ペレットを 0.4 ml の H₂O に溶解し、40 μl の 3 M NaAc 及び 1 ml のエタノールを用いて沈澱させた。遠心分離後に、ペレットを 70 %エタノールで洗浄し、乾燥し、H₂O に再懸濁させた。RNA ゲルブロッティングとハイブリダイゼーションは、Sambrook ら (1989) によって記載されるように、試料当たり 40 μg の塊茎 RNA を用いて行った。膜は、以下の ³²P-ATP ラベル cDNA プローブ：ラムノガラクトツロナーリアーゼ / pYES2 の 1 kb KpnI-XbaI フラグメント及びポテト 28S リボソーム RNA 遺伝子の 2.3 kb EcoRI フラグメントを用いてハイブリダイズさせた (Landsmann 及び Uhrig, 1985)。

10

【0100】

葉及び塊茎の抽出物の調製

新たに回収した葉を、液体 N₂ を用いて凍結し、すりこ木とモーターを用い、組織 1 g (新鮮な重量) 当たり 3 ml の抽出緩衝液 A (完全な TM を含む 25 mM NaOAc pH 5.0, Boehringer Mannheim) で粉砕した。試料を氷上で 10 分インキュベートし、不溶性物質を 10 分の遠心分離 (18,000 x g_{max}) によって沈澱させ、上清を回収し、20℃で貯蔵した。新たに回収した塊茎を小さな立方体に切断し、液体 N₂ に凍結し、電気グラインダーで微粉末に細粉した。粉末を上記のような抽出緩衝液 A で抽出した。

20

【0101】

ガラクタナーゼ活性アッセイ

酵素活性は、50 mM クエン酸ナトリウム pH 4.5 中の上部 0.5 % 及び下部 1 % のアガロース層でプレートアッセイを用いて測定した。上部層は、1 mg/ml 濃度の基質、アズリン-結合ポテトガラクトン (Megazyme International, Bray, Ireland) の懸濁液を含んだ。組織上清のアリコート (20 μl) を上部層のみにあいたウェルに加えた。プレートを、24 時間室温でインキュベートした。

可溶性の定量ガラクタナーゼアッセイ。

野生型及び形質転換体 (T_{11.1} 及び T_{13.1}) の塊茎抽出物を、40℃で基質として 0.1 M NaOAc pH 4.0 中 0.1 % 濃度のポテトガラクトン (Megazyme の P-GALPOT) とともに p-ヒドロキシ安息香酸ヒドラジンアッセイ (Leever 1972) を用いて、エンドーガラクタナーゼ活性についてアッセイした。

30

【0102】

アラビナナーゼ活性アッセイ

酵素活性は、50 mM クエン酸ナトリウム pH 5.5 中の上部 0.5 % 及び下部 1 % のアガロース層でプレートアッセイを用いて測定した。上部層は、基質の懸濁液、1 mg/ml 濃度のアズリン-結合糖-ビートアラビナン (Megazyme International, Bray, Ireland) を含んだ。組織上清のアリコート (20 μl) を、上部層のみにあけたウェルに加えた。プレートを 24 時間室温でインキュベートした。

40

【0103】

アスペルギルス RG-リアーゼ活性

凍結したポテト組織を、液体窒素を加えてモーターですりつぶした。約 1 g のすりつぶしたポテトの組織を、0.4 M NaCl を含む 0.25 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5; 4℃) 2 ml 中で、Ultra-Turrax TP 18-10 (14,000 rpm, Ika Werk, Staufen, Germany) を用いて均質化した。4℃で (周期的に振盪させて) 抽出してから 1 時間後、懸濁液を遠心分離した (10 分, 2,000 g)。上清を、酵素抽出物として用いた。

次に、上清 5 μl を、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0 中 0.25 % w/v のケン化されたリンゴ MHR の溶液 245 μl に加えた。ボルテックスミキサーで 4

50

0℃で15分インキュベーション後、100℃で5分加熱して酵素を失活させた。ケン化されたリングのMHRの分解を、HPSEC (BioGel TSK 40XL、30XL及び20XL カラムのシリーズ) を用いて測定した。

【0104】

SDS-PAGE 及びウェスタンブロット

塊茎の抽出物を、標準的な方法にしたがってSDS-PAGE及びウェスタンブロット分析に付した。ブロットを、精製したアスペルギルス・アキュリータスのガラクタナーゼ (Jens-Christian Navarro Poulsen, Centre for Crystallographic Studies, University of Copenhagenからの寄贈物) に対して生じるウサギ抗体でプローブした。

10

【0105】

フーリエ変換赤外線顕微分光光度計

インビトロの植物からの20個の葉の表皮、及び20個の個々に新たに回収した野生型ならびにトランスジェニック (11.1, 11.2 及び13.1) の塊茎のビプラトーム切片 (60 µm) を、フッ化バリウム領域にのせ、空気乾燥させた。フッ化バリウム領域は、液体窒素-冷却水銀カドミウムテルル化物検出器を備えたBio-Rad FTS 175c FTIR 分光計のUMA 500顕微鏡補助段階で支持された。皮質及び延髄 (perimedullary) 領域の100 µm² 領域を選択し、スペクトルを観察した。64個のインターフェログラムを8 cm⁻¹ の解像の透過モードで回収し、同時に加え、各試料のシグナル-ノイズ比を改善した。スペクトルは、ベースライン修正し、面積を標準化した。領域1800~800 cm⁻¹ の面積標準化スペクトルの予備主成分分析 (PCA) を、WIN-DISCRIMソフトウェア (E. K. Kemsley, Institute of Food Research, Norwich, UK) を用いて行った。

20

【0106】

トランスジェニックポテト塊茎におけるペクチンの分析

ポテト植物におけるペクチンの微細構造を決定するには、ポテトの塊茎から細胞壁物質 (CWM) を単離することがまず必要である。ポテトの塊茎から皮を剥がし、さいの目に切り、液体窒素で凍結させた。その後、組織100 gを、Braun マルチミックスMR 860キッチンチョッパー (2 x 30秒、350ワット) を用いて粉末に切り刻んだ。ポテト粉末を、Ultra-Turrax T25 (24,000 RPM) を用いて、Triton X 100 (2 mg/ml) を含む300 mlの混合-カチオン緩衝液 (10 mM NaOAc, 3 mM KCl, 2 mM MgCl₂ 及び1 mM CaCl₂) で4℃で7 x 60秒で均質化した。また、ブレンド中の泡立ちを最小限にするために、オクタノールを数滴加えた。冷却した混合-カチオン緩衝液を用いて250及び36 µmの篩いで洗浄し、界面活性剤を除いた。この方法は4℃で行った。洗浄した残渣を篩いから除き、冷却した50%アセトン中に攪拌した。試料を濾過し、大きなビーカーに計量した。試料の5倍重量の飽和フェノール溶液を加えた。攪拌から30分後、吸引して飽和フェノールを除き、残渣をグレード3の焼結ガラスろうと上で混合-カチオン緩衝液で洗浄した。

30

40

【0107】

残渣を、液体窒素中で小さなペレットに凍結し、コーヒングライnderで2 x 15秒、凍結粉碎した。融解直後に、試料を混合-カチオン緩衝液を用いてペーストに混合した。このペーストを、沸騰している大量の混合-カチオン緩衝液に迅速に攪拌し、30秒沸騰させた。30秒の沸騰直後に、混合物を冷却した混合-カチオン緩衝液 (10容量) に移し、すぐに冷却させる。

澱粉の除去は、0.01% w/v NaN₃ を有する混合-カチオン緩衝液中約1,500単位のα-アミラーゼ (Boehringer) 及び400単位のプルラーナーゼ (pullulanase) (Megazyme) を用いて行った。試料は、37℃で一晩軌道振盪器で攪拌した。澱粉が依然として残っていれば、酵素処理を繰り返した。澱粉の存

50

在は、光学顕微鏡下1% KI/0.5% I₂を用いて検出された。澱粉の除去がKI染色によって評価されるように完全である場合には、細胞壁を36 μmの篩いで洗浄し、グルコースと塩を除いた。残渣を、細胞壁物質として凍結乾燥した。

【0108】

得られたCWMは、Huismanら(1999)によって記載されるように種々の溶媒での抽出により分画した。1gのCWM当たり、70 mlの0.05 M酢酸ナトリウム緩衝液pH 5.2を2回用いて60分室温で抽出し、40 mlの0.05 M酢酸ナトリウム緩衝液pH 5.2を3回用いて45分70℃で抽出し、0.05 M EDTAと0.05 M シュウ酸アンモニウムを含む35 mlの0.05 M酢酸ナトリウム緩衝液pH 5.2を3回用いて45分70℃で抽出し、最後に40 mlの0.05 M 水酸化ナトリウムを3回用いて45分2℃で抽出した。各抽出工程後、懸濁液をグレード3の焼結ガラスろうとで濾過した。

これは、5つの異なる画分、冷緩衝液可溶性固体(CBSS)、熱緩衝液可溶性固体(HBSS)、キレート化剤可溶性固体(ChSS)、アルカリ可溶性固体(ASS)及びヘミセルロースリッチな残渣(Rds)を生じた。それぞれ、異なる割合の細胞壁ポリマーを含んだ。次の分析前に、全画分を凍結乾燥した。

【0109】

CWMと画分を、異なる技術を用いて特徴づけた： 中性糖の組成は、試料を1 M H₂SO₄ 加水分解(100℃で3 h)に付して測定した。次に、放出された中性糖を、アルジトールアセテートに転化し、200℃で操作され、270℃に設定したフレイムイオン化検出器を備えたCarlo Erba Fractovap 2300 ガスクロマトグラフィー(Milan, Italy)中の、3% OV275 (Chrompack, Middelburg, The Netherlands)で被覆したChrom WAW 80-100 メッシュを充填した2-mm i.d. ガラスカラムで分離した。イノシトールを、内部標準として用いた。

アセチル及びメチルのエステル化の程度は、Voragenら(1986)によって記載される方法を用いてHPLCにより評価した。

【0110】

ペクチナーゼ、例えばポリガラクトツロナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、エンドアラビナーゼ、エンドガラクタナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ペクテートリアーゼ、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼを、高速サイズ排除クロマトグラフィー(BioGel TSK 40XL、30XL及び20XL カラムのシリーズ)及びDionex CarboPac PA-100カラム(250 x 4 mm, 20℃)を備えたDionex (Sunnyvale, CA, USA) Bio-LC GPM-11 クォータナリー(quaternary)勾配モジュールを用いる高速アニオン交換クロマトグラフィーと組み合わせて用い、ペクチン画分の構造をさらに解明した。しかし、可溶性の問題は、これらの実験を妨げた。

野生型ポテトペクチンの構造解析から得られる結果は、トランスジェニックポテトペクチンとの比較に用いられる。酵素の特徴づけ中に生じた可溶性の問題は、凍結乾燥の代わりに溶液中で画分を維持することによって解消できると考えられる。さらに、MALDI-TOF MSを用い、純粋かつ十分に特徴付けられた酵素により放出されるフラグメントを研究することによって、別の情報を得ることができる。

【0111】

ペクチン多糖類の単離

O'Neillら(1990)の方法にしたがって、澱粉を除いた細胞壁物質(10 mg)を、アジ化ナトリウム0.05%を含む2 mlの50 mM 蟻酸アンモニウムpH 4.5中に懸濁した。EPG(1 u、1分当たり還元ガラクトツロネート1 μmolを放出する1単位)と PME(1 u、1分当たりメタノール1 μmolを放出する1単位)を加え、懸濁液を16時間40℃でインキュベートした。次いで、懸濁液を2層ナイロン(30 μm孔度)で濾過し、10 mMホウ化水素ナトリウムを含む1 mlの氷冷5

0 mM炭酸ナトリウムに懸濁した残りの細胞壁物質からEPG/PME抽出物を分離した。この懸濁液を1時間4℃でインキュベートし、次いで室温で4時間インキュベートした。不溶性物質を、2層のナイロンで濾過して除いた。ろ液のpHをpH 5に調整し、EPG (1 μ)を加え、混合物を4時間40℃でインキュベートし、可溶化したペクチン物質を部分的に脱重合した。この消化された可溶性の細胞壁物質を炭酸抽出物と命名した。

【0112】

EPG/PME 及び炭酸抽出物双方を、Superose 12カラム (1 x 30 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いてサイズ排除クロマトグラフィーに付した。抽出物をカラムにかける前に、カラムを50 mM蟻酸アンモニウムpH 5.0で平衡化し、流速0.4 ml/分で同じ緩衝液を用いてアイソクラティックに溶出した。溶出物を、屈折率検出器 (モデル131, Gilson, Middleton, WI) を用いてモニターし、回収した画分 (0.8 ml) のウロン酸含量を、m-ヒドロキシビフェノールアッセイ (Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973) を用いて決定した。画分をプールし、凍結乾燥し、その単糖組成を決定付けた。溶出成分の分子質量は、デキストラン標準 (Fluka, Buchs, Switzerland) 及びガラクトツロン酸のものに対する保持時間を比較して評価した。

【0113】

単糖組成分析

シーマン (Seaman) 加水分解 (Selvendranら、1979) を用いて、単糖組成解析用の粗又は不溶性の細胞壁残渣を加水分解したが、可溶化した細胞壁画分は、2 M水性TFAを1時間121℃で用いると単糖に加水分解した。シーマン加水分解は、後述するように行った。細胞壁の残渣 (2~4 mg) を、ねじ蓋を付けたホウ珪酸塩試験管中の100 μlの超純水に加え、300 μlの濃H₂SO₄を加え、時折り攪拌しながら懸濁液を室温で3時間置いた。次に、懸濁液を6.6 mlの超純水で希釈し、2時間100℃で加熱した。冷却後、溶液を飽和水酸化バリウムで中和した。得られたBaSO₄の沈殿物を、5分遠心分離 (1000 x g max) で除き、残りの上清を回転蒸留器で濃縮し、その単糖組成を決定した。

【0114】

単糖混合物 (5~15 μg) をCarbo-Pac PA10 カラム (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) にかき、アイソクラティックに1.5 ml/分の流速で水を用いて溶出した。水酸化ナトリウム (300 mM) を、0.5 ml/分の流速で連続的にカラム溶離物に加え、パルス電流測定検出器 (Dionex) を用いて溶離物をモニターした。溶出する単糖を、糖標準 (フコース、ラムノース、アラビノース、キシロース、グルコース及びマンノース) の保持時間に比較して同定し、そのそれぞれのピーク面積の統合及び各単糖について得られる標準曲線に比較して、定量した。各単糖混合物のウロン酸含量を、m-ヒドロキシビフェノールアッセイ (Blumenkrantz 及びAsboe-Hansen 1973) により測定した。

【0115】

エステル化度の測定

アセチル及びメチルのエステル化の程度は、Voragenら (1986) によって記載される方法を用いてHPLCにより評価した。

ポテト塊茎のイムノゴールドラベル (Immunogold labeling)

形質転換体及び野生型の塊茎細胞壁は、本質的にBush 及びMcCann (1999) に記載されるようにして特徴づけた。手短に言えば、野生型及び形質転換体13.1由来のグルタルアルデヒド-固定塊茎について低温樹脂を埋め込んだ切片を、mAb LM5 (1, 4-β-ガラクトタンを認識 (Jonesら、1997)) でイムノゴールドラベルし、以前にMcCann ら (1992) が記載しているように、銀で増強し、反射レーザー走査共焦顕微鏡及び電子顕微鏡により分析した。

【0116】

実施例1

植物の形質転換用のDNA構築物の一般的なセット

DNA構築物 pPGB121s-new

ベクター pPGB121s (R. Visser からの寄贈物) からの顆粒結合型澱粉合成酵素のプロモーター領域を、プライマー 5' GATTACGCCCAAGCTTTAAAG3' (SEQ ID NO: 1) 及び 5' GGTTTGTCTGACGAAATCAGAAATAATTGGAGG3' (SEQ ID NO: 2) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅し、PCR生成物の 5' 末端に HindIII 部位及び 3' 末端に SalI 部位を導入した。さらに、PCR法により、GBSSの 5' 非翻訳領域の偽翻訳開始コドンに欠失させた。次いで、生成物をアガロースゲル電気泳動で精製し、HindIII/SalI切断 pGUSNos (L. Sander からの寄贈物) に連結し、pGBSS-GUSNosを得た。次いで、GBSSプロモーターフラグメントを、HindIII及びXbaIを用いてpGBSS-GUSNosから切除し、精製して、続いてHindIII/XbaI消化pBI121 (Datlaら、1992) にクローンし、ベクター pPGB121-newを得た。このベクターをSmaI及びSacIで消化し、GUSコード領域を除去した。次いで、SacI突出部をクレノウフラグメントで平滑化し、その結果、連結して閉じたベクターによって pPGB121s-newを得た。

【0117】

DNA構築物 pPGB121s-B

SalIとBamHIを用いて完全になるようにベクター pPGB121s-newを消化し、アガロースゲル電気泳動法で精製した。5' TCGACCGGTACCTAGGCCCGG3' (SEQ ID NO: 3) 及び 5' GATCCCGGGCCTAGGTACCGG3' (SEQ ID NO: 4) の配列を有する2つの合成オリゴヌクレオチドをアニーリングして得られるポリリンカーを、SalI/BamHI切断ベクターにクローンした。この工程により、AgeI、KpnI、AvrII、SmaI及びXmaIに対しユニークな部位を持つMCSを有するベクター pPGB121s-Bが得られた。

【0118】

DNA構築物 pGED

HindIIIで消化し、次いでヌクレオチドの存在下72℃で7分間Taqと反応させて突出部を埋め込み、pPGB121s-newのHindIII部位に欠失させた。得られた生成物をアガロースゲル電気泳動で精製し、連結反応で閉じ、pPGB121s-new-DHindIIIを得た。配列 5' TCGACAAGCTTTCTAGAGCCTCGAGG3' (SEQ ID NO: 5) 及び 5' GATCCCTCGAGGCTCTAGAAAGCTTGG3' (SEQ ID NO: 6) を有する2つの合成オリゴヌクレオチドをアニーリングして得られる新規のポリリンカーを、元のマルチクローニング部位 (MCS) の残余部分にクローンし、プラスミド pGEDを得た。新規のMCSはHindIII、XbaI及びXhoIに対する制限部位を導入した。

【0119】

DNA構築物 pADAP

pGEDをSalI及びBamHIで消化し、アガロースゲル電気泳動で精製した。5' TCGACCGGTACCAAGCTTGCGGGCTCTAGACTCAGAGCCTAGGCCCGG3' (SEQ ID NO: 7) 及び 5' GATCCCGGGCCTAGGCTCGAGTCTAGAGCCCGCAAGCTTGGTACCGG3' (SEQ ID NO: 8) を有する2つの合成オリゴヌクレオチドをアニーリングして得られる新規のポリリンカーを、pGEDの元のMCSの残余部分にクローンし、プラスミド pADAPを得た。新規のMCSは、AgeI、KpnI、HindIII、XbaI、XhoI、AvrII及びSmaIに対する制限部位を導入した。

10

20

30

40

50

【0120】

DNA構築物 pPGB121s-B-B33

ベクター pBINB33 (L. W i l l m i t z e rからの寄贈物) を E c o R Iで消化し、アガロースゲル電気泳動で精製した。次いで、オリゴヌクレオチド 5' A A T T C A A G C T T G 3' (S E Q I D N O: 9) 及び 5' A A T T C A A G C T T G 3' (S E Q I D N O: 10) をアニーリングして得られる H i n d I I 部位をエンコードするリンカーを、E c o R I 切断 p B I N B 3 3 ベクターにクローンした。この工程により、ベクター p B I N B 3 3 - E H E が得られた。パタチン B 3 3 プロモーターを持つフラグメントを単離するために、p B I N B 3 3 - E H E ベクターを H i n d I I 及び S a l I で消化した。得られたフラグメントを H i n d I I I / S a l I 消化 p P G B 1 2 1 s - B にクローンし、プラスミド p P G B 1 2 1 s - B - B 3 3 を得た。

【0121】

実施例 2

アポプラストに対し標的化される多糖類-修飾酵素を有する植物の形質転換のための特異的な DNA 構築物

DNA構築物 pGED-GAL

アスペルギルス・アキュリータスのガラクタナーゼをエンコードする 1, 3 k b の c D N A を、H i n d I I I 及び X b a I で消化してベクター p C l G l (S. K a u p p i n e n からの寛大な寄贈物) から切除し、精製し、p G E D M C S の相当部位にクローンして、G B S S プロモーター、エンドーガラクタナーゼ、ノパリン合成酵素ターミネーターの発現カセットをつくった。この DNA 構築物を、p G E D - G A L と示す。

【0122】

pGED-ARA の構築

アスペルギルス・アキュリータスのアラビナナーゼをエンコードする 1, 2 k b の c D N A を、H i n d I I I 及び X b a I で消化してベクター p C l A 4 (S. K a u p p i n e n からの寛大な寄贈物) から切除し、精製し、p G E D M C S の相当部位にクローンし、プラスミド p G E D - A R A を得た。

DNA構築物 pADAP-ARA

アスペルギルス・アキュリータスのアラビナナーゼをエンコードする 1, 2 k b のフラグメントを、H i n d I I I / S a l I で消化して p G E D - A R A から単離し、予め切断した p A D A P にクローンした。この工程により、ベクター p A D A P - A R A が得られた。

DNA構築物 pADAP-GAL

アスペルギルス・アキュリータスのガラクタナーゼをエンコードする 1, 3 k b のフラグメントを、H i n d I I I / S a l I で消化して p G E D - G A L から単離し、予め切断した p A D A P にクローンした。この工程により、DNA 構築物 p A D A P - G A L が得られた。

【0123】

DNA構築物 pPGB121s-B-B33-ARA

アスペルギルス・アキュリータスのアラビナナーゼをエンコードする 1, 2 k b のフラグメントを、K p n I 及び S m a I で消化して p A D A P - A R A から単離した。次いで、フラグメントを予め切断した p P G B 1 2 1 s - B - B 3 3 にクローンした。この工程により、DNA 構築物 p P G B 1 2 1 s - B - B 3 3 - A R A が得られた。

DNA構築物 pPGB121s-B-B33-GAL

アスペルギルス・アキュリータスのガラクタナーゼをエンコードする 1, 3 k b のフラグメントを、K p n I 及び S m a I で消化して p A D A P - G A L から単離した。次いで、フラグメントを予め切断した p P G B 1 2 1 s - B - B 3 3 にクローンし、パタチン B 3 3 プロモーター、エンドーガラクタナーゼ、ノパリン合成酵素ターミネーターの発現カセットをつくった。この工程により、DNA 構築物 p P G B 1 2 1 s - B - B 3 3 - G A L が得られた。

【0124】

DNA構築物 pPGB121s-new-RHGB

植物の形質転換ベクター pPGB121s-new を制限酵素 *SaI* で消化し、クレノウ酵素で平滑末端化し、2つの酵素を熱失活させた後、制限酵素 *XbaI* でさらに消化した。アスペルギルス・アキュリータスのラムノガラクトツロナンリアーゼをエンコードする cDNA クローンを含むベクター pYES2/RHGB を制限酵素 *BamHI* で消化し、クレノウ酵素で平滑末端化し、2つの酵素を熱失活させた後、制限酵素 *XbaI* でさらに消化した。処理されたベクター及び cDNA 挿入断片を、アガロースゲル電気泳動後に精製し、連結して、DNA 構築物 pPGB121s-new-RHGB をつくった。

【0125】

実施例 3細胞内区画に遺伝子産物を標的化させるための構築物のデザイン DNA 構築物 pADAP/ARA-KDEL

アラビナナーゼをエンコードする cDNA を、鋳型としてベクター pGED/ARA を用いて、プライマー ACAGCTCAACAAGTGGTAAC (GBSSプライマー、SEQ ID NO: 11) 及び

【化 1】

GACTTCTCGAGTGGCTGG-CCTGTTGTGAAGGATGAACTTTAGTCTAGAAATGCTC

(ARA-KDEL プライマー 2、KDEL ER 保持シグナルをエンコードするヌクレオチドはイタリック体で示し、設計した停止コドンは太字で示す、SEQ ID NO: 12) で増幅した。次いで、得られた生成物を、製造業者 (Invitrogen) により記載されるようにしてベクター pCR2.1-TOPO にクローンした。この工程により、異なる配向で ARA-KDEL 生成物を有するベクター pCR2.1-TOPO/ARA-KDEL 1 及び 2 の混合物を得た。

【0126】

PCR 中に生じたエラーにより、後に発現に問題が生じる可能性を最小限にするために、ARA-KDEL コード領域の大部分を、酵母発現ベクター pC1A4 に含有される本来の ARA cDNA から生じるコード領域と交換した。ベクター pCR2.1-TOPO/ARA-KDEL 1 及び 2 を *SaI* 及び *XbaI* で切断し、その結果生じたフラグメントをエンコードする KDEL を *SaI/XbaI* 切断 pC1A4 にクローンした。この結果、ベクター pYES2.0/ARA-KDEL が得られた。次いで、ARA-KDEL フラグメントを *HindIII* 及び *XbaI* で pYES2.0/ARA-KDEL から切除し、*HindIII/XbaI* 消化 pADAP にクローンした。これによりベクター pADAP/ARA-KDEL を得た。

【0127】

DNA構築物 pPGB121s-B-B33-ARA-KDEL

ARA-KDEL 融合体を *KpnI* 及び *SmaI* で pADAP/ARA-KDEL から切除し、フラグメントをアガロースゲル電気泳動で精製した。得られたフラグメントを *KpnI/SmaI* 消化 pPGB121s-B-B33 にクローンした。この工程により、ベクター pPGB121s-B-B33/ARA-KDEL が得られた。

DNA構築物 pPGB121s-B-B33-ARA-KDEL

ARA-KDEL 融合体を *KpnI* 及び *SmaI* を用いて pADAP/ARA-KDEL から切除し、フラグメントをアガロースゲル電気泳動で精製した。得られたフラグメントを *KpnI/SmaI* 消化 pPGB121s-B-B33 にクローンした。この工程により、ベクター pPGB121s-B-B33/ARA-KDEL が得られた。

【0128】

DNA構築物 pADAP/ST-ARA

グリコシルトランスフェラーゼ α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ (ST) は、ゴ

10

20

30

40

50

ルジ装置に局在する I I 型膜タンパク質である。このタンパク質の最初の 44 アミノ酸が、融合マーカータンパク質、リゾチームのゴルジ保持を管理することは以前に明らかにされている (Munro 1991)。その上、GFP のゴルジ標的化は、ST の 52 N-末端アミノ酸を融合することで行われている (Boevink ら、1998)。

【0129】

この目的のために、ST の 52 N-末端アミノ酸と成熟形態のエンドーアラビナナーゼとの融合体を有する構築物は、以下のように生産される。

関連する ST 領域は、プライマー (ST SOE FWD、下線は ST 特異的配列) 5' GACGAAGCTTATGATTTCATACCAACTTG 3' (SEQ ID NO: 13) 及び (ST SOE REV、下線は ST 特異的配列) 5' GGAGCCGGG GTTGGCGTA-GGCCACTTTCTCCTGGCTTC 3' (SEQ ID NO: 14) を用いて PCR によって増幅した。鋳型として用いたプラスミド pST-MYC は、Soren Mogelvang からの寄贈物であった。次いで、アラビナナーゼの成熟部分を、プライマー (ARA SOE FWD、アラビナナーゼの特定配列は太字で示す)

【化 2】

5'GAGCCAGGAGAAAGTGGCCTACGCCAACCCCGGCTCC 3' (SEQ ID NO:15)

及び (ARA SOE REV、アラビナナーゼ特異的配列は太字)

【化 3】

5' CAGTCTAGACTACACAACAGGCCAGCC 3' (SEQ ID NO:16).

用いて増幅した。2つの生成物をアガロースゲル電気泳動で精製し、次いで、配列重複伸長 PCR (sequence overlap extension PCR) で融合し (Higuchi 1988)、ST の 52 N-末端アミノ酸をアラビナナーゼの成熟部分 (302 アミノ酸) に融合させた。融合生成物をアガロースゲル電気泳動で精製し、HindIII 及び XbaI で消化し、HindIII/XbaI 消化 pADAP にクローンした。得られたプラスミドは pADAP/ST-ARA と名付けた。

【0130】

実施例 4

2つの遺伝子を持つ構築物のデザイン

DNA 構築物 pGED/double/1 及び pGED/double/2

ベクター pPGB121s-B を HindIII 及び EcoRI で切断した。得られた GBSS-Tnos 発現カセットを持つフラグメントの末端を Taq でふさぎ、得られた生成物を製造業者 (Invitrogen) により記載されるようにベクター pCR2.1-TOPO にクローンした。この工程により、ベクター pCR2.1-TOPO/GBSS-nosterm1 及び pCR2.1-TOPO/GBSS-nosterm2 を得た。各ベクターを EcoRI で消化し、得られたフラグメントをアガロースゲル電気泳動で精製した。フラグメントを、EcoRI で消化し、製造業者 (Boehringer Mannheim) により記載されるようにアルカリシュリンプホスファターゼで脱リン酸化したベクター pGED にクローンした。この工程により、2つの GBSS プロモーターに続いて SalI、HindIII、XbaI、XhoI、BamHI (MCS1) ならびに SalI、AgeI、KpnI、AvrII、SmaI、XmaI 及び BamHI 部位 (MCS2) を有するマルチクロニング部位を持つベクター pGED/double/1 及び pGED/double/2 を得た。

【0131】

再構築及び補助酵素をエンコードする遺伝子を持つ DNA 構築物 pPGB121s-ne w-RHGB-RHA1:

ベクター pBI221 (Clontech) を制限酵素 EcoRI で消化し、脱リン酸化し、フェノール/クロロホルムで抽出して、アルコールで沈殿させた。リン酸化オリゴヌクレオチド P-AATTAAGCTT (SEQ ID NO: 17) を自己アニーリングさせ、EcoRI 制限 pBI221 ベクターに連結し、ベクター pBI221-2HindIII をつくった。

ベクター pBI221-2HindIII を制限酵素 SacI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化し、2つの酵素を熱失活させた後、さらに制限酵素 BamHI で消化した。処理されたベクター (pBI221-2HindIII* B* Sb) を、アガロースゲル電気泳動後に精製した。

【0132】

アスペルギルス・アキュリータスのラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼをエンコードする cDNA クローンを含有するベクター pGEM-7Z/RHA1 を制限酵素 XbaI で消化し、クレノウ酵素で平滑末端化し、2つの酵素を熱失活させて、さらに制限酵素 BamHI で消化した。処理された cDNA 挿入断片をアガロースゲル電気泳動後に精製し、ゲル精製したベクター部 pBI221-2HindIII* B* Sb に連結し、ベクター pBI221-2HindIII-RHA1 をつくった。ベクター pBI221-2HindIII-RHA1 を制限酵素 HindIII で消化し、35S プロモーター-ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、ノパリン合成酵素ターミネーターを含む発現カセットを、ゲル電気泳動後に精製した。

【0133】

DNA 構築物 pPGB121s-new-RHGB を制限酵素 HindIII で消化し、脱リン酸化し、ゲル電気泳動後に精製して、35S プロモーター、ラムノガラクトツロナンアセチルエステラーゼ、ノパリン合成酵素ターミネーターの発現カセットを含む精製された HindIII フラグメントと連結し、DNA 構築物 pPGB121s-new-RHGB-RHA1 をつくった。

【0134】

DNA 構築物 pGED/apoGAL/empty/1 及び pGED/apoGAL/empty/2

構築物 pGED/GAL を HindIII/XbaI で消化し、得られたフラグメントをエンコードする GAL をアガロースゲル電気泳動で単離した。ベクター pGED/double/1 及び pGED/double/2 を HindIII 及び XbaI で切断し、アガロースゲル電気泳動で精製し、次いで、フラグメントをエンコードする GAL をクローニングした。これらの工程により、それぞれ pGED/apoGAL/empty/1 及び pGED/apoGAL/empty/2 と命名される2つのベクターを得た。したがって、2つのベクターは、最初の GBSS/Nos ターミネーターカセットの GBSS プロモーター及び Nos ターミネーター間のアポプラストの標的とされるガラクタナーゼを備えた。

【0135】

「自己プロセッシング」二重 DNA 構築物のデザイン

アスペルギルス・アキュリータスのエンドーガラクタナーゼをエンコードする 1.3 kb の cDNA フラグメントを、予め構築したベクターの1つから単離し、pGED/double/1 又は 2 に存在する2つの GBSS/Nos ターミネーターカセットの1つの GBSS プロモーターと Nos ターミネーター間にクローし、アポプラスト発現カセット GBSS プロモーター-エンドーガラクタナーゼ-Nos ターミネーターをつくった。これらのベクターを pGED/apoGAL/1 及び 2 と名付け、全ての二重 DNA 構築物のデザインに出発ベクターとして用いた。第2 GBSS プロモーター-Nos ターミネーターカセットは、細胞質、小胞体 (ER) 又は植物の液胞に細胞壁修飾酵素を運ぶためにデザインした発現カセットの構築に用いた。酵素は、収穫後の作用により、髄質細胞壁から当該生成物を放出する酵素が優先される。下記の実施例 12 では、非制限的な例であるが、エンドーガラクタナーゼを再構築酵素として用い、エンドーPGを切除酵素として

10

20

30

40

50

用いる自己プロセッシングを立証している。エンドーPGを導入し、それを種々の細胞下の位置に標的化させるベクター構築物は、概説されるように製造される：

【0136】

細胞質の標的化。

細胞質の標的化には、中性pHの環境で安定性の高い植物、細菌又は菌類由来のエンドーPGが好ましい。細胞質への標的化は、エンドーPGシグナルペプチドをエンコードするエンドーPG cDNAから配列を除去し、それにより小胞体にわたるその輸送を破壊して行われる。成熟タンパク質のN-末端がタンパク質配列から公知でない場合は、シグナルペプチドの切断部位は、この目的のために最適化したコンピュータプログラムを用いて経験的に決定される。次いで、成熟エンドーPGタンパク質をエンコードするcDNAを、構築物pGED/apoGal/empty/1とpGED/apoGal/empty/2における第2GBSS/No sターミネーターカセットのGBSSプロモーターとNo sターミネーター間にクローンした。

【0137】

ERの保持。

ER保持には、わずかに酸性から中性pHの環境で安定性の高い植物、細菌又は菌類由来のエンドーPGが好ましい。ERへの標的化は、コード領域の最末端でテトラペプチドKDELをエンコードする配列を、エンドーPGをエンコードするcDNAに導入し、そのC-末端でKDEL伸長を有するタンパク質を発現させて行った。次いで、融合タンパク質をエンコードするcDNAを、ベクターpGED/apoGal/empty/1とpGED/apoGal/empty/2における第2GBSS/No sターミネーターカセットのGBSSプロモーターとNo sターミネーター間にクローンした。

【0138】

液胞の標的化。

液胞の標的化には、酸性の環境で安定性の高い植物、細菌又は菌類由来のエンドーPGが好ましい。液胞への標的化は、例えば、ハイブリッドをERへ確実に移動させるシグナル配列をエンコードするヌクレオチド配列を結合し、次いで、例えばアミノ酸NPIRL（N-末端プロペプチド（NTPP）の一例）からなる液胞のシグナル配列を結合して行われる。あるいは、NPIRLの伸長等は問題のタンパク質のC-末端に融合させ、ERへ確実に移動させるシグナル配列は、液胞の標的化を支配するタンパク質のN-末端部に融合させる（Koidera, 1997）。

【0139】

N-末端にNTPPを有するタンパク質の例は、サツマイモのスポラミンである。スポラミンのN-末端部は、スポラミンN-末端に融合する場合に、液胞では通常見られないタンパク質をこの区画に向かわせることが以前に示されている。したがって、スポラミンのN-末端部をエンコードするヌクレオチド配列を、ペクチン骨格を加水分解する（即ち、シグナルペプチドを欠失している）酵素をエンコードするヌクレオチド配列に直接融合させ、それによってペクチナーゼを液胞に標的化させることができる。次いで、融合タンパク質をエンコードするcDNAを第2GBSS/No sターミネーターカセットのGBSSプロモーターとNo sターミネーター間にクローンする。このベクターをpGED/apoGALvacPG/1と称する。以下の実施例10及び11は、シグナル遺伝子構築物を用いて、エンドアラビナナーゼのER及び液胞それぞれへの標的化を例証している。

【0140】

実施例5

ポテト中のラムノガラクトツロナンのガラクトタン側鎖の再構築

塊茎—特異的GBSSプロモーターの制御下、菌類（アスペルギルス・アキュリータス）のエンドーガラクタナーゼ（Christgauら、1995）を発現するポテト植物を作成した（実施例2参照）。低い形質転換効率とは別に、得られた植物は、野生型植物と比較して表現型を変えなかった。低い頻度は、プロモーターがインビトロの培養中、活性

であること、また、生育のこのごく初期段階に高レベルなエンドーガラクタナーゼ活性は形質転換細胞に致命的な可能性があることを示している。内因性のエンドーガラクタナーゼ活性は野生型ポテト植物の塊茎抽出物ではほとんど検出できないが、 $T_{11.1}$ 及び $T_{13.1}$ については、活性レベルは、それぞれ 104 及び 214 μmol ガラクトース当量 / 分 / 塊茎の新鮮な重量 g であった (表 2)。 $T_{11.1}$ 及び $T_{13.1}$ は、FTIR 分光計ではじめに選択されるような細胞壁表現型であるため、分析用に選択した (下記参照)。

【0141】

トランスジェニック植物のエンドーガラクタナーゼ活性は、低塩緩衝液中で定量的に抽出された。これは、酵素が細胞壁にしっかりと結合されていないことを示している。トランスジェニック植物及び野生型植物からの抽出物もウェスタンブロット法で分析した。エンドーガラクタナーゼ活性を有する抽出物はすべて、単離された組換え型エンドーガラクタナーゼに類似する分子質量 38 kDa のタンパク質を含有した。

【0142】

細胞壁の単離及び抽出中に、導入されたエンドーガラクタナーゼならびに内因性ペクチナーゼによるペクチン物質の酵素分解を避けるために、幾つかの予防措置を講じた。デオキシコレートナトリウム含有緩衝液を用いてタンパク質を変性、可溶化し、次いで植物のペクチナーゼ、特に導入されたエンドーガラクタナーゼの最適活性に好ましくない pH を有する緩衝液中で数回、氷冷抽出して希釈した。細胞壁の調製中、細胞壁抽出緩衝液にエンドーガラクタナーゼ活性は検出できなかった。フーリエ変換赤外線顕微分光測光法は、形質転換体の初期選択に用いた。予備的主成分分析 (PCA) により、 $T_{11.1}$ 及び $T_{13.1}$ の 2 つの形質転換体を野生型と明確に区別できた。図 1 は、第 3 及び第 5 主成分 (PC) のスコアを用いて、 $T_{13.1}$ と野生型との比較を示している。したがって、これらの形質転換体を、さらなる分析のために選択した。細胞壁物質の収率は、野生型よりも形質転換体で低く、これは残余澱粉含量でも同じであった (表 2)。細胞壁調製物の単糖組成は、野生型と比較して双方の形質転換体のガラクトース含量において ~30% の劇的な減少を示した (表 3)。幾つかの単糖測定で、標準的な変動は非常に高いことが判明した。しかしながら、不確定性は、形質転換された表現型と関連していないが、調製された細胞壁の残余澱粉とはほとんど常に関連している。ガラクトシル残基は種々の細胞壁多糖類 (ヘミセルロース、アラビノガラクタンタンパク質及び RGI) に存在するが、RGI のみが β -1, 4-連結ガラクタンを含有することが知られているため、細胞壁物質のその後の分析はこのポリマーに集中させた。

【0143】

RGI は、菌類の EPG と PME を組み合わせて処理することにより、細胞壁から特別に抽出した。この EPG/PME 処理により、野生型と比較してほぼ 2 倍の UA が、形質転換塊茎の細胞壁から放出された (表 3)。 EPG/PME 可溶化ペクチンをサイズ排除クロマトグラフィーで分析し、分子の大きさによって消化フラグメントを分離した。野生型細胞壁由来の EPG/PME で抽出した RGI は、UA 含量及び屈折率の検出で示されるように 2 つの主要画分を含有した (図 2) : これらを画分 A (分子量 > 500 kDa) 及び画分 C (分子量 0.2 ~ 8 kDa) と称した。 $T_{11.1}$ 及び $T_{13.1}$ 由来の EPG/PME 抽出物は、野生型とは異なるプロフィルを有し (図 2)、少量の画分 A 及び実質的に多い画分 C、さらに野生型抽出物には存在しない ~120 kDa のフラグメント (画分 B) を含んだ。* は、ペクチン物質が全くない試料の緩衝塩が存在することに起因する大きなピークを示す。

【0144】

糖分析で測定されるように (表 3)、野生型塊茎の画分 A は、高い割合の UA、ラムノース、アラビノース及びガラクトースを含有して、他の単糖類を実質的に含まない。これは、HGA 及び RGI ポリマーが高分子量であることを示している。しかしながら、野生型塊茎の画分 A は、ガラクトシル残基を 64 mol% 含有するのに対し、トランスジェニック塊茎は 15 ~ 20 mol% しか含有しない。これは、ガラクタン量が主に減少してい

10

20

30

40

50

ることを示唆している。トランスジェニック塊茎のアラビノシル含量はわずかに増し、U A 含量は著しく高い。興味深いことに、フコシル残基はトランスジェニックの画分 A では検出できなかったが、野生型の画分 A では非常に低い%で検出された（フコシル残基はポテト R G I のガラクトン側鎖の置換基である可能性がある）。トランスジェニック塊茎の画分 A 及び B の単糖組成は、類似していた（表 3）。野生型ならびに形質転換塊茎細胞壁の画分 C は、主に H G A フラグメントを含有したが、小分子量の R G I フラグメントもいくらか検出された。トランスジェニック塊茎から得られる R G I フラグメントは、画分 A 及び B と同様に、野生型塊茎（3.8 mol%）と比較してガラクトシル含量が低かった（1.4~1.5 mol%）。しかしながら、比較的多量のグルコシル残基は、細胞壁の調製中の α -アミラーゼ処理によって放出されるオリゴ糖での細胞壁物質の混入を示している可能性がある。

【0145】

E P G / P M E での細胞壁物質の酵素処理は、細胞壁を完全には脱ペクチン化（dep ectinate）しない。したがって、炭酸ナトリウムを 4℃で室温で用い、さらなる連続抽出を行った（表 3）。炭酸塩での脱エステル化は、E P G / P M E 抽出とは異なって、全くペクチンを可溶化せず、野生型とトランスジェニック細胞壁調製物の収率は類似していた。炭酸塩の抽出物をサイズ排除クロマトグラフィーにかけたところ、一方がボイド容量（分子量 > 500 kDa）で、他方は G a l A と等しい保持時間を有し、単糖類又は少量のオリゴ糖の存在を示す 2 つの U A 含有画分が得られた（データ示さず）。後者の画分は、試料中に高濃度の塩が存在しているため、単糖組成を分析できなかった。大きなポリマーを含む抽出物を単糖分析したところ、R G I を表す、高い割合のアラビノース、ガラクトース、U A 及びラムノースが示された（表 3）。かなりの量のグルコシル残基及びキシロシル残基が、おそらくは炭酸塩抽出で可溶化されたシキログルカンから得られた。トランスジェニック細胞壁の炭酸塩抽出物は、野生型に対し減少したガラクトシル含量も示した（18~19%対52%）。また、炭酸塩抽出物に存在する R G I のアラビノシル含量は一定であるのに対し、U A 含量のみは T_{13.1} の細胞壁調製物では高いが、T_{11.1} では高くなかった。

【0146】

ペクチンは、酵素抽出及び炭酸塩緩衝液抽出の後に細胞壁内に残っている可能性がある。E P G / P M E 及び炭酸塩での連続処理前後の細胞壁の単糖組成を、ペクチンを溶解した効率を定量するために比較した（表 3）。ペクチンの抽出後、細胞壁にラムノースは検出されなかった；ラムノースは中程度の感度でのみ検出されるけれども、これは、非抽出細胞壁に存在する R G I が連続抽出で完全に除かれたことを示唆している。しかしながら、野生型及び形質転換塊茎について抽出された細胞壁は、類似した量のガラクトースをなおも含有した。このガラクトースは多くが、 β -1, 2-連結ガラクトシル残基を含むことが知られている、シキログルカンのような R G I 以外の細胞壁成分から生じると思われ、エンドーガラクタナーゼで加水分解されない。キシログルカンは、濃縮アルカリ又はシキログルカナーゼの処理によってのみ抽出され、したがって、この研究で用いられる手順で処理した細胞壁内に存在するものと予想される。興味深いことに、U A 含量は、形質転換体よりも野生型の残余細胞壁で 3 倍以上高く、形質転換体からのペクチンの抽出性の増大を示した。

【0147】

1, 4- β -D-ガラクトンが、1, 4- β -D-ガラクトンの四量体を認識するエンドーガラクタナーゼモノクローナル抗体 L M 5 で特異的に加水分解されるかどうかを決定するため、野生型及び T_{13.1} の成熟塊茎組織をイムノゴールドラベルに用いた（図 3）。

【0148】

図 3 は、モノクローナル抗体 L M 5 でゴールドラベルされ、銀で増強され、反射共焦走査顕微鏡（A、B）及び透過型電子顕微鏡（C、D）により可視化された野生型（A、C）及びエンドーガラクタナーゼ発現（T_{13.1}）（B、D）型のポテト塊茎の切片を示

す。野生型柔組織細胞壁は強く標識されているが（Aの白色、Cの黒色粒子）、 T_{13} 塊茎ではラベル密度は非常に減少し、原形質膜に近い（Dの矢印）幾つかの細胞の角（Bの矢じり）にのみ局在する。＊は、澱粉顆粒によって一度は占有された空間を表す。MLは、これらの角で満ちた拡張したミドルラメラを示す。スケールバー： A及びB 100 mm、C及びD 2 mm。

【0149】

ガラクトースの除去によってラムノガラクトツロナン（RG）分子に生じる構造変化を測定するため、 T_{13} 及び野生型の対照から単離したRGについて、Hakomori（1964）にしたがって結合パターンを測定した。下記の表1に要約した結果は、内部 $\beta-1,4$ -ガラクトシル残基を有する内部ガラクトシル残基の幾つかのタイプの極めて著しい低下に伴われる末端ガラクトシル残基の予想される増加は、野生型レベルの約1/9に低下し、少ない結合の多くは形質転換体において検出限界を下回るほど低下したことを示している。

【0150】

これらの結果から、トランスジェニックの細胞壁から単離される全てのRGIポリマーはガラクトース含量を著しく減少しており、分泌酵素が細胞壁内では活性で、RGIの多数のガラクトタン側鎖を加水分解したことが明らかことが結論付けられた。局所免疫化により、ガラクタナーゼについての基質の除去はほぼ完了し、抗体LM5もガラクタナーゼも結合できないほど短い毛状領域のガラクタナーゼが残ることが示された。結合分析はこれらの結果を裏付けており、組成が変化しているのみならず、新たなラムノガラクトツロナン構築物が生産されたことを立証している。電子顕微鏡写真は、原形質膜に面する細胞壁側面（細胞壁のうちで最も最近合成された部分）に少量の長いガラクトタンが生じることを示しており、これは、新たに合成されたガラクタンの堆積が、たとえガラクタンの除去が優勢な過程であっても、これと競合することを示唆している。これは、植物細胞壁多糖類の単糖プロフィール及び結合パターンに関する再構築の最初の立証である。結果を表1に要約する：

【0151】

【表1】

野生型及びトランスジェニックポテトの細胞壁のグリコシド結合数度(mol%)

糖	野生型ポテト	トランスジェニックポテト T _{13.1}
2-Rha	4.0	8.1
2,4-Rha	7.7	13.6
^{ab} t-Araf	4.1	4.1
5-Araf	28.1	40.1
2,3,5-Araf	-	2.9
t-Gal	7.2	13.9
3-Gal	3.3	4.7
4-Gal	36.1	4.0
3,4-Gal	1.0	-
2,4-Gal	1.4	-
4,6-Gal	2.5	-
t-xyl	0.7	1.4
4-Xyl	0.8	1.6
^c 4-Glc	2.8	5.6

^at- は末端残基を示す

^bAraf はアラビノシル残基のフラノース形態を示す

^c多くの 4-Glc には、澱粉が混入している

10

20

30

40

【0152】

結論

トランスジェニックの細胞壁から単離される全ての R G I ポリマーがガラクトース含量を著しく減少させており、分泌された酵素が細胞壁内では活性で、R G I の多くのガラクトン側鎖を加水分解したことが示された。局所免疫化により、ガラクタナーゼについての基質の除去がほぼ完了し、抗体 L M 5 もガラクタナーゼも結合できないほど短い毛状領域のガラクタナーゼのみが残ることが示された。電子顕微鏡写真は、原形質膜に面する細胞壁側面（細胞壁のうちで最も最近合成された部分）に少量の長いガラクトンを示しており、これは、新たに合成されたガラクトンの堆積が、たとえガラクトンの除去が優勢な過程であっても、これと競合することを示唆している。これは、植物細胞壁多糖類の単糖プロフィール及び結合パターンに関する再構築の最初の立証である。

【0153】

【表2】

エンド-ガラクタナーゼの活性及び細胞壁収率^a

	ガラクタナーゼ 活性 (μmol ガラクトース 当量/分/新鮮重量 g)	細胞壁収率 (mg/新鮮重量 g)	壁の残留澱 粉含量 (質量%)	抽出収率 ^b (μg UA-当量 / 乾燥壁 mg)	
				EPG/PME ^c	Na_2CO_3 ^c
野生型	1.6	13.1 ± 2.0	14.6 ± 5	71.9 ± 2.5	14.0 ± 1.4
T _{11.1}	104	8.6 ± 2.1	11.9 ± 6	115.5 ± 20.7	11.5 ± 0.9
T _{13.1}	214	9.5 ± 2.5	9.1 ± 5	142.2 ± 14.3	20.3 ± 6.5

10

^a データ ($\pm$ SD) は、3つの独立した実験の平均である

20

^b *m*-ヒドロキシビフェノールアッセイで測定

^c 抽出の詳細は、材料と方法に記載する

【 0 1 5 4 】

【 表 3 】

トランスジェニック及びWTのポテト塊茎から得られる物質の糖組成(mol%)^a

	フコース	アラビノース	ラムノース	ガラクトース	グルコース	キシロース	マンノース	UA
抽出前の壁								
野生型	0.3 ± 0.3	6.2 ± 2.7	1.4 ± 1.2	9.4 ± 1.5	53.0 ± 7.0	2.6 ± 0.2	0.4 ± 0.4	26.7 ± 1.7
T _{11.1}	0.3 ± 0.1	6.8 ± 2.8	1.4 ± 1.2	3.3 ± 1.1	61.0 ± 5.6	3.0 ± 2.3	0.6 ± 0.5	23.5 ± 8.0
T _{13.1}	0.3 ± 0.1	4.8 ± 1.2	0.8 ± 0.4	2.6 ± 0.4	63.5 ± 5.9	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.4	25.9 ± 6.6
EPG/PME								
A 野生型	0.2 ± 0.2	15.8 ± 1.2	5.7 ± 2.0	64.6 ± 4.1	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.3	nd ^b	13.0 ± 2.5
T _{11.1}	nd	30.3 ± 9.9	10.4 ± 8.4	20.5 ± 2.5	0.4 ± 0.4	2.4 ± 0.8	nd	36.0 ± 2.2
T _{13.1}	nd	25.1 ± 6.9	7.0 ± 4.5	15.8 ± 3.6	0.2 ± 0.3	1.4 ± 1.5	nd	50.5 ± 12.3
B ^c T _{11.1}	nd	32.3 ± 1.1	7.8 ± 3.1	20.3 ± 0.5	0.3 ± 0.4	0.7 ± 0.6	nd	38.6 ± 4.3
T _{13.1}	nd	20.8 ± 7.8	5.5 ± 2.2	13.3 ± 3.9	0.4 ± 0.6	0.4 ± 0.8	nd	59.6 ± 11.8
C 野生型	nd	2.2 ± 0.7	2.5 ± 0.5	3.8 ± 1.5	24.8 ± 24.9	0.1 ± 0.2	nd	66.4 ± 22.8
T _{11.1}	nd	2.0 ± 0.6	2.5 ± 2.2	1.4 ± 0.6	28.9 ± 25.4	0.3 ± 0.3	nd	64.9 ± 24.3
T _{13.1}	nd	4.2 ± 2.8	1.1 ± 0.3	1.5 ± 1.0	9.5 ± 3.3	1.5 ± 2.6	0.4 ± 0.7	81.9 ± 10.3
Na ₂ CO ₃								
野生型	nd	23.0 ± 7.9	7.1 ± 3.3	52.0 ± 10.9	5.2 ± 5.9	2.8 ± 2.8	nd	9.9 ± 3.7
T _{11.1}	nd	38.9 ± 13.7	13.6 ± 6.9	18.9 ± 3.3	5.5 ± 5.0	3.7 ± 1.3	1.5 ± 2.6	17.9 ± 8.3
T _{13.1}	nd	34.2 ± 14.9	9.7 ± 6.6	18.3 ± 4.6	3.4 ± 4.8	2.3 ± 2.1	nd	32.1 ± 28.3
抽出後の壁								
野生型	nd	4.2 ± 0.5	nd	2.4 ± 1.1	46.0 ± 5.9	15.6 ± 5.4	1.5 ± 1.9	30.2 ± 0.9
T _{11.1}	nd	3.6 ± 0.2	nd	2.4 ± 1.5	73.3 ± 7.6	7.8 ± 5.9	5.8 ± 9.2	7.0 ± 2.9
T _{13.1}	nd	3.4 ± 1.1	nd	1.8 ± 0.5	74.2 ± 7.6	10.5 ± 6.4	0.3 ± 0.1	9.7 ± 1.0

^a データ (±SD) は、3つの独立した実験の平均である^b 検出不能^c 画分 B は、WT 植物の EPG/PME 抽出物には存在しなかった (図 2 参照)

10

20

30

40

50

【0155】

実施例 6

パタチンプロモーターにより駆動されるガラクタナーゼ

ガラクタナーゼが G B S S - プロモーターよりむしろパタチンプロモーターで駆動されるように、本質的に p P G B 1 2 1 s - B - B 3 3 - G A L を用いて実施例 5 に記載される

ようにして、トランスジェニックのポテト植物を得た。遺伝子発現分析から、発現が効果的に塊茎に制限され、GBSS-プロモーターとの比較としての他器官への導入に高濃度のショ糖を要することが示された。塊茎での発現は、GBSS-プロモーターで見られる発現とはあまり相違しなかった。塊茎の細胞壁表現型がガラクタナーゼ遺伝子の発現を駆動するプロモーターに依存していないことを確認するために、LM5抗体を用いて塊茎を免疫学的特徴付けに付した。

【0156】

実施例 7

アポプラストに標的化したラムノガラクトツロナンリアーゼを発現させるために形質転換したポテト

10

250個の外植体を、アグロバクテリウム・ツメファシエンスでの形質転換に用いた（pPGB121s-new-RHGBならびに材料と方法の実験手順を参照）。これにより、21個の個々の形質転換系が作成され、そのうち18個を本発明の分析に用いた。一般に、トランスジェニック植物は正常で、若干数のみ（18%）が表現型に変化を生じた。対照と比較して、これらの植物は小さく、また小さな葉を有した。葉は厚みがあり、ざらざらしていて巻き上がっていた。さらに、これらの植物は、他の全トランスジェニック及び対照と比較して色濃かった。表現型が変えられた植物は全て、塊茎を生じる前に枯れた。他の実験（他の遺伝子での形質転換）で同様の表現型が見出され、（倍数化のような）形質転換の手法自体には影響が及ぼされるが、特定の遺伝子や構築物には影響がないことが示唆された。一見、正常な植物は、表現型の変化した塊茎を生じると思われる。

20

【0157】

DNA、RNA及びタンパク質レベルの初期分析後、当該系を増殖させ、次の分析のための物質を多く得た。（カナマイシン耐性に基づいて）形質転換に成功した全トランスジェニック系をサザンブロット分析に付した。18個の植物のうち15個では、rhg-リアーゼ遺伝子が検出された。他の全ての植物において、遺伝子は1つ又は2つのコピーのいずれかで存在する。実際に塊茎を生じた植物のみを、導入遺伝子の発現のために分析した。したがって、11個の異なる系から単離したRNAのみを、ノーザンブロット分析に用いた。プローブとしてリボソームのポテトDNAフラグメントを用いるRNAゲルブロットハイブリダイゼーションにより、各系で等量のRNAが示された。ラムノガラクトツロナン-リアーゼプローブを用いた塊茎RNAのハイブリダイゼーションにより、大部分の植物（11個のうち9個）について明確な遺伝子転写物が示された。9個のうち4個は高発現因子と称することが可能であるが、他の5個は低い発現レベルを示し、その中でさらに差別化を行った。ハイブリダイゼーションを全く示さなかった2個も、サザンブロット分析でネガティブな結果を生じた。導入遺伝子のコピー数（1又は2）とRNA発現レベルとに、明確な相関関係は見出せなかった。導入遺伝子の発現を検出できる系の全てを、さらなる分析に使用した。RG-リアーゼを発現するトランスジェニックポテト植物の酵素的な特徴付けから、9個のRG-リアーゼ形質転換体のうち3個は高いリアーゼ（オリゴマーへの基質の完全分解）活性を示すが、他は中程度の活性（9個のうち1個）、低い活性（2個）又は非常に低い活性（3個）を有することが示された。さらに、mRNA含量と酵素活性とに積極的な相関関係が見出された。

30

40

【0158】

RGL形質転換体の塊茎の糖組成は、ラムノガラクトツロナンリアーゼについての基質の点で、対照植物の糖組成とむしろ似ていることが分かった。下記の表4は、高及び低発現形質転換体ならびに野生型のポテト塊茎由来全細胞壁の分析データを示している。1.5〜1%のラムノースの減少は、毛状領域含量の低下を示している。

【0159】

【表4】

単離した細胞壁組成、cv Karnico 野生型及び2つのRG-リアーゼ発現形質転換由来全細胞壁における単糖のw/w% (パネル上部)ならびに mol% (パネル下部)

単離した細胞壁物質中の糖組成、澱粉及びタンパク質の含量			
% w/w	野生型	高発現因子	低発現因子
タンパク質	8.8	10.3	8.6
澱粉	3.7	1.2	1.4
糖全体	75.0	71.0	71.0
Mol %			
ラムノース	1.5	1.0	1.0
アラビノース	8.3	4.7	5.3
キシロース	2.5	4.1	4.1
マンノース	1.6	2.1	2.6
ガラクトース	22.0	4.4	5.8
グルコース	38.3	41.7	42.8
ウロン酸	25.9	42.1	38.4
DA	35.0	18.0	19.0
DM	25.0	41.0	36.0

10

20

【0160】

特に塊茎の表現型が変化したことを考慮すれば、上記の結果は最初は驚くべきものであったかもしれない。結果は以下のように説明することができる。毛状領域は、天然ペクチンのホモガラクトツロナン配列を相互連結していると考えられている (Shols & Vora-gen 1996)。ラムノガラクトツロナンリアーゼは、これらの相互連結配列を攻撃するが、ラムノガラクトツロナンを完全には分解できない。したがって、比較的小さな部分の毛状領域は、エンドーラムノガラクトツロナンリアーゼによって放出されるオリゴ糖として細胞から逃れることができる。ラムノース (ラムノガラクトツロナンを表す) は、細胞壁で比較的少数の糖である。ガラクトツロン酸は細胞壁中では非常に豊富であるが、ホモガラクトツロナンの最大部に存在する。新しい細胞壁の表現型は、実施例5で行われたような細胞壁における特定のエピトープの免疫局在化を用いて記載されるように、実際、組成上の表現型よりむしろ構造上の表現型である。ガラクトタン及びアラビナンからなるラムノガラクトツロナン側鎖は、その結合のためにラムノース残基に依拠している。双方の糖が極めて著しく減少し、中性糖側鎖でのまばらな置換をもたらす毛状領域の主要な構造変化を示していることは、注目すべきことである。共焦顕微鏡法でアラビナン及びガラクトタン抗体を用いる局所免疫化は、組成分析を裏付けている。さらに、これらの試験は、パランチマル (paranchymal) 澱粉を含む細胞は双方のエピトープに対しごく少数の標識しか示さないが、形質転換体の幾つかの皮層細胞は、細胞角補強材中のガラクトタン及びアラビナンを標識していることを明らかにしている。

30

40

【0161】

実施例 8

ゴルジ装置に対する酵素活性の標的化

ガラクタナーゼについて実施例6に記載したストラテジにしたがって、菌類アラビナナー

50

ゼを発現させ、アポプラストに対して標的化し、タバコとポテトの双方について生育可能な植物を得た。タバコ植物は確認できる表現型を全く示さなかったが、ポテト形質転換体の多くは部分的に機能不全の分裂組織を有した。アラビナナーゼを制御するためにGBSSプロモーターを用いたところ、ほとんど全ての葉腋芽が非機能性分裂組織を有した。したがって、植物発生の態様を制御するためのこの発明の有用性をも例示する新たな無枝植物構造物をつくった。

【0162】

酵素活性のゴルジ標的化は、(「自己プロセシング植物物質」で酵素を貯蔵するための細胞内部位としてではなく)アポプラストへの分泌の代替手段として認められるべきである。この技術の効果は、ゴルジで生じる多糖類生合成過程を直接干渉することができる。この技術は、植物の生存能を損なわない設計上の選択肢の範囲を広げる。 10

【0163】

ラット由来のグリコシルトランスフェラーゼ α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ(ST)は、単独で(Weeら、1998)、及びリゾチーム(Munro、1991)又は緑蛍光タンパク質(GFP)(Boevinkら、1998)に融合した切形(truncated)形態で、植物細胞のゴルジ装置へ標的化されることが、以前に示されている。したがって、種々の異種タンパク質の適切なゴルジ保持を促進する能力について、このタンパク質を評価した。STは、ERへの輸送中に翻訳後に切断されるシグナル配列、短いアミノ末端細胞質ドメイン、ゴルジを局在化させる非切断疎水性シグナルアンカー及び大きな触媒ルーメンドメインからなるII型膜タンパク質(即ち、細胞質ゾルにアミノ末端を局在させる)である(Weinsteinら、1987)。したがって、内部シグナルアンカーは、STのこの部分にN-末端で融合される異種タンパク質を保持するのに十分であるはずである。これは、STのN-末端部の52アミノ酸と44アミノ酸それぞれをニワトリのリゾチーム(Munro 1991)及びGFP(Boevinkら、1998)に融合したBoevinkら(1998)及びMunro(1991)の研究により示された。 20

【0164】

したがって、ラットのシアリルトランスフェラーゼは、タンパク質がゴルジ装置に可溶化形態で見られるのとは対照的に、タンパク質がゴルジ膜にしっかりと結合されていることを期待する一般的な要求を満たしている。可溶性タンパク質はゴルジを通過して移動し、周期的に原形質膜に存在し、それによって、細胞器と直接接触すると考えられる。この目的のため、ラットのシアリルトランスフェラーゼを、組換え型PCR(Higuchi 1988)を用いてアスペルギルス・アキュリータスのアラビナナーゼの成熟部に融合し、得られた融合体を発現ベクターpADAP及びpPGB121s-B-B33に導入することによって、GBSS及びパタチンそれぞれのプロモーター制御下にあるST-ARA融合体を有する2つの構築物を得た。構築物を、エレクトロポレーション及びニコチアナ・タバカム(L.) cv. Xanthi及びソラナム・ツベロサム(Solanum tuberosum)(L.) cv. Posmoの形質転換に用いた細菌宿主でアグロバクテリウムに移した。 30

【0165】

分画遠心分離を用いて、酵素の主要部分がミクロソーム画分にあることが裏付けられた。ゴルジに対する局在化は、古典的な細胞小器官分離法(Rayら、1969、Gibeau及びCarpita 1990)を用いて決定付けた。GBSSプロモーターの制御下でST-ARA融合体を有する植物を分析した。活性酵素の発現は、アラビナナーゼプレートアッセイを用いて塊茎抽出物で立証した。ウェスタンブロットを用いて、活性とミクロソーム画分、その後の細胞小器官の分離との関連性が立証され、大多数のアラビナナーゼがゴルジ小胞と結合しているが、溶解性のアポプラスト画分と細胞質画分にも原形質膜にも、酵素タンパク質は検出されないことが立証された。検出できるが、低いレベルが小胞体で認められた。これは、ゴルジへの輸送中に新たにアラビナナーゼが生産されたことを示している。小胞体画分が少量のゴルジ小胞で交雑混入 40 50

(cross contamination) されることは、排除できない。最も重要なのは、実験により、アラビナナーゼが可溶性酵素から膜結合酵素に形質転換され、第一標的がゴルジ装置であることが立証されたことである。

これらの塊茎の細胞壁を、実施例 5 で行ったように、EPG/PM抽出毛状領域の単糖組成について分析した。結果を下記の表 5 に要約する：

【0166】

【表 5】

野生型及びゴルジに標的化したエンド-アラビナナーゼを発現する形質転換体から抽出される毛状領域における糖の Mol%

10

糖残基	野生型	形質転換体 5.2
アラビノース	7.9	3.8
ガラクトース	62.9	68.8
ラムノース	10.7	13.6
ガラクトン酸	13.1	12.7
キシロース	0.9	1.1
グルコース	4.5	7.4

20

【0167】

要約すると、ゴルジに対して標的化したアラビナナーゼの発現は、毛状領域結合アラビノースを約 50% 減少させた。共焦顕微鏡で観察されたアラビナン特異的抗体での標識パターンにより、組成データが裏付けられた。これは、何らかの方法により、ゴルジでの複合多糖類合成過程を干渉することを目的とした最初の実施例である。

【0168】

実施例 9

30

補助酵素を用いる二重構築物

インビトロの研究から、ラムノガラクトンナーリアーゼの作用は、ラムノガラクトンナーアセチルエステラーゼと組み合わせて用いると増すことが知られている。したがって、ポテトの塊茎でこれらの酵素双方を発現させるため、二重構築物をつくった（実施例 4 の pPGB121s-new-RHGB-RHA1 参照）。ポテト植物を形質転換し、21 個の個々のトランスジェニック系を得た。重要な表現型上の変化は認められなかった。しかしながら、これらの 2 つの酵素を組み合わせることにより、rhg-リアーゼのみが存在する形質転換体に匹敵するような大きな影響が期待された。リアーゼは独力で活性であることが分かっているので、性質上類似した表現型が期待される。

【0169】

40

実施例 10

ER における多糖類修飾酵素の保持

ここに定義される「自己プロセシング植物物質」に関連しているため、ER での保持を以下に例示する。本発明の好ましい実施態様において、多糖類骨格を切断する酵素、一般にはヒドロラーゼ又はリアーゼは、ER で保持されている。植物物質を均質化することにより、酵素は細胞壁と接触し、上清画分で回収される成分を可溶性にする。ER-保持を、アラビナナーゼに関してここに例示する：他の適当な酵素を下記の実施例 12 に列挙する。

少なくともアポプラストに分泌される場合、WO 94/20611 のアラビナナーゼ SEQ ID NO: 1 は、ポテトに毒性であることが分かった（Liblikova ら、

50

1999)。タバコを本発明で用いて、活性形態の多糖類－修飾酵素のERにおける蓄積を立証した。材料と方法に詳述するように、遺伝子は、アラビナナーゼ－KDEL cDNAを有するpADAPベースの構築物で形質転換したタバコcv. XanthiのKDELタグ標識化エンドアラビナナーゼの変異型であった。

【0170】

形質転換した植物の葉の抽出物の酵素蓄積を、プレートアッセイを用いて評価した（材料と方法参照）。形質転換に成功した植物は、全て活性アラビナナーゼを生産した。アッセイは本来半定量的であるが、葉の粗抽出物の活性はたった15分以内（形質転換体間では多少の変動がある）で検出でき（試料を含むパンチされたウェルの周囲に幅1mm以上の青いハロー）、酵素活性が極めて著しいことを示した。分画遠心分離により、測定可能な割合の酵素がマイクロソーム画分に捕捉されていることが立証され、ERでの保持が示された。その上、タバコの葉のアポプラスト流体を、Hustedら（1995）の方法を用いて単離することができる。アポプラスト流体に測定可能なアラビナナーゼ活性がないという可能性は、酵素がアポプラスト空間に誤って分類された証拠とみなすことができる。

【0171】

実施例 1 1

酵素の液胞への標的化

ERでの保持に関し、液胞標的化の例を「自己プロセシング植物物質」の項に示す。細胞内区画への標的化を立証するシグナル遺伝子－構築物を、実施例 3 に示す。液胞の酸性環境で安定であると考えられる酵素は、この細胞小器官に貯蔵されてもよい。手近には、2つの一般的な手段がある：遺伝子産物がそのまま蓄積される遺伝子の5'－配列に当該遺伝子を備える；あるいは、液胞への侵入時に（部分的又は全体として）切断されるN－末端伸長を有する当該遺伝子を設計する。液胞のポテトパタチンタンパク質N－末端部（146 アミノ酸）（Sonnewald ら、1991）及びサツマイモのスプラミンタンパク質（111アミノ酸）（Turk ら、1997）は、この目的に適した候補である。

【0172】

サツマイモのスプラミンでは、液胞の標的化情報は、一次構造のN－末端部に存在する。ERへタンパク質を確実に輸送するN－末端シグナル配列を切断した後、プロフォーム（pro-form）は、プロペプチドが切断される液胞に効率的に標的化される（Koidera、1997）。液胞標的化決定因の正確な位置がN－末端に存在することは知られているが、その正確な位置は知られていないポテトパタチンとは異なり、スプラミンの液胞標的化シグナルは十分に特徴付けられている。したがって、スプラミンは、植物の液胞に異種タンパク質を標的化するのに用いられる。液胞への移転後に、融合タンパク質のスプラミン部分の大多数を切断することによって、确实性の程度が高い異種タンパク質が得られるであろう。パタチンを用いる類似手段により、永久的なN－末端伸長部が得られ、異種タンパク質のミスフォールディング及び活性損失が生じる可能性がある。

【0173】

この目的のため、液胞－標的化ポテトパタチンCDR及びサツマイモのスプラミンコード領域の111アミノ酸をクローンし、配列決定した。スプラミン／パタチンのN－末端と適当なエンドーポリガラクトナーゼとの間に融合体を有する構築物を得ることができる；以下の実施例参照。ウェスタンブロット分析を用いて、（適用可能な）液胞への侵入によるプロセシングを確認することができる。ER－保持エンドーアラビナナーゼについての記載に相似する形質転換体の評価によって、液胞における活性エンドーPGの蓄積が示されるであろう。

【0174】

実施例 1 2

ガラクタナーゼ＋エンドーポリガラクトナーゼを発現する二重構築物からなる自己プロセシング塊茎

アポプラストへの分泌を宿命とするガラクタナーゼならびに内部貯蔵を目的とする真菌又

は植物由来のエンドー P G を有する二重構築物を調製することができる（実施例 4 の「自己プロセッシング」DNA 構築物のデザイン）参照）。ガラクタナーゼは、インビボで調整する望ましいペクチンを触媒する酵素のプレースホルダーとみなすべきである。植物及び真菌のエンドーポリガラクトツロナーゼは、この実施例で「自己プロセッシング植物物質」を例示するために用いられる。しかし、植物又は微生物由来のリアーゼがこのような状況で同様に有用であることも十分に留意すべきである。

【0175】

菌類のエンドーポリガラクトツロナーゼは、ホモガラクトツロナンの装飾（特にアセチル化）に対する感度、及び触媒にとっての pH 最適条件に対するそれらの安定性質（例えば、液胞が酸性環境であることを留意して）について選択される。受入れ番号 A F O 7 4 2 1 3、W O 9 4 / 1 4 9 5 2 及び W O 9 4 / 1 4 9 5 2 のアスペルギルス・アキュリータス由来のポリガラクトツロナーゼ I、I I 及び I I I は興味深い生化学性質の大体の範囲を包含するが、他のポリガラクトツロナーゼも使用できる。

高等植物のエンドー P G タンパク質配列の比較によって、異なる 2 種のエンドー P G が明らかにされた。一方は、シグナルペプチドと成熟タンパク質との間に位置するプロペプチドを有するが、他方はそのようなプロペプチドを有しない。プロペプチドの機能はいまだ確立されていない。

【0176】

プロペプチドを有しないタイプの非分泌エンドー P G（修飾エンドー P G A、B 及び C）を持つ二重構築物の標的化は、E R（実施例 10）及び液胞（B 及び C）（実施例 11）へのエンドーアラビナナーゼの標的化について既に例示されるようにして行うことができる。しかしながら、この場合は、細胞質内での遺伝子産物の蓄積も考慮される（A）。W e g e n e r ら（1996）は、エルウィニア・カルトボーラのペクテートリアーゼが、検出可能な表現型の変化なしにトランスジェニックポテトの葉と塊茎双方の細胞質にどのように蓄積されたかを記載している。発現された熱安定細菌のセルラーゼを、トランスジェニック植物の細胞質に蓄積することも成功している。Z i e g e l h o f f e r と協力者は、非常に制限された量ではあるが、トランスジェニックのアルファルファ、ポテト及びタバコのサーモモノスポラ・ファスカ（*Thermomonospora fusca*）から E 2 及び E 3 セルラーゼを生産した（Z i e g e l h o f f e r ら、1999）。セルラーゼ発現について表現型の作用は認められなかった。

【0177】

前述したように、K D E L が既に転位したタンパク質を E R で保持するのに対し、シグナルペプチドは実際の転位を担っている。したがって、問題の酵素を細胞質で蓄積させるために、シグナルペプチドを植物宿主での発現前に除く必要がある。シグナルペプチドの切断部位がタンパク質の配列決定で決定されない場合には、例えば神経回路網シグナル P（N i e l s e n ら、1997）を用いて、もっとも可能性の高い切断部位を決定することができる。

シグナルペプチドの物理的除去は、問題の酵素の成熟部に特異的なプライマーで P C R を用いることにより D N A レベルで行われる。この手段によっても、細胞質蓄積を宿命とする酵素の成熟部の翻訳を最適にするための開始コドン及び配列が確実に導入される。

プロペプチドのない代表的な植物のエンドー P G は、ダイズの A F 1 2 8 2 6 6 : P G 1 及びトマトの U 7 0 4 8 0 : T A P G 2 を含むが、これに制限されない。

【0178】

細胞質、E R 又は液胞に対し、プロペプチドを有するタイプの非分泌エンドー P G（修飾エンド P G D - I）を標的化することは、各区画ごとに、2 種の修飾エンドー P G によって行われるべきである。前記の項に記載される 3 つの修飾が成熟タンパク質の前にプロペプチド完全体を残す 1 系列（D、F 及び H）、及びプロペプチドが除かれる 3 つからなる 1 系列（E、G 及び I）は、プロペプチドを含むものと、又は含まないものとがある、3 つの異なる局在化をカバーする合計 6 個の異なる構築物（D - I）を生じる。プロペプチドを有する植物のエンドー P G の例は、なたねの脂肪種子の X 9 5 0 0 : R D P G

1 及びキーウィフルーツの P 3 5 3 3 6 である。実施例 6 による分析は、ガラクタナーゼ発現に起因する細胞壁の表現型が、実施例 5 及び 6 の結果から予測されたとおりであることを確認するのに用いることができる。さらに、機能性エンドポリガラクトツロナーゼの発現及び蓄積は、ノーザンブロット及びウェスタンブロットの分析ならびにポリガラクトツロナーゼ活性のアッセイにより確立される。

【0179】

参考文献

- Baron-Epel, O., Gharyal, P. K. & Schindler, M. (1988) Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells *Planta* 175:389-395. 10
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973) *Anal. Biochem.* 54:484-489.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., 及び Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15:441-447
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Betteridge, M. B., Hawes, C. (1998) Stacks on tracks: The plant golgi apparatus traffics 20 on an ER/actin network. *Plant J.* 15:441-447
- Braccini, I., Grasso, R. P., Perez, S., (1999) Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydr. Res.* 317:119-130.
- Bush, M. S., McCann, M. C. (1999) Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) t 30 ubers. *Physiol. Plant.* 107:201-213.
- Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1-30.
- Chanliaud, E., Gidley, M. J. 1999. In vitro synthesis and properties of pectin/*Acetobacter xylinus* cellulose composites. *Plant J.* 20:25-35. 40
- Chen, L., Carpita, N. C., Reiter, W.-D., Wilson, R. H., Jeffries, C. & McCann, M. C. 1998. A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J.* 16:385-392.
- Christgau, S., Sandal, T., Kofod, L. V. & Dalboge, H. (1995) Expression cloning, purification and characterization of a b-1, 4-galactanase from *Aspergillus aculeatus*. *Curr* 50

. Genet. 27:135-141

Cote, F. & Hahn, M. G. (1994) Oligosaccharins: structures and signal transduction Plant Mol. Biol. 26:1379-1411.

Daas, P. J. H., Arisz, P. W., Schols, H. A., de Ruiter, G. A., Voragen, A. G. J. (1998) Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Anal. Biochem. 257:195-202. 10

Datla, R. S., Hammerlindl, J. K., Panchuk, B., Pelcher, L. E. & Keller, W. (1992) Gene 122, 383-384. [誤植がGene 129:311に公表された].

Dhugga, K. S., Tiwari, S. C., Ray, P. M. (1997) A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved plant cell wall synthesis: Purification, gene cloning, and trans Golgi localization Proc Natl Acad Sci US A 94:7679-7684 20

Edwards, G. A., Hephner, A., Clerk, S. P. & Bolter, D. (1991) Pea lectin is correctly processed, stable and active in leaves of transgenic potato plants. Plant Mol. Biol. 17:89-100

Essl, D., Dirnberger, D., Gomord, V., Strasser, R., Faye, L., Glossl, J., Steinkellner, H. (1999) The N-terminal 77 amino acids from tobacco N-acetylglucosaminyltransferase I are sufficient to retain a reporter protein in the Golgi apparatus of Nicotiana benthamiana cells. FEBS Lett 453(1-2):169-73 30

Fry, S. C. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Ann. Rev. Plant Physiol. 37:165-86.

Gibeaut, D. M., Carpita, N. C. (1990) Separation of membranes by flotation centrifugation for in vitro synthesis of plant cell wall polysaccharides Protoplasma 156:82-93 40

Hakomori SI (1964) A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J Biochem 55:205-208

Herbers, K., Wilke, I., Sonnewald, U. (1995) A thermostable Xylanase from Clostridium thermocellum expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco. Bio/technology 13:63-66

Higuchi, R., Krummel, B., 及び Saiki, R. K. (1 50

- 988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research* 16:7351-7367.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., 及び Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Huisman, M. M. H.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. (1999) Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal. *Carbohydrate Polymers* 38:299-307
- Husted, S., Schjoerring, J. K. (1995). Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* 109:1453-1460.
- Kempin, S. A., Liljegren, S. J., Block, L. M., Rounsley, S. D. Yanofsky, M. F. (1997) Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* 389:802-803.
- Jarvis, M. C., Hall, M. A., Threlfall, D. R. & Friend, J. (1981) The polysaccharide structure of potato cell walls: chemical fractionation. *Planta* 152:93-100.
- Jones, L., Seymour, G. B. & Knox, J. P. (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1,4)- β -D-galactan. *Plant Physiology* 113:1405-1412.
- Koide, Y., Hirano, H., Matsuoka, K., 及び Nakamura, K. (1997). The N-terminal propeptide of the precursor of sporamin acts as a vacuole-targeting signal even at the C terminus of the mature part in tobacco cells. *Plant physiology* 114:863-870.
- Kuipers, A. G. J., Jacobsen, E., 及び Visser, R. G. F. (1994) Formation and deposition of amylose in the potato tuber starch granule are affected by the reduction of granule-bound starch synthase gene expression. *／tge Oka* 40
bt /cekk 6:3-52
- Landsmann, J., Uhrig, H. (1985) Somoclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. *Theor. Appl. Genet.* 71:500-505
- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G. & Albersheim, P. (1985) Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. 50

- Carbohydrate Res. 137:111-125..
- Lever, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. - Analytical Biochemistry. 47:273-9
- Libiakova, G., Skjot, M., Sorensen, S., Jorgensen, B., Ulvskov, P. (1999). Influence of constructs harbouring an arabinanase encoding cDNA on potato transformation efficiency. "From Cell to Crops". The Third International Symposium in the Series: Recent Advances in Plant Biotechnology. September 1999, Stara Lesna, Slovak Republic. 10
- Mayer, F. (1998) Potato pulp: properties, physical modification and applications. Polymer Degrad. and Stability 59:231-235.
- McCann, M. C. & Roberts, K. (1994) Changes in cell wall architecture during cell elongation. Journal of Experimental Botany 45:1683-1691.
- McCann, M. C., Hammouri, M. K., Wilson, R. H., Belton, P. S. & Roberts, K. (1992) Fourier transform infrared microscopy is a new way to look at plant cell walls. Plant Physiol. 100:1940-1947. 20
- Moloshok, T., Pearce, G., 及び Ryan, C. A. (1992). Oligouronide signaling of proteinase inhibitor genes in plants: structure-activity relationships of Di- and trigalacturonic acids and their derivatives. Arch. Biochem. Biophys. 294:731-734. 30
- Munro, S. (1991). Sequences within and adjacent to the transmembrane segment of alpha-2, 6-sialyltransferase specify Golgi retention. EMBO J 10:3577-88.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., 及び von Heijne, G. (1997). Identification of procaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Prot. Engineering 10:1-6.
- O'Neill, M. A., Albersheim, P. & Darvill, A. G. (1990) in The pectic polysaccharides of primary cell walls, ed. Dey, P. M. pp. 415-441. 40
- O'Neill, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A. G. & Albersheim, P. (1996) Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester - In vitro conditions for the formation and hydrol 50

- ysis of the dimer J. Biol. Chem. 271:22923-22930.
- Paulsen, B. S. (編集) (2000) Bioactive carbohydrate Polymers. Proceedings of the phytochemical society of Europe. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Ray, P. M., Shiniger, T. L., Ray, M. M. (1969) Isolation of α -glucan synthetase particles from plant cells and identification with golgi membranes Proc Natl Acad Sci USA 64:605-612 10
- Rogers, S. O., Bendich, A. J. (1988) Extraction of DNA from plant tissues. In: Plant Molecular Biology Manual. S. B. Gelvin & R. A. Schilperoort (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. A6/1-11.
- Ryden, P., Selvendran, R. R. (1990) Structural features of cell wall polysaccharides of potato (*Solanum tuberosum*). Carbohydr. Res 20 195:257-272.
- Sakurai, M. H., Kiyohara, H., Matsumoto, T., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y., Yamada, H. (1998) Characterization of antigenic epitopes on anti-ulcer pectic polysaccharides from *Bupleurum falcatum* L. using several carbohydrases. Carbohydrate Res. 311:219-229
- Salehuzzaman, S. N. I. M., Jacobsen, E., Vissler, R. G. F. (1992) Cloning, partial sequencing and expression of a cDNA coding for branching enzyme in cassava. Plant Mol. Biol. 20:809-819 30
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory
- Samuelson, A. B., Lund, I., Djaromi, J. M., Paulsen, B. S., Wold, J. K., Knutsen, S. H. (1999) Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. Carbohydraten Polymers 38:135-143 40
- Samuelson. AB, Paulsen, BS, Wold, JK, Knutsen. SH, Yamada, H. (1998) Characterisation of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. Carbohydrate Polymers 35:145-153
- Satoh, S. 1998. Functions of the cell wall in the interactions of plant cells: Analysis 50

- using carrot cultured cells. - Plant Cell Physiology. 39:361-368.
- Selvendran, R. R., March, J. F. & Ring, S. G. (1979) Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fibre Anal. Biochem. 96:282-292.
- Schols, H. A., Voragen, A. G. J. (1996) Complexpectins: structure elucidation using enzymes, In Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases Eds: J. Visser and A. G. J. Voragen, Elsevier Amsterdam NL: 3-20 10
- Sonnenwald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stitt, M., 及びWillmitzer, L. (1991). Transgenic tobacco plants expressing yeast derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. Plant Jour. 1:95-106.
- Sorensen, S. O., Skjot, M., Ulvskov, P., Dalboge, H., Borkhardt, B. (1999). Modification of pectin by expression of a fungal endo- β -1,4-galactanase in potato. Plant Protein Club Workshop on Plant Proteins and the Mechanical Properties of Cell Walls, Alicante Spain. Abstract # 49 20
- Turk, S. C. H. J., Roos, K. d., Scotti, P. A., Dun, K. v., Weisbeek, P., 及びSmeekens, S. C. M. (1997). The vacuolar sorting domain of sporamin transports GUS, but not levansucrase, to the plant vacuole. New phytol 136:29-38. 30
- Visser, J., Voragen, A. G. J. (編集) (1996) Pectins and Pectinases Progress in Biotechnology 14, Elsevier Science, Amsterdam
- Visser, R. G. F. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tiss. Cult. Man. B5:1-9.
- Visser, R. G. F., Stolte, A. & Jacobsen, E. 1991. Expression of a chimeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants. - Plant Molecular Biology. 17:691-699. 40
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. - F., Axelos, M. A. V. & Renard, C. M. G. C. (1995) In Food Polysaccharides and Their Applications, ed. Stephen, A. M. (Marcel Dekker, Inc.) : 287-339.
- Voragen, A. G. J., Schols, H. A. 及びPilnik, W. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h. p. l. c. Food 50

- Hydrocolloids 1 (1), 1986, 65-70.
- Wee, E., Sherrier, J. D., Prime, T., 及び Dupree, P. (1998). Targeting of active sialyltransferase to the plant golgi apparatus. Plant Cell 10:1759-1768.
- Wegener, C., Bartling, S., Olsen, O., Weber, J., Wettstein, D. v. (1996) Pectate lyase in transgenic potatoes confers preactivation of defence against *Erwinia carotovora*. Physiol. Mol. Plant. Pathol. 49:359-376. 10
- Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H., 及び Paulson, J. C. (1987). Primary structure of β -galactoside α -2, 6-sialyltransferase conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the N H2-terminal signal anchor. J. Biol. Chem. 262:17735-17743.
- Yamada, H. & Kiyohara H. (1999) Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. In Immunomodulatory Agents from Plants, ed. Wagner, H., Birkhauser Verlag Basel, pp 161-202 20
- Ziegelhoffer, T., Will, J., 及び Austin-Phillips, S. (1999). Expression of bacterial cellulase genes in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) potato (*Solanum tuberosum* L.) and *Nicotiana tabacum* L.). Mol. Breed. 5:309-318.

【図面の簡単な説明】

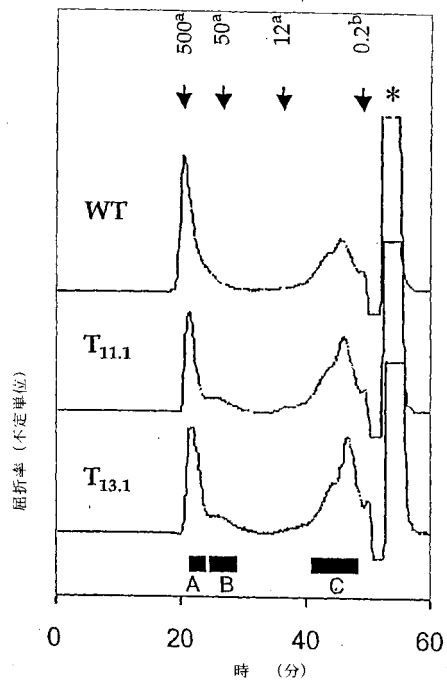
【図1】図1は、アスベルギルス・アキュリータスのエンドーガラクターナーゼを発現する 30
2つのトランスジェニックのポテト植物 $T_{11.1}$ 及び $T_{13.1}$ を野生型と識別するための予備的な主成分分析 (PCA) の使用を例示する。それは、第三及び第五主成分 (PC) スコアを用いて、 $T_{13.1}$ と野生型との比較を示している。

【図2】図2は、野生型ポテト塊茎 (WT) 及びトランスジェニックポテト植物 $T_{11.1}$ 1
1 ならびに $T_{13.1}$ の細胞壁から、それぞれ真菌性 EPG と PME の組合わせ処理によって特別に抽出されるラムノガラクトン I (RGI) のサイズ排除クロマトグラフィー分析 (屈折率によって検出) (不定単位) を示す。この EPG/PME 処理は、野生型と比較して形質転換塊茎の細胞壁からほぼ2倍のウロン酸 (UA) を放出した。野生型細胞壁から EPG/PME によって抽出される RGI は、UA 含量及び屈折率検出によって示されるように2つの主成分：画分 (分子量 > 500 kDa) 及び画分 C (分子量 40
0.2~8 kDa) を含んだ。 $T_{11.1}$ 及び $T_{13.1}$ の EPG/PME 抽出物は、画分 A をあまり含まず、実質的には画分 C が多く、さらに野生型抽出物には存在しない~120 kDa のフラグメント (画分 B) を含む、野生型とは異なるプロファイルを有する。*は、ペクチン物質が全くない試料の緩衝塩が存在することに起因する、大きなピークを示す。

【図3】図3は、モノクローナル抗体 LM5 でゴールドラベル (gold labelled) し、銀で増強し、反射共焦走査顕微鏡 (A, B) で及び透過型電子顕微鏡 (C, D) で可視化した、野生型 (A, C) 及びエンドーガラクターナーゼ発現 ($T_{13.1}$) (B, D) ポテト塊茎の切片を示す。野生型柔組織細胞壁は強く標識されている (Aの白色、Cの黒色粒子) が、 $T_{13.1}$ の塊茎では、ラベル密度は非常に減少し、原形 50

質膜に近い（Dの矢印）幾つかの細胞の角（Bの矢じり）にのみ局在している。＊は、澱粉顆粒によっていったんは占有された空間を示す。MLは、これらの角で満ちた拡張したミドルメラを示す。スケールバー：A及びB 100 mm、C及びD 2 mm。

【図 2】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
16 August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/59137 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 15/82, NL-6708 KL Wageningen (NL). BELDMAN, Gerrit A61L 27/20 [NL/NL]; Leonard Roggeveenstraat 67, NL-6708 SL Wageningen (NL).
- (21) International Application Number: PCT/DK01/00093
- (22) International Filing Date: 12 February 2001 (12.02.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00610020.0 10 February 2000 (10.02.2000) EP 09/544,988 7 April 2000 (07.04.2000) US
- (71) Applicants and
(72) Inventors: ULYSKOV, Peter [DK/DK]; Høstvej 10, DK-2920 Charlottenlund (DK). SHOLS, Henk [NL/NL]; Hazekamp 2b, NL-6707 HG Wageningen (NL). VISSER, Richard [NL/NL]; Emmalaan 17, NL-6721 ET Bennekom (NL). BORKHARDT, Bernhard [DK/DK]; Lindegårdsvej 27, DK-3520 Farum (DK). SØRENSEN, Susanne, O. [DK/DK]; Hyttelunden 1, DK-2665 Valersbæk Strand (DK). OOMEN, Ronald [NL/NL]; Koggekeade 114, NL-8017 KH Zwolle (NL). VINCKEN, Jean-Paul [NL/NL]; Willebrordweg 23, NL-6871 ZS Renkum (NL). MCCAIN, Maureen [GB/GB]; 6 Sidell Close, Cringleford, Norwich NR46XP (GB). SKJØT, Michael [DK/DK]; L.A. Rings Vænge, Baldersbrønde By, DK-2640 Hedehusene (DK). BUSH, Max [GB/GB]; 23 Ruskin Road, New Costessey, Norwich NR5 0LL (GB). VORAGEN, Chantal, Doeswijk [NL/NL]; Roghorst 283,
- (74) Agent: PLOUGMANN, VINGTOFT & PARTNERS A/S; Sankt Annæ Plads 11, P.O. Box 3007, DK-1021 Copenhagen K (DK).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/59137 A1

(54) Title: METHOD FOR REMODELLING CELL WALL POLYSACCHARIDE STRUCTURES IN PLANTS

(57) Abstract: Methods for providing transgenic plants and parts hereof that, relative to the wild type state, is modified in a complex cell wall polysaccharide structure including pectins and hemicelluloses, the modification being in the overall glycosidic linkage pattern or the monosaccharide profile, comprising transforming a plant cell with a nucleotide sequence that causes an altered production of a complex cell wall polysaccharide-modifying enzyme such as *endo*-rhamnogalacturonan hydrolase, an *endo*-rhamnogalacturonan lyase, an *endo*-galactanase, an *endo*-arabinanase, an arabinofuranosidase, a galactosidase such as a beta-galactosidase, a xylosidase and an *exo*-galacturonidase. The modification can occur *in vivo* or post harvest, in which latter case the modifying enzyme is separated in the growing plant from its substrate, e.g. by targeting the enzyme to the Golgi, the endoplasmic reticulum or a vacuole, or is in a form that is inactive in the plant. After harvest the enzyme is brought into contact with its substrate or it is activated to provide the desired post harvest modification of the cell wall polysaccharide. The transgenic plant materials have improved functionalities and are useful in food and feed manufacturing and as pharmaceutically or medically active substances.

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

1

METHOD FOR REMODELLING CELL WALL POLYSACCHARIDE STRUCTURES IN PLANTS

5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for remodelling the polysaccharide structure of the cell wall in higher plants by means of *in vivo* expression of polysaccharide-modifying enzymes.

10

TECHNICAL BACKGROUND, PRIOR ART AND DISTINGUISHING FEATURES OF THE INVENTION

- 15 The cell wall of higher plants is comprised of cellulose, an interconnecting load bearing structure of mostly hemicellulosic polymers, pectic matrix polymers and globular and non-globular proteins. With the possible exception of the globular proteins, all polymer classes play structural roles in the cell wall. As the wall matures, cross links, both inter- and intra-chain links, are formed and eventually lignin is deposited in the cell wall rendering the cell
- 20 wall quite stable and thus difficult to separate into its constituents, digest and process.

- The present invention relates to gaining control *in vivo* over the structures of the complex cell wall polysaccharides. Of the wall polymers the simple, semicrystalline cellulose microfibrils are excluded from this class, as are the various categories of polymers which are
- 25 built from non-sugar moieties, i.e. the proteins, lignin as well as suberin and waxes found in epidermal walls. Hemicelluloses and pectins *sensu lato* define the class of complex wall polysaccharides, although some of these may be referred to by a name indicating a narrower classification if particularly enriched or significant in a particular species or tissue, arabinogalactans in Larix wood and beta-glucan in cereal seeds to name a few examples.
- 30 Excluded from the class of complex cell wall polysaccharides are, in the context of the present invention, those polysaccharides that are not structural components but serve other purposes, typically that of storage of carbohydrates to be remobilised during seed germination. Galactomannan as in guar, and xyloglucan as in tamarind are two examples.

Hemicellulosic polymers differ in type and abundance in, on one hand, plants belonging to the grasses, sedges and families closely related thereto and, on the other hand, the group of vascular plants. Carpita and Gibeaut (1993) refer to the non-grass type wall as a type-I cell wall, and the grass type cell wall as a type-II cell wall. Primary walls of type-I are characterized by roughly equal amounts of cellulose, hemicellulose and pectin. The predominant hemicellulosic polymer in undifferentiated cells is xyloglucan (not to be confused with the seed storage xyloglucan referred to above).

Xyloglucan is a minor hemicellulosic polysaccharide in type-II cell walls (~5%), and also pectins are less abundant herein as compared to the type-I wall. A broad class of hemicellulosic polymers, i.e. xylans, arabinoxylans and glucans make up the remainder of the hemicellulosic polymers in the type-II wall. These hemicellulosic polymers are particularly relevant targets for the present invention when it is applied to remodel polysaccharide structures in type-II walls. For type-I cell walls, the present invention is particularly developed for the matrix polymers, i.e. pectins.

Pectins consist of two basic parts, i.e. an essentially unbranched polymer consisting of galacturonic acid residues (homogalacturonan, also known as the smooth region), and a polymer composed of alternating rhamnosyl and galacturonosyl residues, which can be substituted with long neutral side-chains (rhamnogalacturonan I, with "hairs", also known as the hairy region). Pectic polysaccharides comprise between 30 and 50% of the cell walls of dicotyledonous plants (Carpita and Gibeaut 1993). The pectic matrix of plant cell walls is a complex mixture of homogalacturonan (HGA), rhamnogalacturonan I (RG-I) and rhamnogalacturonan II (RG-II) polymers (Voragen *et al.* 1995). HGA is an unbranched chain of 1,4 linked α -D-Galacturonic acid (GalA) residues that can be differentially methyl-esterified and/or acetylated. Relatively unesterified lengths of HGA (junction zones) can become Ca^{2+} cross-linked with similar regions of other HGA molecules to form polymers and higher-order structures that are capable of forming gels, whereas highly esterified HGA has a reduced potential for calcium promoted gelling. Gelling by other mechanisms often depends on a high methyl ester content. RG-I is a branched heteropolymer of alternating 1,2- α -L-Rhamnose (Rha) and 1,4- α -D-GalA residues (Lau *et al.* 1985) that carry neutral side-chains of predominantly 1,4- β -D-Galactose (Gal) and/or 1,5- α -L-Arabinose (Ara) residues attached to the rhamnose (Rha) residues of the RG-I backbone. They can either be single unit (β -D-Galp-(1(4))), or polymeric such as arabinogalactan I and arabinan. Another type of arabinogalactan, arabinogalactan II, is

WO 01/59137

3

PCT/DK01/00093

mainly associated with proteins (arabinogalactan proteins). The branching pattern of the hairs is species-dependent. The side-chains of RG-I may be cross-linked to other pectic molecules by ester linkages through hydroxycinnamic acid residues such as ferulic acid (Fry 1986). It is generally accepted that homogalacturonan (HG) and rhamnogalacturonan I (RG-I) are covalently linked. However, the exact sequence of stretches of smooth and hairy regions remains to be determined. The highly conserved RG-II molecule has a homogalacturonan backbone decorated with side-chains containing the richest diversity of sugars and linkages known, which may dimerise through a borate di-ester cross link (O'Neill *et al.* 1996).

10

Besides determining cell wall porosity, additional roles have been proposed for pectic polymers, including regulating cell-cell adhesion, cell expansion (McCann and Roberts 1994), wall mechanical properties (Chanliaud and Gidley 1997), as a source of signalling molecules (oligosaccharins) (Côté and Hahn 1994) and involvement in cell differentiation and organogenesis (Satoh 1998).

The suitability of pectin for food applications is governed by many parameters, including its molecular weight, neutral sugar content, the proportion of smooth versus hairy regions, the degree of methyl and acetyl esterification, as well as the distribution of these ester groups along the homogalacturonan backbone (Daas *et al.* 1998, Braccini *et al.* 1999). For instance, cross-linking of homogalacturonans with Ca^{2+} is promoted when only small amounts of hairs are present, and consequently, gels with increased stability can be formed.

25 The primary structure of pectin from many abundant sources, e.g. potato tubers and sugar beets, is such that it is of an inferior quality for food applications when compared to e.g. apple or citrus pectin. In particular, the proportion of hairy regions of potato pectin is too high, and the degree of methyl esterification is too low (Ryden *et al.* 1990), the latter potentially caused by pectin methyl esterase acting post harvest. Additional problems with endogenous enzyme activities notwithstanding, adjustments in the potato pectin structure are required to obtain satisfactory gelling properties, and to compete with higher-quality pectins.

Several pectic preparations with physiological effects on human cells and tissues have been extracted from plants, and biochemical interactions with macromolecular complexes

35

WO 01/59137

4

PCT/DK01/00093

of human origin have been demonstrated (Paulsen 2000). For example, it has been shown that compounds derived from hairy regions interact with the complement system *in vitro*, and it is thus inferred that these compounds are likely to act upon the immune system (immunomodulation) (Samuelson *et al.* 1998, 1999, Yamada and Kiyohara 1999).

5 However, many pharmaceutical claims are questioned due to poor characterization of the active preparations. Hence, lack of control over pectin structure has precluded determination of precise structure-activity relationships for these biochemical/physiological activities.

The concept of treating pectin and other plant cell wall polysaccharides with enzymes, either in the production of pectin or as a means of modifying the properties of polysaccharides to suit current and new applications, is an effort which has attracted considerable attention over the last 20 years. These enzymes include in particular glucanases, xyloglucanases, cellulases, fucosidases, xylanases, *endo*-polygalacturonases (*endo*-PGs or EPGs), pectin esterases, acetyl esterases specific to the different classes of polysaccharide decorated with acetyl groups, pectin lyases, *exo*-polygalacturonases and pectate lyases. Also the new class of rhamnogalacturonases, rhamnogalacturonan lyases, the galactanases, the arabinanases and the corresponding furanosidases have attracted a certain interest. Both α - and β -specific enzymes are of interest. Using galactosidases as an example, some isoforms of α -galactosidases can mobilise galactomannan while the particular β -specific variants can depolymerise pectic galactans. Similar considerations are relevant to virtually all classes of polysaccharide modifying enzymes listed above. Many enzymes serving the purpose in nature, or selected by man for the modification of algal or microbial polysaccharides are also to be considered of interest with regard to higher plant cell wall polysaccharides due to shared motifs between polysaccharides of dissimilar composition and origin.

From the above it is clear that the polysaccharides in question, such as pectins, are extremely complex components of the cell wall, and there is a fairly good understanding of the fine structure of the individual polysaccharides. Considering the complexity of the polymers, it is not surprising that there are numerous enzymes that can be involved in their degradation, which in turn implies that a large "toolbox" is available for remodelling of these polymers.

However, the currently available concepts of modifying plant cell wall polysaccharides are predominantly based on post-harvest methods. This is the case with pectin which may be

modified using post-harvest methods in which pectin is first extracted from the source plant material and only subsequently subjected to modification in order to result in modified pectin having desired characteristics for a given application.

5 In contrast, it would be advantageous to be able to modify cell wall polysaccharides *in vivo*, e.g. with reference to pectin, by modifying the structure of pectin, e.g. the structure of the hairy regions, since this would open up a range of different possibilities which are not currently available or feasible for technical and/or economic reasons. It is thus one major objective of the present invention to gain control over complex polysaccharide structure
10 including pectin structure in living plants thereby obtaining plant materials containing remodelled cell wall polysaccharides having, relative to the parent plant, a new cell wall polysaccharide structure. As used herein, the terms "new polysaccharide structure and "new pectin structure" refer to polymers with a new arrangement and/or changed ratios of the monosaccharide building blocks of the polymer. When determining the linkage pattern
15 as described hereinbelow, the quantitatively insignificant amount of new end-groups which result from a molecular weight down-shift (as seen e.g. during ripening) is disregarded, and polymers which are altered only in size, are not regarded herein as new structures. In determining both monosaccharide profile and linkage pattern, decoration with non-sugar substituents are also disregarded so that a polysaccharide which is different solely by virtue of e.g. increased methyl esterification, is not regarded a new structure. Accordingly, the present invention provides, in contrast to current technology, for *in vivo* generation of new complex cell wall polysaccharide structures as defined above.

In the following (and in the Examples below), the possibilities for modifying complex plant
25 cell wall polysaccharide structures *in vivo* will be illustrated with reference to pectin structure using potato as an example. The invention is in no way limited to pectin or potato but it is useful in modifying a large range of cell wall polysaccharides and it is relevant to many crop species, and many plant organs in addition to tubers, but potato is an important crop in many countries, not only because it is consumed as such (boiled, baked, etc.)
30 or after processing (French fries, chips, purees), but also because it produces a high-quality starch which can be used in many industrial applications. After extracting the starch from the potato tubers, substantial amounts of by-products (like fibre and proteins) remain, which have mainly found application in animal feed. However, these by-products contain constituents which have the potential of generating much higher value-products.
35 The potato fibre fraction is a collection of various polysaccharides which together form the

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

6

packaging material of the cell contents, i.e. the plant cell wall. Of these, pectin is probably the most interesting polymer because it is a known gelling agent in many food applications (Visser and Voragen 1996, Daas *et al.* 1998).

- 5 In accordance with the invention, particular focus is on the hairy regions of pectin rather than on, for instance, decoration of the homogalacturonan with ester groups. The amount of hairy regions determines the neutral sugar to uronic acid ratio. When this ratio is high, the water-binding capacity of the pectin is also high. This may be desirable in some food applications as well as non-food applications. When this ratio is low, the pectin structure
- 10 approaches that of citrus pectins normally preferred by the food industry. Hence, lowering the neutral sugar-to-uronic acid ratio is important for the valorisation of pulp by-products from e.g. potato starch and beet sugar production.

- Accordingly, another important objective of the present invention is to decrease the proportion of hairy regions of pectins *in planta* by genetic modification. In addition to an improvement of the gelling characteristics of potato pectin, this should also facilitate the starch extraction process, resulting in a higher starch yield.

- Another objective is to tailor and recover pectin hairy regions for their use in low viscosity food products (e.g. drinking yoghurt and similar dairy products). The particular embodiments of the invention referred to as "self-processing" tubers (or self-processing plant material in general) provides additional technology to meet this demand. "Self processing" refers to the property that the plant tissue, upon disruption post harvest, releases enzymes stored intracellularly. The released enzyme catalyses a modification of the cell wall
- 25 material, typically excision of the poly- or oligosaccharides of interest for easy recovery. This technology can also be applied to medical uses of tailored pectic polymers and oligomers derived from these.

- In contradistinction to post-harvest modification of pectic polymer structure which makes use of degrading enzymes, *in vivo* modification can also make use of genes encoding biosynthetic enzymes or components of synthase complexes. It will be appreciated that up- or down-regulation of the activity of the synthases or decorative enzymes will broaden the engineering options. A few decorative transferases have been identified and may turn out to be valuable in this regard (Perrin *et al.* 1999, Edwards *et al.* 1999, WO 99/60103).
- 35 Such enzymes are candidates for pectin modification according to the present invention.

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

7

Some enzymes involved in the interconversions of nucleotide sugars are known, and based on characterized mutants (see below) it is contemplated that genes encoding these enzymes may be useful for indirect manipulation of biosynthesis of pectin and other cell wall polysaccharides. However, presently the genes encoding polysaccharide-modifying enzymes already demonstrated to be useful for post-harvest pectin modification are among preferred tools for modifying pectin *in vivo*.

Several mutant *Arabidopsis* displaying a modified cell wall phenotype have been isolated. Some of these are affected at the level of nucleotide sugar pools. Only one of the existing range of cell-wall mutants, *mur 8*, is likely to be a specific pectin mutant, as it is deficient in rhamnose (Reiter *et al.* 1997), while *mur 1* (deficient in fucose), and *mur 4* (reduced in arabinose) (Mayer 1998) are likely to be affected in pectins among other cell wall polysaccharides. However, such mutants have been generated in a random fashion, which is manageable in *Arabidopsis* but not in crop plants in which cell wall polysaccharide modification is relevant.

WO 91/08299 discloses a process for the inhibition of the production of a gene product in a plant cell using antisense technology with the objective of controlling fruit ripening. Target genes include pectin esterases, galactosidases, glucanases and xylanases. Accordingly, this disclosure is not concerned with *in vivo* generation of new complex cell wall polysaccharides as provided herein.

WO 99/07857 discloses nucleic acids encoding pectate lyase from plants and transgenic plants and parts and progeny hereof having altered pectate lyase activity. Although it is evident that increased pectate lyase activity in a plant may lead to altered pectins, this alteration is only in the sense that molecular weight changes of the pectic polymers may occur which, however, does not lead to a new pectin structure as defined herein.

WO 93/13212 discloses DNA encoding a pectin esterase iso-enzyme for transformation of e.g. tomato to reduce pectin esterase activity.

A poster entitled "Modification of pectin by expression of a fungal endo-beta-1,4-galactanase in potato" presented by Sørensen *et al.* (1999) suggests that it might be desirable to modify the hairy regions of potato pectin by reducing the amount of linear galactans attached to rhamnose residues of RG-I, and that it is expected that these galactans can be

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

8

degraded by a fungal *endo*-galactanase from *Aspergillus aculeatus*. The poster reports that transgenic plants expressing the galactanase gene in leaves and tuber under control of the Granule Bound Starch Synthase (GBSS) promoter or the patatin promoter were produced, but possible effects of the galactanase expression on the cell wall polysaccharides was not addressed neither theoretically nor by experiment.

Thus, the prior art suggests that is possible to control ripening processes in the plant cell wall, and that these manipulations can change molecular weight distribution of polymers and decorations with substitutions such as methyl esterification. It is not surprising that this gaining control over ripening is possible in as much as ripening is a natural process in plants which is already subject to regulation with regard to the speed with which it progresses. In the present context, however, such changes are not regarded as being accompanied by new cell wall polysaccharide structures.

Some workers have proposed rather unspecified downstream effects of gene expression on cell wall properties, but no specific technology has been developed. Knowing that plants actively and in a carefully regulated manner metabolise their cell walls during development, it is very surprising that it can be tolerated by the plant to re-engineer the cell wall beyond merely accelerating or slowing down the natural progression of wall metabolism. However, a clear distinction must be made between the rate changes of wall metabolism which are associated with delay of ripening as demonstrated in the prior art where polymer esterification and molecular weight changes predominate while polymer composition largely stays the same, and the achievement of the present invention which provides a novel technology for a targeted tailoring of complex cell wall polysaccharides, affording a highly predictable change in the monosaccharide profile and/or the overall linkage pattern as determined e.g. by methylation analysis.

Accordingly, the present invention relates to novel technology for targeted, specific re-modelling or modification of complex plant cell wall polysaccharides. Generally, benefits from this technology fall in four broad categories:

1. Improving agronomic properties of crop plants

Modified plant architecture. Certain selective interferences with the course of cell wall metabolism will affect cell differentiation, morphology and development. Self-pruning

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

9

plants for example may be engineered by modifying cell wall components which are critical for determining cell fate and course of development.

Fertility. Where cell separation is a critical developmental process as in seed dispersal (WO 97/13865), pollen dispersal and growth of the pollen tubes along the style middle lamellae, the course of development may be altered through cell wall modifications.

Pathogen invasion. Pathogenic fungi and bacteria invade plant tissues through the orchestrated deployment of a set of polysaccharide degrading enzymes which match the architecture of the host cell wall. The present technology provides the means for altering the cell wall so as to retard the penetration. As signalling molecules, the so-called oligosaccharins, are released from the wall during pathogen invasion, a new cell wall architecture may result in a different pattern of oligosaccharin release from the wall, and hence alter the course of pathogenesis. Reduced symptom development will be achieved.

15

2. Improving plant products

Dietary fibre. Wall modifications may be used to increase the abundance of dietary fibre in food products, and alter the ratio between insoluble and soluble dietary fibres, most often in favour of the latter with which many health claims are associated.

Texture. Cell walls are responsible for vegetable and fruit texture, and plays a role in the textural changes which accompany storage. Both texture and shelf life will thus be subject to modification using the current invention. As it pertains to shelf life the technology presented here complements control of ripening (speed up or delay) by transgenic modification as described in the prior art.

Material properties. Structural properties of wood and fibres rely on overall plant anatomy, fibre cell geometry, secondary wall formation, lignification and polysaccharide polymer make up. Plant material properties originating in the latter may be improved through the targeted cell wall engineering made possible by the present invention. Properties of relevance for medical materials, hydrocolloids for coating of implants and some medical instruments, include water binding capacity. Water binding capacity can be controlled through modifications of e.g. pectin structure as enabled by the present invention (see also "Tailored pectins" heading 4 below).

35

Added value to by-products. Where pulp from paper or fibre manufacturing, from breweries, from production of starch or sugar represents a rich source of complex plant polysaccharides which do not fulfill criteria for a particular industrial use, the present invention may be employed for the engineering of the crop plant in question so as to valorise the pulp by making it a source of higher value-polysaccharides. One example hereof is targeting the valorisation at the pectic fraction as exemplified in the following.

Functional feed cell wall composition largely determines digestibility and hence nitrogen use efficiency in livestock and poultry. Notably in non-ruminant animals, young piglets for example and in poultry the cell wall polysaccharide digestibility is a limiting factor in respect of efficient feed utilisation. Application of the novel technology presented herein can lead to feed products with superior digestibility, and hence improved growth rates in the animals. In ruminant animals increased digestibility of polysaccharides and cell wall components will affect the protein degradation in the rumen, because the microorganisms in the rumen will utilise the released saccharides instead of protein and in this way less protein is degraded in the rumen and less ammonia is produced and in this way increased digestibility of the polysaccharides and cell wall components will save proteins from degradation in the rumen whereby more protein components is taken up in the intestines. In this way improved digestibility of the cell wall components and polysaccharides will increase the utilisation of protein and decrease the excretion of ammonia or nitrogen from rumen degraded protein.

3. Improving processing characteristics

Beverage filtering properties. Liquefaction of plant materials is applied in juice and wine manufacturing, e.g. using food industrial enzymes so as to increase yield and retard clotting of filters. The present invention is useful with respect to complement or supplant these practices and to decrease/remove certain polysaccharide fractions that cause problems during such processes.

Malting properties. During malting, starch is degraded whereas the beta-glucan of the specialised cell wall of the caryopsis is only solubilised and may cause problems with regard to beer clarity. While most biotechnological approaches to this problem has been directed at engineering the yeast to be able to fully digest the beta-glucan, the present invention can be employed to improve the processing characteristics of the beta-glucan

component of the cell walls and in general to improve the processing during malting and also to improve the end products.

Baking properties. Rheological properties of doughs are often modified using technical enzymes rich in xylanase and glucanase activities acting upon the cell wall polysaccharides. Starting materials in which the cell wall polysaccharides have already been modified as desired using the present invention, will be able to complement or supplant the practice of adding technical enzymes and in addition, other modifications of the polysaccharides and cell wall components will improve the properties of the dough and improve the baking properties.

Fibre retting. Fibres, e.g. of flax, are isolated either using treatment with industrial enzymes or through a classical "fermentation" process known as retting. Either may be supplemented or complemented using fibre plants in which the fibres themselves, or the tissue in which they are embedded, are modified with regard to cell wall properties as enabled by the present invention. In addition, improvement (including the processing) of other plant fibres (cotton, hemp etc.) employed as textiles can also be achieved using the technology of the invention.

4. Isolated polysaccharides.

Tailored pectins as food ingredients and additives. Designed pectin, e.g. from plant materials normally containing pectins of inferior quality as described above can be obtained using the present invention. Generally, benefits from such technology may include maintenance of the physiological activity of pectin at low viscosity, uniformity of ester distribution, production of high molecular weight pectin with low viscosity, elimination of acid from waste water and manufacture of low ester pectin with no loss in molecular weight. Other benefits include simpler processing, high yield, high strength, utilisation of inexpensive raw materials, moderate process conditions, ease of recovery, low cost, low environmental impact of processing and higher quality. In addition, the present technology will also make use of non-refined (e.g. produced without most of the traditional extraction procedures) products possible as the technology makes it possible to remove undesired polysaccharide and cell wall components involved in e.g. the creation of non-palatable appearance and to improve the quality of "ingredients" of low quality components.

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

12

Tailored pectins as medical materials and pharmaceuticals. Bioactive poly- and oligosaccharides derived from cell wall polysaccharides including pectins have been detected in several plant species, many of which are exotic plants. The present invention will provide significant control over cell wall polysaccharide polymer structure, and allow poly- and oligosaccharides of e.g. crop plants to be designed and thus rendered bioactive. Benefits include high efficiency and low cost in processing using well known processing steps at e.g. sugar factories, starch factories, breweries etc., optimised for one or more particular crop plants.

10

SUMMARY OF THE INVENTION

In a first aspect the invention pertains to a method for providing a transgenic plant material that, relative to the wild type state, is modified in a complex cell wall polysaccharide structure, the modification being at least one of the overall glycosidic linkage pattern and the monosaccharide profile, the method comprising the steps of: (i) providing a nucleic acid construct comprising a nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell, results in an altered production of at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, (ii) transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and (iii) deriving from said transformed plant cell a plant cell culture, a plant tissue or a transgenic plant in which the production of the at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is altered to obtain transgenic plant cells, plant tissues or plants in which the targeted substrate cell wall polysaccharide, relative to the wild type plant, is modified to have a monosaccharide profile where the proportion of at least one monosaccharide is changed by at least 10% or the proportion of at least one glycosidic linkage is changed by at least 10%.

In one embodiment hereof the nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell, results in an altered production of at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme is a sequence coding for such an enzyme, such as a cell wall polysaccharide-modifying enzyme of fungal or microbial origin, that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide including an embodiment wherein the coding sequence is operably linked to a promoter directing the expression of the coding sequence which promoter e.g. is of plant origin such as a plant tissue or organ specific promoter including a storage organ specific promoter. In this context, an interesting pro-

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

13

motor is a promoter that is capable of directing expression of the cell wall polysaccharide-modifying enzyme in potato tubers including a promoter selected from the group consisting of the granule bound starch synthase (GBSS) promoter and the B33 promoter.

- 5 In a further embodiment the at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, the production of which is altered, is an endogenous enzyme, i.e. an enzyme naturally produced in the transformed plant cell, including a particular embodiment wherein the nucleotide sequence, which, following the introduction of the nucleic acid construct into a plant cell results in an altered production of at least one target cell wall polysaccharide-
- 10 modifying enzyme, is a sequence that modulates the expression of an endogenous sequence coding for an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide. As one example of such an embodiment, the sequence that modulates the expression of an endogenous sequence coding for an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide, is a sequence coding for an antisense sequence
- 15 that reduces the expression of a repressor or reduces the production of an inhibitor of the endogenous target cell wall polysaccharide-modifying enzyme. In another example, the sequence that modulates the expression of an endogenous sequence coding for an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide, is a sequence that, following a recombination event, causes the insertion of a new or modified promoter
- 20 operably linked to the endogenous target cell wall-modifying enzyme, said promoter is capable of directing the expression of the coding sequence for the cell wall-modifying enzyme.

In another embodiment of the above method, the nucleotide sequence, which, following

25 the introduction of the construct into a plant cell results in an altered production of at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, is a sequence that, following a recombination event, causes the expression of an endogenous sequence coding for an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide to be targeted to a location in the plant cell where such enzyme is not normally present.

30

In useful embodiments of the above method, the nucleic acid construct is a viral vector that, following introduction into a plant cell, is not integrated into the genome of the cell.

In specific embodiments of the above method the targeted complex cell wall polysaccharide which is modified by a cell wall polysaccharide-modifying enzyme is a pectin or a

35

hemicellulosic polysaccharide. Suitable pectin- or hemicellulose-modifying enzymes include *endo*-rhamnogalacturonan hydrolases, *endo*-rhamnogalacturonan lyases, *endo*-galactanases, *endo*-arabinanases, arabinofuranosidases, galactosidases such as beta-galactosidases, xylosidases and *exo*-galacturonases and orthologs or isoforms hereof.

5

In a still further embodiment of the above method the nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell, results in an altered production of at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, is sufficiently different from endogenous genes of the host plant so that co-suppression will not occur.

10

In yet another embodiment of the above method, an auxiliary enzyme, including as examples a methyl esterase, an acetyl esterase or a glycosidase that removes single monosaccharides from polymers, such as e.g. an arabinofuranosidase, a galactosidase, a xylosidase or a fucosidase, is co-expressed with the target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, wherein co-expression facilitates access of the polysaccharide-modifying enzyme to its substrate.

In a further aspect the present invention relates to a method for modifying the biosynthesis in a plant cell of at least one complex cell wall polysaccharide to obtain a transgenic plant material that, relative to the wild type state, is modified in a complex cell wall polysaccharide structure, the modification being at least one of the overall glycosidic linkage pattern and the monosaccharide profile. This method comprises the following steps: (i) providing a nucleic acid construct comprising a nucleotide sequence, the expression of which in a plant cell results in that at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to a compartment in the plant cell where it is not normally present or in that the expression of a polypeptide naturally produced in the plant cell and affecting the biosynthesis of a cell wall polysaccharide is changed, (ii) transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and (iii) deriving from said transformed plant cell a plant cell culture, a plant tissue or a transgenic plant in which the at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme, relative to the wild type plant, occurs in a different compartment.

The above method includes an embodiment wherein the obtained transgenic plant cells, plant tissues or plants in which the targeted substrate cell wall polysaccharide, relative to the wild type plant, is modified to have a monosaccharide profile where the proportion of

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

15

at least one monosaccharide is changed by at least 10% or the proportion of at least one glycosidic linkage is changed by at least 10%.

In further specific embodiment of the above method the at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to the Golgi apparatus including membrane vesicles fusing with or budding off from the Golgi stacks including an embodiment wherein the nucleotide sequence, the expression of which in a plant cell results in that at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to the Golgi apparatus, is a sequence coding for a chimeric gene product comprising the at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme and a sequence capable of targeting the chimeric gene product to the Golgi. Such a targeting sequence is e.g. a type II membrane anchored Golgi protein, e.g. a sialyl transferase, a N-acetylglucosaminyl-transferase, a fucosyl transferase, a xylosyl transferase or a galactosyl transferase including a fragment thereof, or a soluble Golgi targeted protein such as e.g. *Pisum sativum* reversibly glycosylatable polypeptide (RGP1) or a fragment thereof.

In another specific embodiment of the above method for modifying the biosynthesis of cell wall polysaccharides the nucleotide sequence, the expression of which in a plant cell results in that at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to a compartment in the plant cell where it is not normally present, is operably linked to a promoter in the genome of the plant cell into which it is introduced.

In another aspect the present invention pertains to a method for providing a transgenic plant comprising parts in which at least one complex cell wall polysaccharide, such as pectin or a hemicellulosic polysaccharide, can be enzymatically processed after harvest by an enzyme present in the plant material itself, i.e. a "self-processing" plant, the method comprising: (i) providing a nucleic acid construct comprising a nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell, causes a cell wall polysaccharide-modifying enzyme to be expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment of the plant cell or the expression of a cell wall polysaccharide-modifying enzyme in a form that is inactive under *in vivo* conditions but can be activated following harvest of plant material derived from the plant cell, (ii) transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and (iii) deriving from said transformed plant cell a transgenic plant material in which, under appropriate post harvest conditions, the at least one complex cell wall polysaccharide can be enzymatically processed after harvest by bringing the at least one

complex cell wall polysaccharide into contact with the cell wall polysaccharide-modifying enzyme that is expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment or by subjecting the harvested plant material to conditions under which the enzyme being expressed in an *in vivo* inactive form is activated.

5

In one specific embodiment hereof, the nucleotide sequence, which, following the introduction of the nucleic acid construct into a plant cell, causes a cell wall polysaccharide-modifying enzyme to be expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment is a sequence that causes the cell wall polysaccharide-modifying enzyme to be targeted during
10 growth of the plant to a cell compartment selected from the group consisting of a vacuole, the endoplasmic reticulum, the cytoplasm and a plastid, including embodiments wherein the cell wall polysaccharide-modifying enzyme caused to be expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment is encoded by a sequence comprised in the nucleic acid construct that is introduced into the plant cell or by an endogenous sequence present in
15 the genome of the cell into which the nucleic acid construct is introduced.

In useful embodiments of the above method for providing post harvest self-processing plants, the cell wall polysaccharide-modifying enzyme is selected from the group consisting of an *endo*-polygalacturonase, an *endo*-pectin lyase, a pectate lyase, a rhamnogalacturonan hydrolase, a rhamnogalacturonan lyase, an *endo*-glucanase, an *endo*-xylanase
20 and an isoform or ortholog hereof. In useful embodiments, the expression of such enzymes is directed by a plant promoter.

In specific embodiments of the above method where the cell wall polysaccharide being
25 processed after harvest is pectin, the processing of pectin is in the regions between rhamnogalacturonan and homogalacturonan regions.

In the method of providing post harvest "self processing" plants, one useful embodiment is one wherein the plant cell is further transformed with a nucleic acid sequence causing an
30 enzyme that is capable of *in vivo* modifying the structure of at least one complex cell wall polysaccharide, including a cell wall polysaccharide that can be enzymatically processed after harvest by an enzyme present in the plant material itself, to be expressed. Such a nucleic acid sequence is e.g. a sequence coding for a cell wall polysaccharide-modifying enzyme, or a sequence coding for a product that affects the expression of an endogenous

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

17

sequence coding for a cell wall polysaccharide-modifying enzyme. In useful embodiments, the cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to the apoplast.

Useful enzymes that are capable of *in vivo* modifying the structure of at least one complex cell wall polysaccharide include *endo*-rhamnogalacturonan hydrolases, *endo*-rhamnogalacturonan lyases, *endo*-galactanases, *endo*-arabinanases, arabinofuranosidases, galactosidases such as beta-galactosidases, xylosidases and *exo*-galacturonases and orthologs or isoforms hereof.

- 10 In a still further aspect the invention relates to a method of providing a plant cell wall polysaccharide material having, relative to the wild type state, a modified structure and composition, the method comprising the steps of: (i) providing transgenic plants, e.g. potato plants, using the above method of providing post harvest "self-processing" plants, (ii) cultivating and harvesting said plants and isolating herefrom parts in which at least one
- 15 complex cell wall polysaccharide, such as e.g. pectin, can be enzymatically processed after harvest by an enzyme present in the plant material itself, (iii) subjecting said parts to conditions where the cell wall polysaccharide-modifying enzyme expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment is brought into contact with its cell wall polysaccharide substrate or the cell wall polysaccharide-modifying enzyme expressed in a form that is
- 20 inactive under *in vivo* conditions becomes activated to obtain a modified cell wall polysaccharide, and (iv) isolating the modified cell wall polysaccharide material.

In useful embodiments of this method the modified cell wall polysaccharide in the material as obtained is modified to have a monosaccharide profile where the proportion of at least

25 one monosaccharide is changed by at least 10% or the proportion of at least one glycosidic linkage is changed by at least 10%.

In a further aspect the invention provides a plant cell wall polysaccharide material having, relative to the wild type state, a modified structure and composition, which material is ob-

30 tained by the above method.

There is also provided a transgenic plant or progeny of the plant or part thereof obtained by the method according to the first aspect of the invention for providing a transgenic plant material that, relative to the wild type state, is modified in a complex cell wall polysaccha-

35 ride structure and plant cell wall polysaccharide-containing materials obtained from such

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

18

transgenic plants or progeny or parts including such transgenic plant materials which, relative to a material containing the corresponding wild type cell wall polysaccharide, has at least one altered functional characteristic such as an altered pharmaceutical activity, water binding capacity, processibility, gelling property, thickening property and digestibility.

In yet other aspects the invention pertains to the use of the above transgenic plants or progeny of the plants or parts thereof or plant cell wall polysaccharide-containing material in the manufacturing of food products, food additive products, feed products, pharmaceutical or medical products and cosmetic products and pharmaceutical or medical products comprising the above plant cell wall polysaccharide-containing material, including as examples pharmaceutical compositions, implant materials, medical devices and surgical adhesives.

There is also provided a transgenic plant or progeny of the plant or part thereof obtained by the above method for modifying the biosynthesis in a plant cell of at least one complex cell wall polysaccharide and plant cell wall polysaccharide-containing materials obtained from such transgenic plants or progeny or parts including such transgenic plant materials which, relative to a material containing the corresponding wild type cell wall polysaccharide, has at least one altered functional characteristic such as an altered pharmaceutical activity, water binding capacity, processibility, gelling property, thickening property and digestibility.

In yet other aspects the invention pertains to the use of the above transgenic plants or progeny of the plants or parts thereof or plant cell wall polysaccharide-containing material in the manufacturing of food products, food additive products, feed products, pharmaceutical or medical products and cosmetic products and pharmaceutical or medical products comprising the above plant cell wall polysaccharide-containing material, including as examples pharmaceutical compositions, implant materials, medical devices and surgical adhesives.

In a still further aspect there is provided a method of producing a material comprising a complex plant cell wall polysaccharide having, relative to the corresponding cell wall polysaccharide in the wild type state, a modified structure and/or a modified composition, the method comprising the steps of: (i) providing a cultivatable transgenic plant, such as e.g.

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

19

a potato plant, using the method according to the first aspect of the invention or the above method for modifying the biosynthesis in a plant cell of at least one complex cell wall polysaccharide, or a cultivatable progeny hereof, (ii) cultivating said transgenic plant or progeny under appropriate plant cultivation conditions to obtain a plant material comprising at least one complex cell wall polysaccharide having a modified structure and/or modified composition, and (iii) isolating from the cultivated plants the material comprising the modified cell wall polysaccharide. In useful embodiments of this method the material isolated from the cultivated plants comprises a cell wall polysaccharide that, relative to the wild type plant, is modified to have a monosaccharide profile where the proportion of at least one monosaccharide is changed by at least 10% or the proportion of at least one glycosidic linkage is changed by at least 10%.

DETAILED DISCLOSURE OF THE INVENTION

15

Throughout the following description and in the appended claims several general and specific terms and expressions will be used to define the invention. Below such terms and expressions will be defined and explained:

20 The terms "new polysaccharide structure" and "new pectin structure" designate polymers with a new glycosidic linkage arrangement and/or changed ratios of the monosaccharide building blocks of the polymer, i.e. a changed monosaccharide profile. When determining the linkage pattern, the quantitatively insignificant amounts of new end-groups which result from a molecular weight down-shift (as seen e.g. during ripening) is disregarded, and

25 polymers which are altered only in size, are not regarded as new structures. For both monosaccharide profile and linkage pattern determination, decoration with non-sugar substituents are also disregarded so that a polysaccharide which is different solely by virtue of e.g. increased methyl esterification, is not regarded as a new structure. Monosaccharide profile of a polysaccharide, or polysaccharide mixture, is determined by

30 gas-chromatography of e.g. aditol acetate derivatives of polysaccharide hydrolysates, or by HPAEC with or without separate colourimetric determination of uronic acids. Linkage analysis is usually performed by removal of non-sugar decorations of the poly- or oligosaccharides followed by thoroughly methylating all free hydroxyl groups prior to hydrolysis and derivatisation for gas chromatography. Both for determination of monosaccharide

35 profile and linkage pattern a less than complete starch removal may skew the results, and

the experimenter is required to assess this non-random source of variation. Monosaccharide profile is a property with both quantitative and qualitative components to it, while linkage pattern is a largely qualitative trait. In particular, quantitative traits are subject to biological variation. The present invention allows for the introduction of new structures as defined herein in complex cell wall polysaccharides, and these are recognised by comparison with a wild type control (defined below). A transformant is recognised as being different from the wild type state if the monosaccharide profile differs in one monosaccharide by at least 10 mol% including at least 15 mol%, at least 20 mol% or at least 25 mol%, or if it differs, relative to the wild type plant, in linkage pattern analysis by at least 10 mol% including at least 15 mol%, at least 20 mol% or at least 25 mol% in at least one residue. Simultaneous changes in both monosaccharide profile and linkage pattern are not required but may occur. Some conceivable modifications regard arrangement alone and is manifested solely in a novel linkage pattern while others are purely compositional modifications in which only the monosaccharide profile is changed.

15 The term "transgenic" or "transformed" plant refers to a plant which by the process of genetic transformation is made to contain nucleic acid sequences, including DNA-methylation patterns, which are not normally present in the plant, or nucleic acid sequences which are in addition to the sequences which are normally present in the plant, or DNA sequences which are normally present in the plant but which are altered compared to the native sequence. In the present context, alterations also include changes in their DNA-methylation pattern or changes in placement in the genome.

25 The term "wild type" refers to a plant which is neither stably transformed nor manipulated to transiently express extraneous genetic material. Wild type plants are used to gauge biological variation and thus by comparison allow for identification of manipulated plants which display a genuinely new phenotype. Wild type control plants should be of the same cultivar as the modified plant under investigation and should be grown under essentially identical conditions to serve as a proper control in the context of the present invention.

30 Organs and tissues for control analysis shall be sampled from experimental and control plants at similar developmental stages.

The term "nucleic acid" refer to any nucleic acid substance including DNA, RNA, LNA (locked nucleic acids), PNA, RNA, dsRNA, RNA-DNA-hybrids that is capable of changing the maintenance or inheritance of the genetic material and/or the DNA-methylation

35

pattern in the plant. Also included are nucleic acids comprising non-naturally occurring nucleosides.

The term "nucleic acid construct" refers to a genetic sequence used to transform plant cells to generate progeny transgenic plants. A nucleic acid construct comprises at least a coding region for a desired gene product, operably linked to the 5' and 3' regulatory sequences for the expression in plants. Such constructs may be chimeric, i.e. consisting of a mixture of sequences from different sources, or non-chimeric. The orientation of the coding region may be either of a sense or antisense orientation, depending on the intended function of the gene product in question.

Transformation by homologous recombination has recently been proved possible in higher plants (Kempin *et al.* 1997). It is reasonable to expect this to change and pave a way for preparing transgenic plants according to the above definition. Accordingly, the definition of "nucleic construct" is to be understood as encompassing these new technologies. Particular technical approaches to implementing the present invention using homologous recombination include, but is not limited to: Recruitment of endogenous cell wall polysaccharide-modifying enzymes by replacement of the promoter sequence or by knock-out of a repressor. This may be generally acceptable to the plant, or at least acceptable where the gene in question exists in more than one isoform. Following the same rationale, subcellular targeting of an endogenous gene product can be changed by replacement of its signal sequence. Finally, heterologous genes *in toto* or their coding regions can be introduced in the plant genome through replacement of an endogenous gene.

Also, the use of e.g. plant viruses for carrying foreign genetic material into plants and thus modify gene expression in infected cells is feasible, and may indeed be an attractive route for genetic modification of plants without producing stably transformed plants. Mature plants can be infected shortly before harvest and modified tissue recovered as soon as the desired phenotype has developed. When direct utilisation of transformed cells are referred to herein, it is these transiently modified cells that are alluded to.

The term "antisense" refers to the sequence of a DNA strand that is complementary to the sequence of the sense strand and that cannot be translated into the polypeptide encoded by the structural gene. For purposes of the present invention, antisense refers to a nucleic

WO 01/59137

22

PCT/DK01/00093

acid construct that is operably linked to a promoter with all or part of the sequence in reverse orientation so that following transcription into an RNA molecule, hybridisation can occur between sense and antisense sequences thereby leading to a reduced level of the polypeptide in question. The term "sense" as used herein refers to the sequence of the

5 DNA strand of a structural gene that is transcribed into an mRNA molecule copy which is then translated into the polypeptide encoded by the structural gene.

The term "operably linked" means that the regulatory sequences which are necessary for the expression of the coding sequence are placed in the nucleic acid molecule in the appropriate position relative to the coding sequence so as to effect the expression of the coding sequence. Alternatively, the coding sequence can be operably linked to regulatory sequences in the genome of the cell which is transformed with the coding sequence. The term "promoter" as used herein refers to a DNA sequence which causes, or is needed for transcription of DNA into an RNA molecule. The promoter may be a tissue specific or

15 organ specific promoter, a promoter which is active at specific developmental stages or it may be an inducible promoter, e.g. one of the inducible promoters discussed below or another inducible promoter known in the art, or a constitutive promoter such as the cauliflower mosaic virus 35S promoter or another constitutive promoter known in the art.

20 The term "vector" means a nucleic acid molecule that is capable of replicating in a cell (or capable of being multiplied in vitro, e.g. by PCR methods) and to which another nucleic acid sequence can be operably linked so as to bring about replication of the attached nucleic acid sequence. Commonly used vectors are discussed below and include bacterial plasmids and bacteriophages.

25 The nucleic acid constructs as defined above can be incorporated into plant cells using conventional recombinant nucleic acid technologies. Generally, such techniques involve inserting nucleic acid in an expression vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein coding sequence and one or more

30 marker sequences to facilitate selection of transformed cells or plants. Once the nucleic acid construct has been cloned into an expression vector, it may be introduced into the plant cell using conventional transformation procedures known by a person skilled in the art. These include, but are not limited to, use of *Agrobacterium* vectors such as *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*, PEG treatment of protoplast, biolistic DNA delivery, bombardment with gold particles coated with the nucleic acid construct, electroporation of proto-

35

plast or direct nucleic acid uptake as generally described in Plant Tissue Culture Manual (Lindsey, 1992, Kluwer Academic Pubs., Dordrecht). It will be apparent to persons skilled in the art that suitable methods of transformation in any given case depend upon the plant to be transformed. As used herein, the term "transformation" refers to the event of introduction of a nucleic acid into a plant cell irrespective of whether or not subsequent incorporation of the nucleic acid into the genome of the transformed cell occurs.

The term "plant cell" is meant to encompass any cell derived from the plant, including undifferentiated tissues such as callus and suspension cultures, as well as plant seed, pollen or plant embryos. Plant tissues suitable for transformation include leaf tissue, root tissue, meristems, protoplasts, hypocotyls, cotyledons, scutellum, shoot apex, root, immature embryo, callus, somatic embryos, embryogenic structures, pollen and anther.

The term "targeted", when related to methods for *in vivo* cell wall polysaccharide remodeling or modification, is meant to distinguish the present invention from mutation approaches which are inherently random in nature, and also distinguish it from transgenic approaches in which polysaccharide precursor pools are altered. The latter approach allows for concurrently changing the monosaccharide profile of all polymers using the affected building block, while the present invention is targeted in the sense that particular cell wall polymers can be modified specifically. In addition, the term "targeted" indicates that side effects on the composition of the targeted polysaccharide, e.g. reducing the amount of fibrillar cellulose or lignin of the wall, are regarded as random modifications. The remainder of the wall following a reduction in any major component will often lead to simple replenishment with other wall building blocks.

25

The term "complex cell wall polysaccharide" refers to the classes of polymers from vascular plants to which the present invention pertains. Intracellular complex polysaccharides, starch and fructans, are not included. Neither are specialised seed storage polysaccharides exemplified by mannans, galactomannan and storage xyloglucan deposited in secondary walls of seeds. The simple, crystalline fibrils of cellulose does not qualify as "complex" in the present context. Covered by the definition are for example the broad classes of hemicellulose and pectin as defined below.

30

The term "hemicellulose" or "hemicellulosic polysaccharide" refers to structural xyloglucan (as opposed to storage xyloglucan), xylans, arabinoxylans and various non-cellulosic beta-glucans.

- 5 The term "pectin" or "pectic polysaccharide" refers to the group of polysaccharides described above and commonly known as pectins, i.e. polysaccharide materials found in plant cell walls in the form of a mixture of homogalacturonan, xylogalacturonan, rhamnogalacturonan and arabinogalactan polymers.
- 10 The term "smooth region" refers to the primarily straight chained, unbranched regions of pectin comprising homogalacturonan, which contain galacturonic acid units which may be esterified to varying degrees, typically with O-acetyl and O-methyl groups. The smooth regions may further contain stretches of xylogalacturonan and rhamnogalacturonan II.
- 15 The term "hairy region" refers to the branched chain regions of pectin comprising rhamnogalacturonan I, whose backbone is made up of GalA and Rha and its various side chains containing arabinose and galactose as the major constituents.

The term "polysaccharide-modifying enzyme" refers to any enzyme which is capable of

20 modifying the structure of complex cell wall polysaccharides or any part thereof. A polysaccharide structure is regarded new if it displays a new structure as defined above. In as much as non-sugar decorations are disregarded in the definition of new polysaccharides, enzymes responsible for transfer of these moieties are not considered polysaccharide

25 modifying enzymes (see also the definition of "auxiliary enzyme" below). Glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the polysaccharide back-bones are not considered herein as a polysaccharide-modifying enzyme either. Manipulating the expression of the synthases may indeed cause major changes to the polysaccharide structures, but, compared to the present invention, this is regarded as a fundamentally different approach to obtaining new polysaccharides, a technique that does not rely on modifications. Yet to be

30 identified genes with roles in single sugar residue decorations of the polysaccharides may be of relevance to the present invention (see definition of "decorative enzymes" below). Polysaccharide modifying enzymes generally belong to the category of enzymes involved in the degradation or turn-over of polysaccharides. Non-limiting examples of these enzymes include *endo*-rhamnogalacturonan hydrolases, *endo*-rhamnogalacturonan lyases,

35 *endo*-polygalacturonases, *endo*-pectate lyases, *endo*-pectin lyases, *endo*-galactanases,

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

25

endo-arabinanases, endo-xyloglucanases, endo-glucanases, xylanases, arabinoxylanases, xylogalacturonases, arabinofuranosidases, galactosidases, fucosidases, exo-galacturonases and xylosidases. Specific accessions of particular polysaccharide-modifying enzymes of interest include: *Aspergillus aculeatus* endo-galactanase (AC-number L34599) or an isoform or ortholog thereof, e.g. the ortholog AJ012316 from *Aspergillus tubigenis*; rhamnogalacturonan lyase (AC-number L35500) or an isoform or ortholog thereof; and *Aspergillus aculeatus* endo-1,5- α -arabinanase (SEQ ID # 1 from WO 94/20611) or an isoform or ortholog thereof, e.g. the ortholog L23430 from *Aspergillus niger*.

10

The term "decorative enzyme" refers to an enzyme, such as a transferase, which adds single monosaccharide side chains or non-sugar substituents, typically feroyl, acetyl or methyl esters, to the pectic backbone or side chains. Decorative enzymes are thus set apart from synthase complexes which are also transferases and which undertake polymerisation of the pectic backbone (homogalacturonan and the alternating rhamnogalacturonan backbone) as well as long side chains (most abundantly galactans and arabinans).

The term "auxiliary enzyme" refers to an enzyme which removes a pectin decoration as understood from the definition of a decorative enzyme above. Decoration often renders pectin inaccessible to polysaccharide-modifying enzymes, and hence, co-expression of the latter with a matching auxiliary enzyme enables or optimises interaction between the primary enzyme and its pectic substrate. Examples of auxiliary enzymes include esterases, e.g. a methyl esterase or an acetyl esterase, both of which may be specific to homogalacturonan or rhamnogalacturonan, as well as glycosidases that remove single monosaccharides from polymers, e.g. arabinofuranosidases, galactosidases, xylosidases or fucosidases.

"Molecular farming" refers to the practice of using plants as production vehicles for the production of a particular molecule as opposed to production of vegetables, fruits or fractions thereof (juice or flour for example). Classical examples of plant production for the recovery of well-defined molecules are vegetable oil, sugar and starch. Transgenic technology dramatically increases the range of molecules that can be farmed in plants, and the term is used here with particular reference to these wider perspectives.

30

The term "ortholog" is used to denote the following relationship between two (enzyme encoding) genes from *different* organisms: The genes are regarded as being orthologs if sequence similarity indicates evolutionary relatedness (however marginal), their gene products catalyse the same reaction, and they serve essentially similar or overlapping physiological purposes in the two organisms.

The term "isoform" is used to denote the following relationship between two genes from the *same* organism: The genes encode isoforms of the same gene product if sequence similarity indicates evolutionary relatedness and the encoded enzymes catalyse similar reactions. Isoforms may, or may not, serve different physiological functions in the organism.

The terms "tissue specific" and "organ specific" are used with regard to promoters in such a way that also assimilate inducible promoters are included. Assimilate inducible promoters often direct expression in sink organs solely by virtue of their assimilate, e.g. sucrose, inducibility. For all practical purposes, these are considered storage organ specific in the present context.

Complex cell wall polysaccharides are deposited in the cell wall, i.e. outside the protoplast, while the main steps of biosynthesis takes place in the Golgi apparatus. A polysaccharide-modifying enzyme will therefore come into contact with and act upon its substrate in either of these locations, and in transit from Golgi to the apoplast.

In one aspect, the invention relates to ectopic expression of a plant gene, or heterologous expression of a microbial gene in general without regard to any modification required to ensure proper subcellular localisation. Signal sequences of apoplastic enzymes encoded by plant genes generally function across plant species, also when used in chimeric constructs directing expression to organs where the gene product does not normally accumulate. Even secreted fungal enzymes are trafficked to the apoplast when expressed in plant cells. Those skilled in the art will be familiar with available techniques for engineering a gene where secretion to the apoplast does not function using the native gene, i.e. by replacing a non-functional signal sequence with, typically, a plant or fungal sequence which is known to function, or providing the gene with said sequence without replacement.

Using plant signal sequences ensuring localisation of the transgene product in the Golgi, it is contemplated that persons skilled in the art will be capable of engineering the transgene with appropriate sequences to accomplish modification of cell wall polysaccharides including pectins at their site of synthesis. The below Example 8 describes a particular embodiment of the invention in which advantage is taken of the fact that signal sequences often operate accurately across phylogenetically large distances in that a portion of a rat gene is used to ensure Golgi targeting.

Another aspect of the invention relates to co-expression of a gene encoding an enzyme which removes a particular kind of pectin decoration so as to facilitate access to the substrate of an enzyme which catalyses the desired remodelling of the polysaccharide. This embodiment of the invention is referred to as the use of an auxiliary enzyme. Example 9 hereinbelow illustrates the engineering and transformation involved.

Another aspect of co-expression of enzymes, typically in pairs (unless either enzyme requires an auxiliary enzyme for proper activity), pertains to self-processing plant material (e.g. self-processing tubers in the case of potatoes). This embodiment involves the enzymatic excision of a pre-selected part or a fragment of the targeted cell wall polysaccharide, e.g. pectin, which part or fragment may or may not have been subject to remodelling (in the latter case, the technology may not involve co-expression). Excision of the pre-selected part or fragment occurring post-harvest can be exercised by an enzyme which is stored in the plant cells separately from the substrate, i.e. this enzyme does not catalyse any changes in cell wall polysaccharide structure in the growing plant. Non-limiting examples of possible locations for the enzyme affording the excision include the vacuole, endoplasmic reticulum, cytoplasm and plastids. The location is chosen based upon stability in the plant and possible toxicity to the plant of the gene product in question. The enzyme may, however, also be stored directly in the apoplast if interaction with the substrate (apart for binding) can be avoided either by utilising an enzyme which is substantially inactive at ambient temperatures, or substantially inactive in the pH range found in the plant apoplast (pH 3-7.5) so that the enzyme can be activated by an appropriate change of conditions when desired. Activating treatments include (but are not limited to) heat, addition of salts, addition of organic compounds, physical treatment (pH changes), addition of proteases (e.g. proteases cutting away inhibiting parts of the modifying enzyme), additions of proteins (e.g. another essential subunit of the modifying enzyme).

WO 01/59137

28

PCT/DK01/00093

To summarise, the targeted polysaccharide is remodelled *in vivo* if desired. The plant is treated post-harvest, e.g. by introducing an incubation step of macerated plant material under conditions dictated by the requirements of the enzyme catalysing the excision, and the stored enzyme is thus allowed to act upon its substrate. The released fragments are then recovered in a state suitable for purification. This technology is superior to the use of technical enzymes in two respects: *Technical enzymes are rarely pure enough to act solely by excising a desired part or fragment of a polysaccharide without degrading the product due to the presence of side activities. Many plant organs, storage organs such as potato tubers, provide a very low background of endogenous polysaccharide-modifying enzymes.* Additionally, the enzyme affording the excision has excellent access to its substrate compared to a technical enzyme added from the outside, dependent as it is on effective homogenisation of the plant tissue, which is not the case when the enzyme is already present together with its substrate or in a compartment closely connected to the substrate.

The following examples 3 and 10 illustrate retaining of a cell wall polysaccharide-modifying enzyme in the endoplasmic reticulum and targeting of such an enzyme to the vacuole. The below Example 12 provides an example of a particular strategy for designing self-processing plant materials including potato tubers releasing galactanase modified hairy regions, and this example also demonstrates accumulation of a gene product in the cytoplasm.

Applications of the technology presented so far include molecular farming of tailored oligo- and polysaccharides. Use of the technology in any area may in addition lead to valorisation of by-products from other industries. Pulp resulting from beet sugar production and pulp resulting from starch production are non-limiting examples of by-products rich in cell wall polysaccharides including pectin of low value in its native state, but whose value can be improved by means of the present invention.

Medical applications include the provisions of pharmaceutical compounds as well as medical materials such as wound dressings, materials for transplants or implants, biocompatible surgical adhesives, immunomodulating compounds and blood clotting modulators etc. Use of the technology presented herein is not limited to molecular farming of the end-products, but is important already in the discovery phase. Plants producing tailored polysaccharides, such as pectins, can be used for the systematic generation of li-

braries of polymers and oligomers covering the structure activity space for some medical applications, i.e. to delineate the structural variability allowed while at the same time preserving the functional properties for the application under consideration. It is known *per se* in the art how to apply chemometric multivariate analysis, QSAR (quantitative structure activity relationships) and QSPR (quantitative structure property relationships) on data from evaluations of such libraries.

For purposes of the present invention, remodelling, i.e. enzymatic modification of the complex cell wall polysaccharides, of any plant belonging to the vascular plants is contemplated, including both monocots and dicots among the angiosperms. With regard to e.g. tailoring of pectin the dicots and non-commelinoid monocots may be particularly important. Conversely, remodelling of hemicellulosic polymers is of significant relevance in some species of the latter category, not least forage grasses and the cereals. Additional non-limiting examples of commercially important plants which may be modified in accordance with the invention include: soybean, tobacco, parsley, carrots, cauliflower, cabbage, broccoli, potato, sweet potato, bean, pea, chicory, lettuce, beet, turnip, radish, spinach, onion, garlic, pepper, celery, willow, poplar, squash, pumpkin, zucchini, cucumber, apple, pear, melon, plum, cherry, peach, nectarine, apricot, strawberry, grape, raspberry, blackberry, pineapple, avocado, papaya, mango, banana, citrus species, Arabidopsis, duck weed, and tomato. Among the non-vascular plants, the algae and the sea-weeds are important.

In specific embodiments the invention is directed to the use of enzymes that modify the hairy regions of pectin, e.g. by cleaving the hairy regions from the smooth regions, and/or by removing or shortening individual side chains of the hairy regions. For this reason, nucleotide sequences that result in expression of such enzymes, so as to result in transgenic plants in which pectin is modified *in vivo* in the hairy regions, are important. In the particular embodiment of the invention referred to as "self-processing plant material", enzymes which render parts of the polymer more soluble, or release it from the wall matrix, are important. The focus here is thus on enzymes which cleave the polymeric backbone of the polysaccharide in question.

As persons skilled in the art will be aware, the cell wall polysaccharides in questions are quantitatively and functionally important constituents of plant cell walls. This being the case, it must be assumed that nature sets certain limits as to the extent of modifications

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

30

that are possible. It is therefore clear that the modifications performed in the context of the present invention should not be so drastic so as to result in a non-viable plant. Some developmental changes resulting from growth impairing cell wall changes may be exploited to obtain localised cell ablation as a route to male sterility and other desirable traits already mentioned. On the other hand, as indicated above, the present inventors have surprisingly found that significant modifications of the monosaccharide profile and the overall linkage pattern of cell wall polysaccharides are possible, while still maintaining viable plants. Based on these surprising findings, it is contemplated that using the teachings herein, a wide variety of modified cell wall polysaccharides may be produced *in vivo* without sacrificing plant viability.

Ways of modifying complex cell wall polysaccharides

In accordance with the invention, complex cell wall polysaccharides may be modified either *in planta* or following harvest of the plant material in question in several different ways. These will be briefly summarised in the following:

- (i) Manipulation of biosynthesis either by modulation of plant genes involved directly in biosynthesis of complex cell wall polysaccharides e.g. the transfer and polymerisation steps, by manipulation of pool sizes and transport of substrate molecules or by interference with polymer biosynthesis by expression of polysaccharide-modifying enzymes which, following translation and entry into the secretion pathway, are retained in the Golgi apparatus, hence forcing turn-over of the pectic or hemicellulosic carbohydrates at their place of synthesis.
- (ii) Post-deposition modification by expression of appropriate polysaccharide-modifying enzymes equipped with signals which ensure post-translational transport directly to the apoplastic space and hence the cell wall, resulting in direct interaction with the enzymatic substrate in question after its apposition to or intussusception into the cell wall.
- (iii) Post-harvest release of one or more polysaccharide-modifying enzymes which have been produced *in planta* followed by post-translational accumulation in an appropriate cellular organelle or compartmentalised indirectly through the selection of enzymes that are active only under the post harvest conditions, and not in the living plant.

Organ/tissue specific expression of cell wall polysaccharide-modifying enzymes

It is contemplated that strategies which target expression of the polysaccharide-modifying enzymes of the invention and thus production of the modified cell wall polysaccharides to only certain parts of a given plant will make possible an even greater range of *in vivo* cell wall polysaccharide modifications. For example, it is contemplated that in potatoes, it will be advantageous to express the polysaccharide-modifying enzymes in the tubers only, whereas other parts of the plant will maintain their native polysaccharide structures.

- 10 Such targeted expression of polysaccharide-modifying enzymes according to the present invention may suitably be performed using tissue specific regulatory sequences. Many such tissue specific sequences are known in the art.

US 5,723,757 e.g. discloses the use of 5' transcriptional regulatory regions of plant genes which ensure "sink tissue" specific expression of a desired DNA sequence. Such transcriptional regulatory regions allow expression of a desired DNA sequence to specifically take place in "sink organs", i.e. photosynthetically inactive parts of a plant such as roots, grains, fruits or tubers. As a result, gene products of interest can be either expressed or inhibited in certain tissues. The regulatory regions are in particular derived from genes coding for patatin proteins belonging to class I patatin genes.

US 5,436,393 discloses the DNA sequence of an expression cassette comprising potato tuber specific regulatory regions from the patatin gene from potato, in particular the B33 promoter sequence of a patatin gene. Transformation of potato cells using an expression cassette makes possible the production of transgenic potato plants in which a DNA sequence of heterologous origin, fused to the B33 promoter sequence, can be expressed in a tuber specific manner.

Other known promoters directing expression to tubers include the putative metallocarboxypeptidase inhibitor from potato (accession number U30388), the potato lipoxygenase (accession number X95513) and the cathepsin D inhibitor (accession number X74985). Persons skilled in the art will be able to excise other promoter regions having a desired specificity and prepare chimeric gene constructs with the desired polysaccharide-modifying enzyme. As at least some tuber specific promoters owe their organ specificity to their sucrose inducibility, it is not surprising that these promoters often will be operational in

organs of other species where sucrose accumulates, for example beet roots (the activity of the GBSS promoter in tobacco leaves is illustrated in Example 10 herein). Conversely, it will not be surprising to those skilled in the art that sucrose inducible promoters can be identified from other species and be found to be not only storage organ specific in the
5 originating species but also to confer tuber specificity in potato. Promoters that ensure high expression e.g. in tubers of potato include the GBSS and the B33 promoter.

Modifying biosynthesis of plant cell wall polysaccharides

10 Opportunities for remodelling of pectic or hemicellulosic polysaccharides will be available using enzymes which act at the different levels of synthesis: (i) maintenance of the pool of nucleotide sugars, (ii) polymerisation of a particular backbone, and (iii) decoration of these backbones with various substituents (glycosyl residues, methyl and acetyl groups).

15 Interference with biosynthesis can, in accordance with the invention, be accomplished by targeting a polysaccharide-modifying enzyme to the Golgi apparatus to interfere with biosynthesis. The enzyme can be engineered so that it becomes membrane anchored, and thus retained in the Golgi, or it can be targeted to the Golgi as a soluble enzyme which eventually will be secreted along with the cell wall polysaccharides into the apoplast. It

20 was a surprising finding that an enzyme which is anchored to the Golgi membrane successfully interacts with a biosynthetic complex which itself is bound to the membrane. Hence both the membrane anchored and the soluble variations are of interest, with the former expected to be most specific. This embodiment also affords a possible solution to the problem arising from possible toxicity to plants of some secreted polysaccharide hydrolases.
25

Several lines of evidence support the view that oligogalacturonides released through enzymatic degradation of the plant cell wall by elicitor enzymes can trigger specific responses in the plant cell (Moloshok *et al.*, 1992). Therefore, it is likely that one or more of
30 the enzymes which, in accordance with the invention, are potential candidates for *in vivo* modification of the plant cell will release carbohydrate oligomers that can initiate a response similar to the one observed for oligogalacturonides.

It has been found that the N-terminal 77 amino acids from tobacco N-acetylglucosaminyl-
35 transferase I are sufficient to retain a reporter protein in the Golgi apparatus of *Nicotiana*

WO 01/59137

33

PCT/DK01/00093

benthamiana cells. Essl et al. (1999) and Dhugga et al. (1997) cloned polypeptides with an implied role in polysaccharide synthesis, and these polypeptides are Golgi associated without being integral proteins (*Pisum sativum* reversibly glycosylatable polypeptide (RGP1) U31565). From *Arabidopsis* an acetylglucosaminyltransferase AJ243198, and a xylosyltransferase, AJ272121, have been identified. Following the complete sequencing of the *Arabidopsis* genome, those skilled in the art will know how to search the genome for additional Golgi targeted gene products. As additional soluble and integral plant Golgi proteins are characterised, sequences will become available for engineering polysaccharide-modifying enzymes for Golgi targeting. At present, one may take advantage of the fact that at least some Golgi targeting sequences are functional between very unrelated species. In one specific embodiment of the invention, a sequence from a rat gene can be used such as it is demonstrated in Example 8 herein.

Post deposition modification of cell wall polysaccharides

The below Example 5 illustrates the use of a fungal galactanase for the targeted change of the monosaccharide profile of a pre-selected part or fragment of a cell wall polysaccharide as exemplified by the pectin hairy region. Galactan side chains are shortened to an extent where the side chains are no longer substrates for the enzyme. The plant compensates by increasing the relative and absolute content of uronic acids and by increasing the degree of acetylation.

In the present case the galactans contained few or no decorations with short monosaccharide side-chains (most typically arabinosyl decorations), so that co-expression of an auxiliary enzyme was unnecessary. Where necessary, a particular embodiment of the invention employs double constructs charged with the remodelling enzyme of interest, plus the auxiliary enzyme which co-acts during the processing, see Examples 4 and 9 below.

Examples 2 and 7 herein illustrate the expression of a rhamnogalacturonan lyase, i.e. an enzyme which nicks the pectin hairy region backbone and it was demonstrated that this enzyme is capable of cleaving the pectin polymer irrespective of its decoration with acetyl and methyl esters. Where this is not the case, an auxiliary enzyme, typically a rhamnogalacturonan or homogalacturonan acetyl esterase or a methyl esterase, is co-expressed with the primary remodelling enzyme to afford back-bone nicking.

35

Post-harvest modification and self-processing plant material

Self-processing plant material, e.g. tubers, is designed by storing one or more enzymes in the plant tissue as already explained so as to prevent their interaction with its/their substrate *in vivo* while it/they will excise a desired fraction post harvest. This expression may be co-ordinated with expression of additional enzyme(s) catalysing the remodelling of the target cell wall polysaccharide during growth. As mentioned above, sequestering of the processing enzyme(s) during growth of the plant may e.g. be in the vacuole, endoplasmic reticulum, cytoplasm and/or plastids, or it may be through chemical sequestering. The internally stored enzyme may e.g. be targeted to the endoplasmic reticulum using the KDEL retention signal or to the vacuole using a signal sequence derived from patatin or sporamin.

Upon being subjected to a treatment post-harvest, typically a physical treatment in the form of homogenisation or maceration, the internally stored enzyme is brought into contact with the cell wall polysaccharides to catalyse a post-harvest modification of the cell wall material. One important and interesting embodiment of post-harvest modification is the release of the *in vivo* modified polymers from pulp material. Using tailored pectin hairy regions as an example, these are released by the action of an enzyme which cleaves the smooth regions of the pectin. Example 12 below illustrates targeting of plant or fungal *endo*-polygalacturonases to the cytoplasm, to the vacuole and retained in the endoplasmic reticulum (ER). The site inside the cell is selected based on stability and attained accumulation in each site of the enzyme as well as on possible toxicity of the enzyme to the plant when stored in different locations. Conditions for maceration and incubation of the plant material for self-processing are chosen according to properties of the internally stored enzyme, the occurrence of interfering endogenous enzymes in the plant tissue and possibly of the stability of the polymers or oligomers to be recovered. It will be realised from the foregoing that either enzyme may require an auxiliary enzyme, and hence, that ternary or higher order vector constructs can be developed to thus extend this embodiment of the invention.

Enzymes with the desired property of being able to release pectic polysaccharides from the cell wall polysaccharide mesh comprise in particular those enzymes which (optionally assisted by an auxiliary enzyme) cleave a polysaccharide backbone. Pectin and pectate hydrolases and lyases, rhamnogalacturonan hydrolases and lyases are known enzyme

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

35

categories with this property. Enzymes active against xylogalacturonan will be similarly useful and should be regarded as exemplifying new activities against specialised structural features of the polysaccharide backbone. Enzymes capable of removing pectic side chains are in the present context viewed primarily as remodelling enzymes. However, it is
5 evident that there may well be examples where side chain removal will solubilise particular oligosaccharides.

It is evident that the technology allowing internal storage of the enzymes is useful for the molecular farming of the enzymes for their own sake. Likewise, it is evident that the technology is useful for the manufacture of functional feed. By "functional feed" is meant fodder for livestock and poultry where one or more intercellularly accumulated polysaccharide-modifying enzymes enhance the digestibility of the plant material itself as well as that of other feed ingredients with which it has been mixed. Example 10 demonstrates accumulation of an arabinanase in the ER of tobacco leaves.

15

Food Industrial applications of modified pectin or fragments thereof

Pectin is an important food additive and ingredient and it is known to be an important factor in determining the texture of plant material. Modification of its structure, especially
20 at the regions where the molecule is heavily branched (hairy regions) will alter both the physical properties of the polymers and the properties of the cell wall material. This technology allows the ratio of neutral sugar side-chains to homogalacturonan to be manipulated. The functional properties of the pectic phase which correlate with this ratio, and which are of major interest in the food industry, are gelling, gel stability and water-binding efficiency, with the latter being favoured in polymers with larger proportions of hairy regions, and the first two in polymers with a high content of homogalacturonan.

Potato pectins have not found any use in food applications due to their high neutral sugar content and the presence of acetyl groups preventing gelation. From a historical point of
30 view, the use of high quality lemon and lime pectins has usually been directed to applications in jellies, jam etc. (high methyl-ester pectins) on the one hand and in low sugar products (low methyl-ester pectins such as calcium pectates) on the other hand. In the last decade, however, the field of application has broadened and now includes use as an emulsifier and stabiliser and as a coating for products prior to frying. New applications for
35 pectin derived molecules include use as a drinkable dietary fibre. Here it is a problem that

pectin gives a rather high viscosity. It has, however, been shown that when degrading the homogalacturonan part of pectins, the rhamnogalacturonan part (Modified Hairy Region - MHR) maintains the same fibre effect while at much lower viscosity (EP 0868854-A2).

Similar MHR can be obtained according to the invention from tailored pectins produced by potatoes. Keywords here are low cost and large volume of raw material, both characteristics of the potato pulp raw material. Ideally, a potato can be produced that incorporates PG-activity activated during the starch processing, giving the modified hairy regions directly in the potato juice, i.e. self-processing tubers are of relevance here. This will give both easier starch processing and low cost modified hairy regions. Easier starch processing may result from promoted extractability or from "less packaging" tuber cells, i.e. cells where a direct wall thinning has taken place as an intended tailoring of the wall or as a side effect of pectin remodelling. Apart from the starch extraction which is relevant only to starch storing organs of course, neither the problems associated with low quality pectin from some (abundant) sources, nor the solutions afforded by the technology presented here, are potato specific. The technology is relevant for other crop plants as well, e.g. for sugar beet.

More specialised food applications require control over water binding capacity and over viscosity and "mouth feel" of the polymeric solutions. Rhamnogalacturonans, native or tailored, may find uses as low viscosity products like milk shakes, drinking yoghurt, etc.

Pectin engineering would furthermore be useful for the juice, cider and wine industry and would hence be relevant for grapes, apples and other fruits. Juice and must are often subjected to filtering to remove hydrocolloids and suspended oligo- and polysaccharides so as to clarify the juice and prevent the occurrence of haze or precipitates in later processing steps. Filtering may be facilitated by tailoring pectin so as to increase solubility, or conversely to increase precipitability. The present invention provides new opportunities for gaining control over those juice and must characteristics which rely on soluble and suspended pectic polymers.

Finally, since pectins mediate the cell wall porosity (Baron-Epel *et al.*, 1988), tailored pectins may influence calcium firming and similar processes of relevance to canning. The invention therefore provides a method for improving food industrial processability of plant material in general, e.g. with respect to canning, calcium firming, filtering, etc., by using plant material with modified pectin as described herein.

Medical applications of modified plant cell wall polysaccharides

In addition to the various possibilities discussed above for modifying pectic polysaccharides for various industrial applications, it is also contemplated that modified cell wall polysaccharides including modified pectin substances will be useful for a variety of applications in the pharmaceutical and medical fields. For example, the present invention makes it possible to modify the structure of a cell wall polysaccharide *in vivo* to produce a polysaccharide modified to have specific properties with respect to e.g. immunomodulation. Further, it is contemplated that modified cell wall polysaccharides developed and produced in accordance with the present invention may be suitable for general use as anti-inflammatory compounds for any type of inflammatory reaction, whatever the cause, including inflammation resulting from physical damage, chemical agents, and biological agents such as bacteria, fungi, viruses and other microorganisms.

15 Use of the tailored complex cell wall polysaccharides falls into two basic areas, pharmaceuticals and medical materials. Materials currently used for the manufacture of wound dressings for chronic, non-healing wounds, for wounds caused by psoriasis (which has an auto-immune component to the disorder), for wounds involving gangrene and for ostomy products rely almost entirely on alginates and modified celluloses selected for their physical properties (which they generally share with many pectic and hemicellulosic polymers). For wound dressings aimed at treating various types of chronic wounds, physicochemical properties are important. These include gelling ability and gel strength, water binding capacity, charge density and hydrophilicity. These properties are well studied in relation to food industrial uses of plant polysaccharides. Modified cell wall polysaccharides will be able to act as a water buffering system where the dressing either removes water produced by the wound, or supplies it to dry gangrene so that the cellular immune system gains access to the surface. The biological activities of pectin, however, are unique to pectins. Desirable bioactivities include the potential of the pectins to act as a reservoir for cellular growth factors and hence stimulate cell growth in the chronic wound.

30

Another interesting perspective is to use a pectin membrane as a scaffold for regrowing skin from cultured skin cells to be used as transplants.

Use as drugs to inhibit autoimmune processes or to prevent or treat the effects of autoimmune processes is contemplated to be applicable to a broad range of disorders. Certain

35

types of ulcers are believed to involve an autoimmune aspect, and also in these cases pectic structures likely to be rhamnogalacturonans have been found to be active (Sakurai et al. 1998). Further non-limiting examples of such autoimmune-associated conditions include: Autoimmune hepatitis, Primary biliary cirrhosis, Primary sclerosing cholangitis, 5 Autoimmune hemolytic anemias, Grave's disease, Myasthenia gravis, Type 1 Diabetes Mellitus, Inflammatory myopathies, Multiple sclerosis, Hashimoto's thyroiditis, Autoimmune adrenalitis, Crohn's Disease, Ulcerative Colitis, Glomerulonephritis, Progressive Systemic Sclerosis (Scleroderma), Sjögren's Disease, Lupus Erythematosus, Primary vasculitis, Rheumatoid Arthritis, Juvenile Arthritis, Mixed Connective Tissue Disease, Psoriasis, Pemfigus, Pemfigoid, Dermatitis Herpetiformis, etc.

Another contemplated use for modified pectins and other polysaccharides is in combating some types of cancer. There is evidence to suggest, for example, that modified citrus pectin (MCP) is able to combat various types of cancer, including melanoma (skin cancer) 15 and prostate cancer. This effect is believed to be associated with a cytostatic or "antiadhesive" effect provided by the MCP in the early stages of metastasis (Ralph W. Moss, <http://ralphmoss.com/mcp.html>). By use of the method outlined herein for identifying and producing modified pectic polysaccharides, it is believed that novel modified cell wall polysaccharide substances including modified pectins suitable for use as anti-cancer 20 agents can be developed and commercially produced e.g. by means of molecular farming techniques.

Applications in the medical field are not restricted to the production of pharmaceuticals and medical materials but are also relevant for the precedent discovery phase, i.e. as a 25 tool for generating libraries of cell wall polysaccharide oligo- and polysaccharides and for determining the structural requirements for a desired pharmaceutical activity of such oligo- and polysaccharides. E.g. pectic polymers are synthesised as repeating structures which in turn consist of other, smaller repeating structures. While the remodelling technology described herein does not change the fact that pectic polymers remain less than fully 30 characterised, it is possible to produce populations of molecules in which the *difference* between molecules is rather precisely known. For example, rhamnogalacturonan from tubers expressing *endo*-galactanase described in Example 5 differs from the corresponding wild-type polymers by the length of the galactan hairs, degree of acetylation and uronic acid content. Hence, it can be determined with certainty whether these features are 35 essential for an observed bioactivity.

Using pectin as an example, a library in which the differences between entries are known (even though the precise structures are not) can be generated using the following steps:

1) Tailored pectins are recovered from a range of transgenic plants each producing poly-saccharides modified in a well-defined way.

2) Samples from step 1 are subdivided and treated post-harvest with enzymes *in vitro*.

3) Samples from step 2 are subdivided and modified by chemical treatments, saponification and partial hydrolyses for example and derivatisation *in vitro*; permethylation, acetylation, epoxidation and amidation are non-limiting examples of the latter. Types of derivatisations and methods are known *per se* from the food ingredient industry, the textile industry and from organic synthesis and spectroscopy of carbohydrates.

Step 2 and 3 may, if desired, be performed in the opposite order so that the chemical modification serves the purpose of protecting or exposing some parts of the molecule to enzymatic reactions.

The library entries are then subjected to screening for medical activity using screening procedures known *per se* in the art. As the structure-function relationship of particular compounds becomes evident, this will provide information useful for deciding whether to transfer some of the enzymatic treatments used post-harvest (step 2) into the plant (where compensation by the plant allows for it), and thus develop transformed plants for the molecular farming of a starting material which is tailored as much as possible in the plant by means of *in vivo* processing of pectin.

The invention will be further illustrated by means of the following non-limiting examples and the drawings wherein:

Fig. 1 illustrates the use of exploratory principal component analysis (PCA) to discriminate two transgenic potato plants, T_{11,1} and T_{13,1}, expressing *Aspergillus aculeatus* endo-galactanase from wild type, and it shows the comparison between T_{13,1} and wild type, using the third and fifth Principal Component (PC) score;

WO 01/59137

40

PCT/DK01/00093

Fig. 2 shows size exclusion chromatographic analysis (detection by refractive index) (arbitrary units) of rhamnogalacturonan I (RGI) specifically extracted from cell walls of wild type potato tubers (WT) and transgenic potato plants, T_{11.1} and T_{13.1}, respectively by treatment with a combination of fungal EPG and PME. This EPG/PME treatment released nearly twice as much uronic acid (UA) from the cell walls of transformed tubers compared to wild type. The RGI extracted by EPG/PME from wild type cell walls contained two major fractions as indicated by UA content and refractive index detection: fraction A (molecular weight > 500 kDa) and fraction C (molecular weight 0.2 - 8 kDa). EPG/PME extracts from T_{11.1} and T_{13.1} have a different profile from the wild type containing less of fraction A, substantially more of fraction C and in addition, fragments of ~120 kDa (fraction B), not present in wild type extracts. The asterisk indicates a large peak due to the presence of sample buffer salts devoid of pectic material; and

Fig. 3 shows sections of wild type (A, C) and *endo*-galactanase-expressing (T_{13.1}) (B, D) potato tubers gold labelled with monoclonal antibody LM5, silver enhanced and viewed by reflection confocal scanning microscopy (A, B) and transmission electron microscopy (C, D). The walls of wild type parenchymal cells are strongly labelled (white in A, black particles in C), whereas in T_{13.1} tubers, the labelling density is greatly reduced and localised only to some cell corners (arrow heads in B) close to the plasma membrane (arrows in D). Asterisks represent spaces once occupied by starch granules. ML indicates the expanded middle lamella of these filled corners. Scale bars: A and B 100 μ m, C and D 2 μ m.

25 EXAMPLES

Materials and methods

Reagents and enzymes

30

All enzymes used for general molecular biology methods were purchased from Boehringer, Denmark, unless otherwise stated. Chemicals and reagents for cell wall characterisations were purchased from Sigma. The porcine pancreatic α -amylase was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), the pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus* and *endo*-polygalacturonase from *Aspergillus niger* were purchased from Megazyme In-

WO 01/59137

41

PCT/DK01/00093

ternational (Bray, Ireland) and the purified recombinant pectin methylesterase (PME) from *Aspergillus aculeatus* was a gift from Dr. Kirk Schnorr (Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Denmark).

5 Transformation of plants

Transformation of *Nicotiana tabacum* (L.) cv. *Xanthi*. leaf discs was performed essentially as described by Horsch *et al.*, 1985. Internodes, from *in vitro* plants of both transformants and wild type plants, were transferred to the greenhouse to generate mature plants.

- 10 Leaves were harvested and used for analysis. Potatoes, cv Posmo and Karnico were used for *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (Visser, 1991). *In vitro* shoots of transgenic and control clones were transferred to the greenhouse to generate mature plants.

15 DNA analysis

DNA was extracted from leaves ground in liquid N₂ according to the CTAB protocol as described by Rogers and Bendlich (1988). For determination of the presence of the trans-

- 20 gene in the transgenic clones, isolated genomic DNA was digested with *EcoRI*, which cuts twice within the cDNA, and *KpnI*, which cuts once within the cDNA. The digested DNA was separated by electrophoresis and blotted onto Hybond N membranes (Amersham) under alkaline conditions as described by Sambrook *et al.* (1989). The membranes were hybridised, as described by Salehuzzaman *et al.* (1992), with a ³²P-ATP labeled 1 kb *KpnI*-*XbaI* cDNA fragment of rhamnogalacturonan-lyase/pYES2.

25

RNA analysis

RNA was extracted from 1 tuber of each transgenic line as described by Kuipers *et al.* (1994). Tissue (5 g) was ground in liquid N₂ and mixed with 5 ml of extraction buffer (50

- 30 mM Tris, pH 9.0, 10 mM EDTA, 2 % SDS) and 5 ml of phenol. The mixture was centrifuged (10 min at 2,000g), the supernatant was extracted with 5 ml of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), and the mixture was centrifuged again. Nucleic acids were precipitated with 5 ml of isopropanol and centrifuged (10 min at 2000g); the pellet was dissolved in 1125 µl H₂O. RNA was precipitated overnight at 0°C with 375 µl of
- 35 8 M LiCl and centrifuged (10 min at 13,000g). The RNA pellet was dissolved in 0.4 ml of

WO 01/59137

42

PCT/DK01/00093

H₂O and precipitated with 40 µl of 3 M NaAc and 1 ml of ethanol. Following centrifugation the pellet was washed in 70% ethanol, dried, and resuspended in H₂O. RNA gel blotting and hybridisation were carried out using 40 µg of tuber RNA per sample, as described by Sambrook et al. (1989). The membranes were hybridised with the following ³²P-ATP labelled cDNA probes: a 1 kb *KpnI*-*XbaI* fragment of rhamnogalacturonan-lyase/pYES2 and a 2.3 kb *EcoRI* fragment of a potato 28S ribosomal RNA gene (Landsmann and Uhrig, 1985).

Preparation of leaf and tuber extracts

10

Freshly harvested leaves were frozen in liquid N₂ and comminuted using a pestle and mortar with 3 ml extraction buffer A (25 mM NaOAc pH 5.0 containing Complete TM, Boehringer Mannheim) per g tissue (fresh weight). The sample was incubated for 10 min. on ice and insoluble material precipitated by centrifugation (18,000 x g_{max}) for 10 min., the supernatant was recovered and stored at 20°C. Freshly harvested tubers were cut into small cubes, frozen in liquid N₂ and comminuted in an electric grinder to a fine powder. The powder was extracted with extraction buffer A as described above.

Galactanase activity assays

20

The enzyme activity was determined using a plate assay with a 0.5% upper and 1% lower agarose layer in 50 mM sodium citrate pH 4.5. The upper layer contained a suspension of the substrate, azurine-coupled potato galactan (Megazyme International, Bray, Ireland), at a concentration of 1 mg/ml. Aliquots (20 µl) of tissue supernatants were added to wells punched in the upper layer only. Plates were incubated at room temperature for 24 hr.

Soluble, quantitative galactanase assay. Tuber extracts of wild type and transformants (*T*_{11.1} and *T*_{13.1}) were assayed for *endo*-galactanase activity using the *p*-hydroxybenzoic acid hydrazine assay (Lever 1972) with potato galactan (P-GALPOT from Megazyme) at a concentration of 0.1 % in 0.1 M NaOAc pH 4.0 as substrate at 40°C.

Arabinanase activity assays

The enzyme activity was determined using a plate assay with a 0.5% upper and 1% lower agarose layer in 50 mM sodium citrate pH 5.5. The upper layer contained a suspension of

WO 01/59137

43

PCT/DK01/00093

the substrate, azurine-coupled sugar-beet arabinan (Megazyme International, Bray, Ireland), at a concentration of 1 mg/ml. Aliquots (20 µl) of tissue supernatants were added to wells punched in the upper layer only. Plates were incubated at room temperature for 24 hr.

5

Aspergillus RG-lyase assay

Frozen potato tissue was ground with a mortar under addition of liquid nitrogen. Approximately 1 gram of ground potato tissue was homogenized using an Ultra-Turrax TP 18-10 (14,000 rpm, Ika Werk, Staufen, Germany) in 2 ml of a 0.25 M sodium phosphate buffer (pH 6.5; 4°C) containing 0.4 M NaCl. After 1 h of extraction at 4°C (with periodic shaking), the suspension was centrifuged (10 min, 2,000 g). The supernatant was used as the enzyme extract.

15 Subsequently, 5 µl of supernatant was added to 245 µl of a 0.25 % w/v solution of saponified apple MHR in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 5.0. After incubation for 15 min. at 40°C in a vortex mixer, the enzymes were inactivated by heating for 5 min. at 100°C. Degradation of the saponified apple MHR was determined using HPSEC (BioGel TSK 40XL, 30XL, and 20XL columns in series).

20

SDS-PAGE and Western Blot

Tuber extracts were subjected to SDS-PAGE and Western Blot analysis according to standard procedures. The blot was probed with a rabbit antibody raised against purified

25 *Aspergillus aculeatus* galactanase (a gift from Jens-Christian Navarro Poulsen, Centre for Crystallographic Studies, University of Copenhagen).

Fourier Transform Infrared microspectroscopy

30 Epidermal peels from 20 leaves from *in vitro* plants and Vibratome sections (60 µm) from 20 individual freshly harvested wild type and transgenic (11.1, 11.2 and 13.1) tubers were mounted on barium fluoride windows and air dried. The barium fluoride window was supported on the stage of a UMA500 microscope accessory of a Bio-Rad FTS175c FTIR spectrometer equipped with a liquid nitrogen-cooled mercury cadmium telluride detector.

35 Areas of 100 µm² of the cortex and perimedullary regions were selected and spectra obtained. Sixty-four interferograms were collected in transmission mode with 8 cm⁻¹ resolu-

tion and co-added to improve the signal-to-noise ratio for each sample. The spectra were baseline-corrected and area-normalised. Exploratory Principal Component Analysis (PCA) of area-normalised spectra in the region 1800 to 800 cm^{-1} were carried out using WIN-DISCRIM software (E.K. Kemsley, Institute of Food Research, Norwich, UK).

5

Analysis of the pectin in transgenic potato tubers

To determine the fine structure of the pectin in potato plants it is first necessary to isolate the cell wall material (CWM) from the potato tuber. Potato tubers were peeled, diced and
10 frozen under liquid nitrogen. Subsequently, 100 g of tissue was chopped into a powder using a Braun Multimix MR 860 kitchen chopper (2 x 30 sec, 350 watt). The potato powder was homogenised with 300 ml of mixed-cation buffer (10 mM NaOAc, 3 mM KCl, 2 mM MgCl_2 and 1 mM CaCl_2), containing Triton X 100 (2 mg/ml) at 4°C for 7 x 60 s using an Ultra-Turrax T25 (24,000 RPM). A few drops of octanol were also added to minimise
15 frothing during blending. The detergent was removed by washing through a 250 and 36 μm sieve with chilled mixed-cation buffer. This procedure was carried out at 4°C. The washed residue was removed from the sieve and stirred in chilled 50% acetone. The sample was filtered and weighed into a large beaker. Five times the sample weight of a saturated phenol solution was added. After 30 minutes stirring the saturated phenol was
20 removed by suction and the residue was washed with the mixed-cation buffer solution on a grade 3 sintered glass funnel.

The residue was frozen into small pellets in liquid nitrogen and cryomilled for 2 x 15 seconds in a coffee grinder. Immediately after thawing, the sample was mixed into a paste
25 with mixed-cation buffer. This paste was stirred quickly into a large volume of boiling mixed-cation buffer and boiled for 30 seconds. Immediately following the 30 second boil the mixture was decanted into chilled mixed-cation buffer (10 volumes), resulting in immediate cooling.

30 Starch removal was effected with ca 1,500 units of alpha-amylase (Boehringer) and 400 units of pullulanase (Megazyme) in mixed-cation buffer with 0.01% w/v NaN_3 . The sample was agitated in an orbital shaker at 37°C overnight. If starch still remained, the enzyme treatment was repeated. The presence of starch was detected using 1% KI/0.5% I_2 under the light microscope. When starch removal was complete as assessed by KI staining the
35 cell walls were washed on a 36 μm sieve to remove glucose and salt. The residue was freeze-dried as the cell wall material.

The obtained CWM was fractionated by extraction with different solvents as described by Huisman *et al.* (1999). For 1 gram of CWM extract twice with 70 ml 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.2 for 60 min. at room temperature, three times with 40 ml of 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.2 for 45 min. at 70°C, three times with 35 ml 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.2 containing 0.05 M EDTA and 0.05 M ammonium oxalate for 45 min. at 70°C and finally three times with 40 ml 0.05 M sodium hydroxide for 45 min. at 2°C. After each extraction step, the suspension was filtered over a grade 3 sintered glass funnel.

- 10 This resulted in five different fractions, Cold Buffer Soluble Solids (CBSS), Hot Buffer Soluble Solids (HBSS), Chelating Agent Soluble Solids (ChSS), Alkali Soluble Solids (ASS) and a hemicellulose rich residue (Res), each containing a different population of cell wall polymers. Before further analysis, all fractions were freeze-dried.
- 15 The CWM and the fractions were characterized using different techniques:
Neutral sugar composition was determined by subjecting the samples to a 1 M H₂SO₄ hydrolysis (3 h at 100°C). Next, the released neutral sugars were converted into their alditol acetates and separated on a 2-mm i.d. glass column packed with Chrom WAW 80-100 mesh, coated with 3% OV275 (Chrompack, Middelburg, The Netherlands) in a Carlo Erba
20 Fractovap 2300 gas chromatograph (Milan, Italy) operated at 200°C and equipped with a flame ionization detector set at 270°C. Inositol was used as the internal standard.
- The degree of acetyl and methyl esterification was estimated by HPLC using the procedure described by Voragen *et al.* (1986).
- 25 Pectinases, e.g. polygalacturonase, pectin methyl esterase, *endo*-arabinase, *endo*-galactanase, arabinofuranosidase, galactosidase, pectate lyase, rhamnogalacturonan acetyl esterase, in combination with High Performance Size Exclusion Chromatography (BioGel TSK 40XL, 30XL, and 20XL columns in series) and High Performance Anion Exchange
30 Chromatography using a Dionex (Sunnyvale, CA, USA) Bio-LC GPM-II quaternary gradient module equipped with a Dionex CarboPac PA-100 column (250 x 4 mm, 20°C) were used to further elucidate the structure of the pectin fractions. However, solubility problems hindered these experiments.
- 35 The results obtained from structural analysis of wild type potato pectin will be used for comparison with the transgenic potato pectin. It is believed that the solubility problems that occurred during the enzymatic characterization can be overcome by keeping the frac-

tions in solution instead of freeze-drying them. Furthermore, MALDI-TOF MS can be used to obtain additional information by studying the fragments released by pure and well characterized enzymes.

5 Isolation of pectic polysaccharides

Following the procedure of O'Neill *et al.* (1990), de-starched cell wall material (10 mg) was suspended in 2 ml 50 mM ammonium formate, pH 4.5, containing 0.05% sodium azide. EPG (1 u, 1 unit releases 1 μ mol of reducing galacturonate per min) and PME (1 u, 1 unit releases 1 μ mol of methanol per min) were added, and the suspension incubated for 16 h at 40°C. The suspension was then filtered through a double layer of nylon (30 μ m pore size) to separate the EPG/PME extracts from the remaining wall material which was suspended in 1 ml ice-cold 50 mM sodium carbonate containing 10 mM sodium borohydride. This suspension was incubated for 1 h at 4°C, followed by a 4 h incubation at room temperature. Insoluble material was recovered by filtration through a double layer of nylon. The pH of the filtrate was adjusted to pH 5, EPG (1 u) was added and the mixture was incubated for 4 h at 40°C to partially depolymerise solubilised pectic material. This digested soluble wall material was termed the carbonate extract.

Both the EPG/PME and carbonate extracts were subjected to size exclusion chromatography using a Superose 12 column (1 x 30 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The column was equilibrated in 50 mM ammonium formate, pH 5.0) before the extracts were applied to the column and eluted isocratically with the same buffer at a flow rate of 0.4 ml/min. The eluent was monitored using refractive-index detection (Model 131, Gilson, Middleton, WI) and the uronic acid content of the collected fractions (0.8 ml) determined using the m-hydroxybiphenol assay (Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973). Certain fractions were pooled, freeze-dried and their monosaccharide composition determined. The molecular mass of the eluted components was estimated by comparing their retention times to those of dextran standards (Fluka, Buchs, Switzerland) and galacturonic acid.

Monosaccharide composition analysis

Seaman hydrolysis (Selvendran *et al.*, 1979) was used to hydrolyse crude or insoluble cell wall residues for monosaccharide composition analysis, whereas solubilised wall fractions

- were hydrolysed to monosaccharides using 2 M aqueous TFA for 1 h at 121°C. The Seaman hydrolysis was carried out as described below. Wall residues (2-4 mg) were added to 100 µl ultrapure water in a screw-capped borosilicate test tube, 300 µl conc. H₂SO₄ was added and the suspension was left for 3 h at room temperature with occasional vortexing.
- 5 The suspension was then diluted with 6.6 ml ultrapure water and heated for 2 h at 100°C. After cooling, the solution was neutralised with saturated barium hydroxide. The resulting BaSO₄ precipitate was removed by centrifugation (1000 x g_{max}) for 5 min, the remaining supernatant was concentrated by rotor vaporisation and its monosaccharide composition determined.
- 10 Monosaccharide mixtures (5-15 µg) were applied to a Carbo-Pac PA10 column (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) and eluted isocratically with water at a flow rate of 1.5 ml/min. Sodium hydroxide (300 mM) was added to the column eluent continuously at a flow-rate of 0.5 ml/min, and the eluent was monitored using a pulsed amperometric detector (Dionex).
- 15 Eluting monosaccharides were identified by comparison to retention times of sugar standards (fucose, rhamnose, arabinose, xylose, glucose, galactose and mannose) and quantified by integration of their respective peak areas and comparison to standard curves generated for each monosaccharide. The uronic acid content of each monosaccharide mixture was determined by the m-hydroxybiphenol assay (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973).
- 20

Measuring degree of esterification

- The degree of acetyl and methyl esterification was estimated by HPLC using the procedure described by Voragen *et al.* (1986).
- 25

Immunogold labelling of potato tubers

- Transformant and wild-type tuber cell walls were characterised essentially as described in Bush and McCann (1999). In brief: Low-temperature resin-embedded sections of glutaraldehyde-fixed tubers from wild type and transformant 13.1 were immunogold labelled with mAb LMS (recognises 1,4-beta-galactan (Jones *et al.* 1997)), silver-enhanced and analysed by reflection laser scanning confocal microscopy and electron microscopy, as described previously McCann *et al.* 1992).
- 35

WO 01/59137

48

PCT/DK01/00093

EXAMPLE 1

A general set of DNA constructs for plant transformation**5 DNA construct pPGB121s-new**

The granule bound starch synthase promoter region from the vector pPGB121s (a kind gift from R. Visser) was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) with primers 5'GATTACGCCAAGCTTTAACG3' (SEQ ID NO:1) and

- 10 5'GGTTTGTGACGAAATCAGAAATAATTGGAGG3' (SEQ ID NO:2) introducing a *HindIII* site 5' and a *SacI* site in the 3' end of the PCR product. In addition, the PCR approach deleted a spurious translational start codon in the GBSS 5' untranslated region. The product was then purified by agarose-gel electrophoresis and ligated into *HindIII/SacI*-cleaved pGUSNos (a gift from L. Sander) producing pGBSS-GUSNos. The GBSS
- 15 promoter fragment was then excised from pGBSS-GUSNos with *HindIII* and *XbaI*, purified, and subsequently cloned in *HindIII/XbaI* digested pBI121 (Datla *et al.*, 1992), generating the vector pPGB121-new. This vector was digested with *SmaI* and *SacI* in order to remove the GUS coding region. Subsequently, the *SacI* overhang were blunted with Klenow fragment and the vector closed by ligation resulting in pPGB121s-new.

20

DNA construct pPGB121s-B

The vector pPGB121s-new was digested to completion with *SacI* and *BamHI* and purified by agarose gel-electrophoresis. A polylinker produced by annealing of two synthetic oligonucleotides with the sequences 5' TCGACCGGTACCTAGGCCCGG '3 (SEQ ID NO 3) and 5' GATCCCGGGCCTAGGTACCGG 3' (SEQ ID NO:4) was cloned in the *SacI/BamHI* cut vector. This step resulted in the vector pPGB121s-B harbouring an MCS with unique sites for *AgeI*, *KpnI*, *AvrII*, *SmaI* and *XmaI*.

30 DNA construct pGEd

The *HindIII* site was deleted in pPGB121s-new by digestion with *HindIII* followed by fill-in of the overhangs by reaction with Taq in the presence of nucleotides for 7 min. at 72°C.

- The resulting product was purified by agarose-gel electrophoresis and closed by ligation,
- 35 generating pPGB121s-new-DHindIII. A novel polylinker produced by annealing of two

WO 01/59137

49

PCT/DK01/00093

synthetic oligonucleotides with the sequences
 5'TCGACAAGCTTTCTAGAGCCTCGAGG3' (SEQ ID NO:5) and 5'
 GATCCCTCGAGGCTCTAGAAAGCTTG3' (SEQ ID NO:6) was cloned into the remaining
 part of the original multiple cloning site (MCS), generating the plasmid pGED. The novel
 5 MCS introduced restriction sites for *HindIII*, *XbaI* and *XhoI*.

DNA construct pADAP

pGED was digested with *Sall* and *BamHI* and purified by agarose gel-electrophoresis. A
 10 novel polylinker produced by annealing of two synthetic oligonucleotides with the se-
 quences 5'TCG ACC GGT ACC AAG CTT GCG GGC TCT AGA CTC GAG CCT AGG
 CCC GG' (SEQ ID NO:7) and 5' GAT CCC GGG CCT AGG CTC GAG TCT AGA GCC
 CGC AAG CTT GGT ACC GG' (SEQ ID NO:8) was cloned into the remaining part of the
 original MCS of pGED, generating the plasmid pADAP. The novel MCS introduced
 15 restriction sites for *Agal*, *KpnI*, *HindIII*, *XbaI*, *XhoI*, *AvrII* and *SmaI*.

DNA construct pPGB121s-B-B33

The vector pBINB33 (a kind gift from L. Willmitzer) was digested with *EcoRI* and purified
 20 by agarose gel-electrophoresis. Following a linker encoding a *HindIII* site produced by an-
 nealing of the oligonucleotides 5' AATCAAGCTTG 3' (SEQ ID NO:9) and 5'
 AATCAAGCTTG 3' (SEQ ID NO:10) was cloned in the *EcoRI* cut pBINB33 vector. This
 step resulted in generation of the vector pBINB33-EHE. In order to isolate a fragment
 harbouring the patatin B33 promoter the pBINB33-EHE vector was digested with *HindIII*
 25 and *Sall*. The resulting fragment was cloned in *HindIII/Sall* digested pPGB121s-B,
 generating the plasmid pPGB121s-B-B33.

EXAMPLE 2

30 **Specific DNA constructs for plant transformation harbouring a polysaccharide-
 modifying enzyme targeted for the apoplast**

DNA construct pGED-GAL

35 The 1,3 kb cDNA encoding an *Aspergillus aculeatus* galactanase was excised from the
 vector pC1G1 (a generous gift from S. Kauppinen) by digestion with *HindIII* and *XbaI*, pu-

WO 01/59137

50

PCT/DK01/00093

rified and cloned in the corresponding sites in the pGED MCS, creating the expression cassette: GBSS promoter, *endo*-galactanase, nopaline synthase terminator. This DNA construct is referred to as pGED-GAL.

5 Construction of pGED-ARA

A 1.2 kb cDNA encoding an *Aspergillus aculeatus* arabinanase was excised from the vector pC1A4 (a generous gift from S. Kauppinen) by digestion with *HindIII* and *XbaI*, purified and cloned in the corresponding sites in the pGED MCS giving rise to the plasmid pGED-ARA.

DNA construct pADAP-ARA

The 1.2 kb fragment encoding the *Aspergillus aculeatus* arabinanase was isolated from pGED-ARA by digestion with *HindIII/SalI* and cloned into pre-cut pADAP. This step resulted in the vector pADAP-ARA.

DNA construct pADAP-GAL

The 1.3 kb fragment encoding the *Aspergillus aculeatus* galactanase was isolated from pGED-GAL by digestion with *HindIII/SalI* and cloned into pre-cut pADAP. This step resulted in the DNA construct pADAP-GAL.

DNA construct pPGB121s-B-B33-ARA

The 1.2 kb fragment encoding the *Aspergillus aculeatus* arabinanase was isolated from pADAP-ARA by digestion with *KpnI* and *SmaI*. The fragment was then cloned in pre-cut pPGB121s-B-B33. This step generated the DNA construct pPGB121s-B-B33-ARA.

30 DNA construct pPGB121s-B-B33-GAL

The 1.3 kb fragment encoding the *Aspergillus aculeatus* galactanase was isolated from pADAP-GAL by digestion with *KpnI* and *SmaI*. The fragment was then cloned in pre-cut pPGB121s-B-B33, creating the expression cassette: patatin B33 promoter, *endo*-galac-

WO 01/59137

51

PCT/DK01/00093

tanase, nopaline synthase terminator. This step generated the DNA construct pPGB121s-B-B33-GAL.

DNA construct pPGB121s-new-RHGB

- 5 The plant transformation vector pPGB121s-new was digested with the restriction enzyme *Sall*, blunt-ended with Klenow enzyme, and after heat-inactivation of the two enzymes further digested with the restriction enzyme *XbaI*. The vector pYES2/RHGB containing the cDNA clone encoding the *Aspergillus aculeatus* rhamnogalacturonan lyase was digested with the restriction enzyme *BamHI*, blunt-ended with Klenow enzyme, and after heat-inac-
- 10 tivation of the two enzymes further digested with the restriction enzyme *XbaI*. The treated vector and cDNA insert were purified after agarose gel electrophoresis and ligated, creating the DNA construct pPGB121s-new-RHGB.

EXAMPLE 3

15

Designing constructs for targeting the gene product to intracellular compartments.

DNA construct pADAP/ARA-KDEL

- 20 The arabinanase encoding cDNA was amplified with the primers ACAGCTCAACAAGTGTAAC (GBSSpro primer, SEQ ID NO:11) and GACTTCTCGAGTGGCTGG-CCTGTTGTGAAGGATGAAC**TTAGTCTAGAAATGCTC** (ARA-KDEL primer2, nucleotides encoding the KDEL ER retention signal is indicated with italics and an engineered stop codon is indicated in bold, SEQ ID NO:12) using the vector
- 25 pGED/ARA as template. The resulting product was then cloned in the vector pCR2.1-TOPO as described by the manufacturer (Invitrogen). This step resulted a mixture of the vectors pCR2.1-TOPO/ARA-KDEL1 and 2 with the ARA-KDEL product in different orientations.
- 30 In order to minimise the possibility for later expression problems due to errors introduced during PCR, the majority of the ARA-KDEL coding region was swapped with the coding region originating from the original ARA cDNA included in the yeast expression vector pC1A4. The vectors pCR2.1-TOPO/ARA-KDEL1 and 2 was cleaved with *Sall* and *XbaI* and the resulting KDEL encoding fragment cloned into *Sall/XbaI*-cut pC1A4. This resulted
- 35 in generation of the vector pYES2.0/ARA-KDEL. The ARA-KDEL fragment was then ex-

WO 01/59137

52

PCT/DK01/00093

cised from pYES2.0/ARA-KDEL with *HindIII* and *XbaI* and cloned in *HindIII/XbaI* digested pADAP. This generated the vector pADAP/ARA-KDEL.

DNA construct pPGB121s-B-B33-ARA-KDEL

5

The ARA-KDEL fusion was excised from pADAP/ARA-KDEL with *KpnI* and *SmaI* and the fragment purified by agarose gel-electrophoresis. The resulting fragment was cloned into *KpnI/SmaI* digested pPGB121s-B-B33. This step generated the vector pPGB121s-B-B33/ARA-KDEL.

10

DNA construct pPGB121s-B-B33-ARA-KDEL

The ARA-KDEL fusion was excised from pADAP/ARA-KDEL with *KpnI* and *SmaI* and the fragment purified by agarose gel-electrophoresis. The resulting fragment was cloned into

15 *KpnI/SmaI* digested pPGB121s-B-B33. This step generated the vector pPGB121s-B-B33/ARA-KDEL.

DNA construct pADAP/ST-ARA

20 The glycosyltransferase alpha-2,6-sialyltransferase (ST) is a Type II membrane protein localised to the Golgi apparatus. The first 44 amino acids of this protein have previously been shown to direct Golgi retention of a fused marker protein, lysozyme (Munro 1991). In addition, Golgi targeting of GFP has been accomplished by fusion of the 52 N-terminal amino acids of ST (Boevink et al. 1998).

25

To this end, a construct harbouring a fusion between the 52 N-terminal amino acids of ST and the mature form of the *endo*-arabinanase has been produced as follows.

The ST region of relevance was amplified by PCR with primers (ST SOE FWD, ST specific sequences underlined) 5' GACGAAGCTTATGATTTCATACCAACTTG 3' (SEQ ID

30

NO:13) and (ST SOE REV, ST specific sequences underlined) 5' GGAGCCGGGGTTGGCGTA-GGCCACTTTCCTGGCTC 3' (SEQ ID NO:14). The plasmid pST-MYC used as a template was a kind gift from Søren Møgelvang. The mature part of the arabinanase was then amplified with primers (ARA SOE FWD, arabinanase specific sequences in bold)

35 5'GAGCCAGGAGAAAGTGGCCTACGCCAACCCGGCTCC 3' (SEQ ID NO:15) and

WO 01/59137

53

PCT/DK01/00093

(ARA SOE REV, arabinanase specific sequences in bold) 5'

CAGTCTAGACTACACAACAGGCCAGCC 3' (SEQ ID NO:16). The two products were purified by agarose gel-electrophoresis and subsequently fused by sequence overlap extension PCR (Higuchi 1988) resulting in fusion of the 52 N-terminal amino acids of the

- 5 ST to the mature part of the arabinanase (302 amino acids). The fusion product was purified by agarose-gel electrophoresis digested with *HindIII* and *XbaI* and cloned in *HindIII/XbaI* digested pADAP. The resulting plasmid was named pADAP/ST-ARA.

EXAMPLE 4

10

Design of constructs harbouring two genes

DNA constructs pGED/double/1 and pGED/double/2

- 15 The vector pPGB121s-B was cleaved with *HindIII* and *EcoRI*. The resulting fragment harbouring the GBSS-Tnos expression cassette was end-filled with Taq and the resulting product was cloned in the vector pCR2.1-TOPO as described by the manufacturer (Invitrogen). This step generated the vectors pCR2.1-TOPO/GBSS-nosterm1 and pCR2.1-TOPO/GBSS-nosterm 2. Each vector was digested with *EcoRI* and the resulting fragment
- 20 purified by agarose-gel electrophoresis. The fragment was cloned in the vector pGED which had been digested with *EcoRI* and dephosphorylated with alkaline shrimp phosphatase as described by the manufacturer (Boehringer Mannheim). This step resulted in the vectors pGED/double/1 and pGED/double/2 harbouring two GBSS promoters followed by multiple cloning sites carrying *Sall*, *HindIII*, *XbaI*, *XhoI*, *BamHI* (MCS1) and *Sall*, *AgeI*,
- 25 *KpnI*, *AvrII*, *SmaI*, *XmaI* and *BamHI* sites (MCS2).

DNA construct harbouring genes encoding a remodelling and an auxiliary enzyme, pPGB121s-new-RHGB-RHA1:

- 30 The vector pBI221 (Clontech) was digested with the restriction enzyme *EcoRI*, dephosphorylated, phenol/chloroform extracted and precipitated with alcohol. The phosphorylated oligonucleotide P-AATTAAGCTT (SEQ ID NO:17) was self-annealed and ligated into the *EcoRI* restricted pBI221 vector, creating the vector pBI221-2HindIII.

WO 01/59137

54

PCT/DK01/00093

The vector pBI221-2HindIII was digested with the restriction enzyme *SacI*, blunt-ended with T4 DNA polymerase, and after heat-inactivation of the two enzymes further digested with the restriction enzyme *BamHI*. The treated vector (pBI221-2HindIII*B*Sb) was purified after agarose gel electrophoresis.

5

The vector pGEM-7Z/RHA1 containing the cDNA clone encoding the *Aspergillus aculeatus* rhamnogalacturonan acetyl esterase was digested with the restriction enzyme *XbaI*, blunt-ended with Klenow enzyme, and after heat-inactivation of the two enzymes further digested with the restriction enzyme *BamHI*. The treated cDNA insert was purified after

10 agarose gel electrophoresis and ligated into the gel-purified vector part pBI221-2HindIII*B*Sb, creating the vector pBI221-2HindIII-RHA1. The vector pBI221-2HindIII-RHA1 was digested with the restriction enzyme *HindIII* and the expression cassette containing the 35S promoter-rhamnogalacturonan acetyl esterase, nopaline synthase terminator was purified after gel electrophoresis.

15

The DNA construct pGB121s-new-RHGB was digested with the restriction enzyme *HindIII*, de-phosphorylated, purified after gel electrophoresis, and ligated with the purified *HindIII* fragment containing the expression cassette: 35S promoter, rhamnogalacturonan acetyl esterase, nopaline synthase terminator, creating the DNA construct pGB121s-

20 new-RHGB-RHA1.

DNA constructs pGED/apoGal/empty/1 and pGED/apoGal/empty/2

25 The construct pGED/GAL is digested with *HindIII/XbaI* and the resulting GAL encoding fragment is isolated by agarose-gel electrophoresis. The vectors pGED/double/1 and pGED/double/2 are cleaved with *HindIII* and *XbaI* and purified by agarose-gel electrophoresis followed by cloning of the GAL encoding fragment. These steps generate two vectors designated pGED/apoGAL/empty/1 and pGED/apoGAL/empty/2, respectively.

30 Hence, the two vectors have been equipped with an apoplastic targeted galactanase between the GBSS promoter and the Nos terminator in the first GBSS/Nos terminator cassette.

Design of 'self-processing' double DNA constructs

The 1.3 kb cDNA fragment encoding the *Aspergillus aculeatus* *endo*-galactanase is isolated from one of the previously constructed vectors and cloned in between the GBSS promoter and the Nos terminator in one of the two GBSS/Nos terminator cassettes present in pGED/double/1 or 2, thus creating the apoplastic expression cassette GBSS promoter-*endo*-galactanase-Nos terminator. These vectors are termed pGED/apoGAL/1 and 2, and are the starting vectors used for the design of all double DNA constructs. The second GBSS promoter- Nos terminator cassette is used for the construction of expression cassettes designed for delivery of cell wall modifying enzymes, to the cytoplasm, the endoplasmic reticulum (ER) or the plant vacuole. The enzyme is preferentially an enzyme whose action post harvest releases the product of interest from the pulp cell walls. In the following Example 12 self-processing using as non-limiting examples the *endo*-galactanase as the remodelling enzyme, and *endo*-PG as the excising enzyme is demonstrated. Vector constructs introducing the *endo*-PG and targeting it for various subcellular locations are prepared as outlined:

Cytoplasmic targeting. For cytoplasmic targeting, *endo*-PGs from plants, bacteria or fungi with high stability in a neutral pH environment are preferred. The targeting to the cytoplasm is accomplished by removing the sequence from the *endo*-PG cDNA encoding the *endo*-PG signal peptide, thus abolishing its transport across the endoplasmic reticulum. If the N-terminus of the mature protein is not known from protein sequences, the cleavage site for the signal peptide is determined empirically using computer programs optimised for this purpose. The cDNA encoding the mature *endo*-PG protein is then cloned in between the GBSS promoter and the Nos terminator in the second GBSS/Nos terminator cassette in the constructs pGED/apoGal/empty/1 and pGED/apoGal/empty/2.

ER retention. For ER retention, *endo*-PGs from plants, bacteria or fungi with high stability in a slightly acidic to neutral pH environment are preferred. The targeting to the ER is accomplished by incorporating into the cDNA encoding the *endo*-PG a sequence encoding the tetrapeptide KDEL at the very end of the coding region, giving rise to an expressed protein with a KDEL extension at its C-terminal. The cDNA encoding the fusion protein is then cloned in between the GBSS promoter and the Nos terminator in the second GBSS/Nos terminator cassette in the vectors pGED/apoGal/empty/1 and pGED/apoGal/empty/2.

Vacuolar targeting. For vacuolar targeting, *endo*-PGs from plants, bacteria or fungi with high stability in an acidic environment are preferred. Targeting to the vacuole can e.g. be accomplished by attachment of a nucleotide sequence encoding a signal sequence ensuring translocation of the hybrid into the ER followed by a vacuolar signal sequence which e.g. comprises the amino acids NPIRL (an example of an N-terminal propeptide (NTPP)). Alternatively, the NPIRL extension or the like is fused to the C-terminal end of the protein in question while a signal sequence ensuring translocation into the ER is fused to the N-terminal part of the protein destined for vacuolar targeting (Koide et al. 1997).

10

An example of a protein which harbours an NTPP in its N-terminus is sweet potato sporamin. The N-terminal part of sporamin has been shown previously to direct proteins not normally found in the vacuole to this compartment when fused to the sporamin N-terminus. Hence, a nucleotide sequence encoding the N-terminal part of sporamin can be fused directly to the nucleotide sequence encoding an enzyme which hydrolyses the pectin backbone (i.e. with the signal peptide deleted) and thereby direct vacuolar targeting of the pectinase. The cDNA encoding the fusion protein is then cloned in between the GBSS promoter and the Nos terminator in the second GBSS/Nos terminator cassette. This vector is termed pCED/apoGALvacPG/1. Using single gene constructs, the following Examples 10 and 11 illustrate targeting of an *endo*-arabinanase to the ER and the vacuole, respectively.

EXAMPLE 5

25 Remodelling galactan side chains of rhamnogalacturonan in potato

Potato plants expressing a fungal (*Aspergillus aculeatus*) *endo*-galactanase (Christgau et al., 1995) under the control of the tuber-specific GBSS promoter have been generated, see Example 2. Apart from a low transformation efficiency the obtained plants displayed no altered phenotype compared to wild type plants. The lower frequency may indicate that the promoter is active during *in vitro* culture and that a high level of *endo*-galactanase activity at this very early stage of development may be lethal to the transformed cells. Endogenous *endo*-galactanase activity was almost undetectable in tuber extracts of wild type potato plants whereas for T_{11,1} and T_{13,1} the activity levels were 104 and 214 μ mol galactose equivalents/min/g tuber fresh weight, respectively (Table 2). T_{11,1} and T_{13,1} were

35

WO 01/59137

57

PCT/DK01/00093

selected for analysis because of their cell wall phenotype as initially picked up by FTIR-spectrometry, see below.

Endo-galactanase activity in the transgenic plants was extracted quantitatively in low salt buffer, indicating that the enzyme is not tightly bound to the cell wall. Extracts from transgenic and wild type plants were also analysed by Western blot. All extracts having *endo-galactanase* activity contained a protein with a molecular mass of 38 kDa similar to that of isolated recombinant *endo-galactanase*.

10 During the isolation and extraction of cell walls, several precautions were taken to avoid enzymatic degradation of the pectic material by the introduced *endo-galactanase* as well as endogenous pectinases. Buffers containing sodium deoxycholate were used to denature and solubilise proteins, which were also diluted by several subsequent ice-cold extractions in buffers with a pH unfavourable for optimal activity of plant pectinases and in
15 particular the introduced *endo-galactanase*. The *endo-galactanase* activity was also undetectable in the cell wall extraction buffer during preparation of cell walls. Fourier transform infrared microspectrometry was used for the initial selection of transformants. Exploratory principal component analysis (PCA) was able to clearly discriminate two of the transformants, T_{11.1} and T_{13.1}, from wild type. Fig. 1 shows the comparison between
20 T_{13.1} and wild type, using the third and fifth Principal Component (PC) scores. These transformants were therefore selected for further analyses. The yield of cell wall material was lower in the transformants than in the wild type and so was the residual starch content (Table 2). Monosaccharide composition of the wall preparations revealed a dramatic reduction to ~30% in galactose content in both transformants compared to wild type
25 (Table 3). Standard variations were found to quite high in some monosaccharide determinations. However, the uncertainty is not associated with the transformed phenotype but almost invariably with residual starch in the prepared cell walls. Galactosyl residues are present in different wall polysaccharides (hemicellulose, arabinogalactan proteins and RGI), but only RGI is known to contain beta-1,4-linked galactan, so our subsequent
30 analysis of cell wall material focused on this polymer.

RGI is specifically extracted from walls by treatment with a combination of fungal EPG and PME. This EPG/PME treatment released nearly twice as much UA from the cell walls of transformed tubers compared to wild type (Table 3). The EPG/PME-solubilised pectin
35 was analysed by size exclusion chromatography to separate the digest fragments ac-

cording to molecular size. The RGI extracted by EPG/PME from wild type cell walls contained two major fractions as indicated by UA content and refractive index detection (Fig. 2); these were termed fraction A (molecular weight > 500 kDa) and fraction C (molecular weight 0.2 - 8 kDa). EPG/PME extracts from T_{11,1} and T_{13,1} have a different profile from the wild type (Fig. 2), containing less of fraction A, substantially more of fraction C and in addition, fragments of ~120 kDa (fraction B), not present in wild type extracts. The asterisk indicates a large peak due to the presence of sample buffer salts devoid of pectic material.

- 10 As determined by sugar analysis, (Table 3), fraction A of the wild type tuber contained high proportions of UA, rhamnose, arabinose and galactose with virtually no other monosaccharides, indicative of high molecular weight HGA and RGI polymers. However, while Fraction A from wild type tubers contained 64 mol% galactosyl residues, transgenic tubers contained only 15-20 mol%, suggesting a major reduction in the amount of galactan. The
- 15 arabinosyl content of the transgenic tubers is slightly increased and the UA content is significantly higher. Interestingly, fucosyl residues could not be detected in the transgenic fraction A, but were present, albeit in a very low percentage, in wild type fraction A. (Fucosyl residues may be substituents of the galactan side-chains of potato RGI). The monosaccharide composition of fractions A and B from transgenic tubers was similar (Table 3).
- 20 Fraction C from wild type and transformant tuber cell walls contained mainly HGA fragments, but some small molecular weight RGI fragments were also detected. The RGI fragments derived from the transgenic tubers, like those of fractions A and B, also had a lower galactosyl content (1.4-1.5 mol%) compared to those of wild type tubers (3.8 mol%). However, the relatively large amount of glucosyl residues may represent a contamination
- 25 of the wall material with oligosaccharides released by the alpha-amylase treatment during cell wall preparation.

Enzymatic treatment of the walls with EPG/PME does not completely depectinate the walls. Therefore, additional sequential extractions were performed using sodium carbonate at 4°C and room temperature (Table 3). De-esterification with carbonate solubilised very little pectin and, unlike the EPG/PME extraction, the yield from the wild type and transgenic cell wall preparations was similar. Size exclusion chromatography of the carbonate extracts resulted in two UA containing fractions (data not shown), one in the void volume (molecular weight >500 kDa) and one with a retention time equivalent to GalA,

35 indicating the presence of monosaccharides or small oligosaccharides. The latter fraction

could not be analysed for its monosaccharide composition because of the high salt concentration present in the sample. Monosaccharide analysis of the extracts containing the large polymers showed high proportions of arabinose, galactose, UA and rhamnose, indicative of RGI (Table 3). Significant amounts of glucosyl and xylosyl residues were probably derived from xyloglucan solubilised by the carbonate extractions. The carbonate extracts of the transgenic cell walls also showed reduced galactosyl content relative to wild type (18-19% versus 52%). Again, the arabinosyl content of the RGI present in carbonate extract is constant whereas the UA content is only higher in the cell wall preparations of $T_{13.1}$ but not in $T_{11.1}$.

Pectins may remain in the wall after the enzymatic and carbonate buffer extractions. The monosaccharide compositions of cell walls before and after the sequential treatments with EPG/PME and carbonate were compared to quantify the efficiency at which pectins were solubilised (Table 3). No rhamnose could be detected in the walls after pectin extraction; although rhamnose is detected with only moderate sensitivity, this suggests that the RGI present in the unextracted walls was completely removed by the sequential extractions. However, the extracted walls of wild type and transformed tubers still contained galactose in similar quantities. This galactose most likely originates from other wall components than RGI, such as xyloglucan, which are known to contain beta-1,2-linked galactosyl residues, and cannot be hydrolysed by the *endo*-galactanase. Xyloglucans are only extracted by concentrated alkali or xyloglucanase treatment and would therefore be expected to be present in walls treated by the procedure used in this study. Interestingly, the UA content is more than 3-fold higher in the remaining walls of the wild type than in the transformants, indicating an increased extractability of pectin from the transformants.

To determine if 1,4-beta-D-galactan has been specifically hydrolysed by the *endo*-galactanase monoclonal antibody LM5 which recognises tetramers of 1,4-beta-D-galactan was used to immunogold-label wild type and $T_{13.1}$ mature tuber tissue (Fig. 3).

Fig. 3 shows sections of wild type (A, C) and *endo*-galactanase-expressing ($T_{13.1}$) (B, D) potato tubers gold labeled with monoclonal antibody LM5, silver enhanced and viewed by reflection confocal scanning microscopy (A, B) and transmission electron microscopy (C, D). The walls of wild type parenchymal cells are strongly labeled (white in A, black particles in C), whereas in $T_{13.1}$ tubers, the labeling density is greatly reduced and

WO 01/59137

60

PCT/DK01/00093

localized only to some cell corners (arrow heads in B) close to the plasma membrane (arrows in D). Asterisks represent spaces once occupied by starch granules. ML indicates the expanded middle lamella of these filled corners. Scale bars: A and B 100 μ m, C and D 2 μ m.

5

To determine the architectural changes brought about in the rhamnogalacturonan (RG) molecule by the galactose removal, linkage pattern was determined according to Hakomori (1964) on isolated RG from T_{13.1} and the wild type control. The results summarised in table 1 below show the expected increase in terminal galactosyl residues accompanied by very significant reductions in several types of internal galactosyl residues with the internal beta-1,4-galactosyl residue reduced to about one ninth of the wild type level and many of the less abundant linkages reduced to below the detection limit in the transformant.

From these results it can be concluded that all RGI polymers isolated from transgenic walls had a significantly reduced galactose content, showing that the secreted enzyme was active in the walls and hydrolysed most galactan side chains of RGI. Immunolocalization indicated that the removal of substrate for the galactanase was nearly complete, leaving hairy region galactans so short that neither antibody LM5 nor the galactanase could bind to them. Linkage analysis corroborate these results and demonstrate that not only has the composition been changed but a new rhamnogalacturonan architecture has been produced. Electron micrographs indicate the occurrence of small amounts of longer galactans on the side of the walls facing the plasma membrane (the most recently synthesised part of the wall), suggesting that deposition of newly synthesised galactans competes with removal of galactans, albeit with removal being the dominant process. This is the first demonstration of remodelling of monosaccharide profile and linkage pattern of a plant cell wall polysaccharide. The results are summarised in Table 1:

Table 1. Glycosidic linkage abundance (mol%) in cell walls of wild type and transgenic potato

Sugar	Wild type potato	Transgenic potato T _{13.1}
2-Rha	4.0	8.1
2,4-Rha	7.7	13.6
^a t-Araf	4.1	4.1
5-Araf	28.1	40.1
2,3,5-Araf	-	2.9
t-Gal	7.2	13.9
3-Gal	3.3	4.7
4-Gal	36.1	4.0
3,4-Gal	1.0	-
2,4-Gal	1.4	-
4,6-Gal	2.5	-
t-xyl	0.7	1.4
4-Xyl	0.8	1.6
^c 4-Glc	2.8	5.6

^at- denotes terminal residues

^bAraf denotes furanose form of arabinosyl residues

^cMost of the 4-Glc is taken to be starch contamination)

Conclusions

10

All RGI polymers isolated from transgenic walls had a significantly reduced galactose content, showing that the secreted enzyme was active in the walls and hydrolysed most galactan side chains of RGI. Immunolocalization indicated that the removal of substrate for the galactanase was nearly complete, leaving hairy region galactans so short that

15 neither antibody LM5 nor the galactanase can bind to them. Electron micrographs indicate

small amounts of longer galactans on the side of the walls facing the plasma membrane (the most recently synthesised part of the wall), indicating that deposition of newly synthesised galactans competes with removal of galactans, albeit with removal being the dominant process. This is the first demonstration of remodelling of monosaccharide profile or

20 linkage pattern of a plant cell wall polysaccharide.

Table 2. *Endo*-galactanase activity and cell wall yield^a

	Galactanase activity (μ mol galactose eq./min/g fresh weight)	Cell wall yield (mg/g fresh weight)	Residual starch content of walls (mass %)	Extraction yield ^b (μ g UA-equ. / mg dry walls)	
				EPG/PME ^c	Na ₂ CO ₃ ^c
wild type	1.6	13.1 $\pm$ 2.0	14.6 $\pm$ 5	71.9 $\pm$ 2.5	14.0 $\pm$ 1.4
T _{11.1}	104	8.6 $\pm$ 2.1	11.9 $\pm$ 6	115.5 $\pm$ 20.7	11.5 $\pm$ 0.9
T _{13.1}	214	9.5 $\pm$ 2.5	9.1 $\pm$ 5	142.2 $\pm$ 14.3	20.3 $\pm$ 6.5

^a Data ($\pm$ SD) is the average of three independent experiments5 ^b Determined by the *m*-hydroxybiphenol assay^c Extraction specifics are described in *Materials and Methods*

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

63

Table 3. Sugar compositions (mol%) of material obtained from transgenic and WT potato tubers^a

		Fucose	Arabinose	Rhamnose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannose	UA
Walls before extraction	wild type	0.3 ± 0.3	6.2 ± 2.7	1.4 ± 1.2	9.4 ± 1.5	53.0 ± 7.0	2.6 ± 0.2	0.4 ± 0.4	26.7 ± 1.7
	T _{10,1}	0.3 ± 0.1	6.8 ± 2.8	1.4 ± 1.2	3.3 ± 1.1	61.0 ± 5.6	3.0 ± 2.3	0.6 ± 0.5	23.5 ± 8.0
	T _{10,1}	0.3 ± 0.1	4.8 ± 1.2	0.8 ± 0.4	2.6 ± 0.4	63.5 ± 5.9	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.4	25.9 ± 6.6
EPG/PME extract	A wild type	0.2 ± 0.2	15.8 ± 1.2	5.7 ± 2.0	64.8 ± 4.1	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.3	nd ^b	13.0 ± 2.5
	T _{10,1}	nd	30.3 ± 9.9	10.4 ± 8.4	20.5 ± 2.5	0.4 ± 0.4	2.4 ± 0.8	nd	36.0 ± 2.2
	T _{10,1}	nd	25.1 ± 6.9	7.0 ± 4.5	15.8 ± 3.6	0.2 ± 0.3	1.4 ± 1.5	nd	50.5 ± 12.3
B ^c T _{10,1}	wild type	nd	32.3 ± 1.1	7.8 ± 3.1	20.3 ± 0.5	0.3 ± 0.4	0.7 ± 0.6	nd	38.6 ± 4.3
	T _{10,1}	nd	20.8 ± 7.8	5.5 ± 2.2	13.3 ± 3.9	0.4 ± 0.6	0.4 ± 0.8	nd	59.6 ± 11.8
	C wild type	nd	2.2 ± 0.7	2.5 ± 0.5	3.8 ± 1.5	24.8 ± 24.9	0.1 ± 0.2	nd	66.4 ± 22.8
Na ₂ CO ₃ extract	T _{10,1}	nd	2.0 ± 0.6	2.5 ± 2.2	1.4 ± 0.6	28.9 ± 25.4	0.3 ± 0.3	nd	64.9 ± 24.3
	T _{10,1}	nd	4.2 ± 2.8	1.1 ± 0.3	1.5 ± 1.0	9.5 ± 3.3	1.5 ± 2.8	0.4 ± 0.7	81.9 ± 10.3
	wild type	nd	23.0 ± 7.9	7.1 ± 3.3	52.0 ± 10.9	5.2 ± 5.9	2.8 ± 2.8	nd	9.9 ± 3.7
Walls after extraction	T _{10,1}	nd	38.9 ± 13.7	13.6 ± 6.9	18.9 ± 3.3	5.5 ± 5.0	3.7 ± 1.3	1.5 ± 2.6	17.9 ± 8.3
	T _{10,1}	nd	34.2 ± 14.9	9.7 ± 6.6	18.3 ± 4.6	3.4 ± 4.8	2.3 ± 2.1	nd	32.1 ± 28.3
	wild type	nd	4.2 ± 0.5	nd	2.4 ± 1.1	46.0 ± 5.9	15.6 ± 5.4	1.5 ± 1.9	30.2 ± 0.9
T _{10,1}	T _{10,1}	nd	3.6 ± 0.2	nd	2.4 ± 1.5	73.3 ± 7.6	7.8 ± 5.9	5.8 ± 9.2	7.0 ± 2.9
	T _{10,1}	nd	3.4 ± 1.1	nd	1.8 ± 0.5	74.2 ± 7.6	10.5 ± 6.4	0.3 ± 0.1	9.7 ± 1.0
	wild type	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^a Data (± SD) is the average of three independent experiments^b not detectable^c Fraction B was not present in EPG/PME extracts from WT plants (see Fig. 2)

EXAMPLE 6

Galactanase driven by the patatin promoter

- 5 Transgenic potato plants were produced essentially as described in Example 5 using the pPGB121s-B-B33-GAL so that the galactanase would be driven by the patatin promoter rather than the GBSS-promoter. Analysis of gene expression has shown that expression was effectively confined to the tubers, and required higher concentrations of sucrose for induction in other organs as compared with the GBSS-promoter. Expression in tubers was
- 10 not significantly different from that seen with the GBSS-promoter. Tubers can be subjected to immunological characterisation using the LM5 antibody to confirm that the cell wall phenotype in the tubers does not depend on the promoter driving expression of the galactanase gene.

15 EXAMPLE 7

Potato transformed to express the rhamnogalacturonan-lyase targeted to the apoplast

- 20 250 explants were used for transformation with *Agrobacterium tumefaciens* (see pPGB121s-new-RHGB and experimental procedures in Materials and Methods). This resulted in the generation of 21 individual transgenic lines, of which 18 were used for the present analysis. In general, the transgenic plants were normal and only some (18%) had a change in phenotype. Compared with the controls, these plants were smaller and also
- 25 had smaller leaves. The leaves were thicker, rough and curled. Furthermore, these plants were darker compared to all other transgenics and the controls. All plants with an altered phenotype died before they produced tubers. In other experiments (transformations with other genes) we found similar phenotypes, suggesting that this is an effect of the transformation procedure itself (like polyploidisation) and not of a particular gene or construct.
- 30 The normal looking plants appeared to produce tubers with an altered phenotype.

After initial analysis of DNA, RNA and protein level, interesting lines were propagated to generate more material for further analysis. All transgenic lines that had been successfully transformed (based on Kanamycin resistance) were subjected to Southern blot analysis.

- 35 In fifteen out of eighteen plants, the *rhg-lyase* gene was detected. In all the other plants the gene is present in either one or two copies. Only those plants that actually produced

tubers were analysed for expression of the transgene. Therefore only RNA, isolated from 11 different lines, was used for the Northern blot analysis. RNA gel blot hybridisation with a ribosomal potato DNA fragment as a probe showed equal amounts of RNA in each lane. Hybridisation of tuber RNA using the rhamnogalacturonan-lyase probe showed a clear transcript of the gene for most of the plants (nine out of eleven). Four of these nine can be designated as high expressors, while the other five show a lower expression level, among which a further differentiation could be made. The two that did not show any hybridisation also gave a negative result in the Southern blot analysis. We did not find a clear correlation between the number of copies (one or two) of the transgene and the RNA expression level. All the lines in which expression of the transgene could be detected were used for further analysis. Enzymatic characterisation of transgenic potato plants expressing the RG-lyase showed that 3 out of 9 RG-lyase transformants showed high lyase activity (complete degradation of the substrate into oligomers), whereas the others had moderate (1 out of 9), low (2) or very low (3) activity. Furthermore, a positive correlation was found between mRNA content and enzyme activity.

The sugar composition of the tubers of the RGL transformants were found to be rather similar to that of the control plants with regard to the substrate for the rhamnogalacturonan lyase. Table 4 below provides data on analysis of total cell walls from a high and a low expressing transformant and wild type potato tubers. A reduction from 1.5 to 1 % rhamnose is indicative of a reduction in hairy region content.

Table 4. Composition of isolated cell wall, w/w% (upper panel) and mol% (lower panel) of monosaccharides in total cell walls from cv Karnico wild type and two RG-lyase expressing transformants

Sugar composition, starch and protein content in the isolated cell wall material			
% w/w	wild type	High expressor	Low expressor
Protein	8.8	10.3	8.6
Starch	3.7	1.2	1.4
Total sugar	75.0	71.0	71.0
Mol %			
Rhamnose	1.5	1.0	1.0
Arabinose	8.3	4.7	5.3
Xylose	2.5	4.1	4.1
Mannose	1.6	2.1	2.6
Galactose	22.0	4.4	5.8
Glucose	38.3	41.7	42.8
Uronic Acid	25.9	42.1	38.4
DA	35.0	18.0	19.0
DM	25.0	41.0	36.0

5

The above results might be surprising at first, especially when considering the altered phenotype of the tubers. The results can be explained as follows. The hairy regions are considered to interconnect homogalacturonan sequences in native pectin (Shols & Voragen 1996). The rhamnogalacturonan lyase attacks these interconnecting sequences, but cannot degrade the rhamnogalacturonan completely. Thus, a relatively small part of the hairy regions can escape from the cell wall as oligosaccharides released by *endo*-rhamnogalacturonan lyase. Rhamnose (indicative of rhamnogalacturonan) is a relatively minor sugar in the cell wall. Galacturonic acid is much more abundant in the cell wall, but resides for the largest part in homogalacturonan. The new cell wall phenotype is indeed an architectural rather than compositional phenotype as can be described using immunolocalization of particular epitopes in the wall as was done in Example 5. Rhamnogalacturonan side chains consisting of galactans and arabinans rely on rhamnose residues for their attachments. It is noteworthy that there are very significant reductions in both sugars indicating major architectural changes in the hairy regions leading to a sparsely substitution

10

15

with neutral sugar side chains. Immunolocalisation using arabinan and galactan antibodies in confocal microscopy corroborate the compositional analysis. Further these examinations reveal that paranchymal starch containing cells show very minor labelling for both epitopes whereas some cortical cells in the transformants label for galactans and arabi-
5 nans in cell corner reinforcements.

EXAMPLE 8

Targeting of enzyme activity to the Golgi apparatus

5 Expressing and targeting a fungal arabinanase to the apoplast following the strategies described in Example 6 for the galactanase yields viable plants of both tobacco and potato. While the tobacco plants did not display any visible phenotype, most of the potato transformants had partly dysfunctional meristems. Using the GBSS-promoter to control the arabinanase, almost all leaf axil buds had non-functional meristems. A new unbranched
10 plant architecture was thus created exemplifying the utility of the present invention also for controlling aspects of plant development.

Golgi-targeting of enzyme activity should be seen as an alternative to secretion to the apoplast (not as an intracellular site for storing enzymes in 'self processing plant material'). The strength of this technology is to be able to interfere directly with polysaccharide
15 biosynthetic processes occurring in the Golgi. The technology provides greater latitude in engineering options without compromising plant viability.

A glycosyl transferase alpha-2,6-sialyltransferase (ST) originating from rat has previously
20 been shown to be targeted to the plant cell Golgi apparatus, both alone (Wee *et al.*, 1998) and in truncated forms fused to lysozyme (Munro, 1991) or Green Fluorescent Protein (GFP) (Boevink *et al.*, 1998). Hence, this protein has been evaluated for its ability to facilitate proper Golgi retention of various heterologous proteins. The ST is a type II membrane protein (i.e. with the amino terminus located in the cytosol) consisting of a signal
25 sequence which is post-translationally cleaved of during transit into the ER, a short amino-terminal cytoplasmic domain, an uncleaved hydrophobic signal anchor directing Golgi localisation and a large catalytic lumenal domain (Weinstein *et al.*, 1987). Accordingly, the internal signal anchor should be sufficient to retain any heterologous protein N-terminally fused to this part of the ST. This has been indicated by the work of Boevink *et al.* (1998)
30 and Munro (1991), who fused 52 and 44 amino acids, respectively, of the N-terminal part of ST to chicken lysozyme (Munro 1991) and GFP (Boevink *et al.*, 1998).

The rat sialyl transferase therefore fulfills the general demands that are expected of a protein which is tightly bound to the Golgi membrane as opposed to proteins found in a soluble form in the Golgi apparatus. The soluble ones are expected to move through the Golgi
35 and periodically reside at the plasma membrane, thereby coming in direct contact with the cell wall.

To this end, the rat sialyl transferase was fused to the mature part of the *Aspergillus aculeatus* arabinanase using recombinant PCR (Higuchi 1988) and the resulting fusion introduced into the expression vectors pADAP and pPGB121s-B-B33, thereby generating two constructs with the ST-ARA fusion under control of the GBSS and patatin promoter, respectively. The constructs have been transferred into *Agrobacterium* by electroporation and the bacterial hosts used for transformation of *Nicotiana tabacum* (L.) cv. Xanthi and *Solanum tuberosum* (L.) cv. Posmo.

- 10 Using differential centrifugation it was established that major portions of the enzyme reside in the microsomal fraction. Localisation to the Golgi was demonstrated using classical organelle separation methods (Ray *et al.*, 1969, Gibeau and Carpita 1990).

- Plants harbouring the ST-ARA fusion under the control of the GBSS-promoter was analysed. Expression of active enzyme was demonstrated in tuber extracts using the arabinanase plate assay. Western blotting was used to demonstrate the association of the activity with a microsomal fraction, and following organelle separation, it could be demonstrated that the majority of the arabinanase was associated with Golgi vesicles, while no enzyme protein could be detected in the soluble apoplasmic and cytoplasmic fractions, nor in the plasma membrane. Detectable, but lower levels were observed in the endoplasmic reticulum which may well represent newly produced arabinanase in transit to the Golgi. Cross contamination of the endoplasmic reticulum fraction with small amounts of Golgi vesicles cannot be excluded. Of primary importance is that the experiments demonstrate that the arabinanase has been transformed from a soluble to a membrane bound enzyme, and that the primary target is the Golgi apparatus.

Cell walls from these tubers were analysed for the monosaccharide composition of EPG/PME extracted hairy regions as was done in Example 5. The results are summarised in the below Table 5:

30

35

Table 5. Mol% sugars in hairy regions extracted from wild type and transformants expressing an *endo*-arabinanase targeted to the Golgi

Sugar residue	Wild type	Transformant 5.2
arabinose	7.9	3.8
galactose	62.9	68.8
rhamnose	10.7	13.6
galacturonic acid	13.1	12.7
xylose	0.9	1.1
glucose	4.5	7.4

5

To summarise, expression of the arabinanase targeted to the Golgi resulted in about 50% reduction in hairy region-bound arabinose. Labeling patterns with an arabinan specific antibody observed by confocal microscopy corroborated the compositional data. This is the first example of targeted interference with complex polysaccharide biosynthetic processes in Golgi by any method.

10

EXAMPLE 9

Double construct with auxiliary enzyme

15

From *in vitro* studies it is known that the effect of rhamnogalacturonan-lyase is larger if it is used in combination with rhamnogalacturonan-acetyl esterase. Therefore, double constructs have been made to obtain expression of both these enzymes in the potato tubers, see pPGB121s-new-RHGB-RHA1 in Example 4. Potato plants have been transformed and 21 individual transgenic lines have been obtained. No important phenotypical changes were observed. However, we did expect a higher impact from the combination of these two enzymes as compared to the transformants in which only the rhg-lyase is present. As the lyase was found to be active on its own, a qualitatively similar phenotype is anticipated.

20

EXAMPLE 10

Retaining a polysaccharide-modifying enzyme in the ER

Retention in the ER will be exemplified in the following because of its relevance for 'self processing plant material' as defined herein. In a preferred embodiment of the invention, an enzyme, typically a hydrolase or a lyase, which cleaves polysaccharide backbones is retained in the ER. Upon homogenisation of the plant material the enzyme is brought into contact with the cell wall and renders soluble a component to be recovered in the supernatant fraction. ER-retention is exemplified here with reference to arabinanase; other pertinent enzymes are listed in Example 12 below.

The arabinanase, SEQ ID NO:1 from WO 94/20611, was found to be toxic to potato, at least when secreted to the apoplast (Libiakova *et al.*, 1999). Tobacco was used in the present case to demonstrate accumulation of a polysaccharide-modifying enzyme in active form in the ER. As detailed in Materials and Methods, the gene was a KDEL tagged variant of the endo-arabinanase in tobacco cv. Xanthi transformed with a pADAP-based construct harbouring an arabinanase-KDEL cDNA.

Extracts from leaves of transformed plants were evaluated for their enzyme accumulation using the plate assay (see Materials and Methods) and all successfully transformed plants also produced active arabinanase. The assay is semi-quantitative in nature but activity in crude leaf extracts was detectable (blue halos more than 1 mm wide around the punched wells holding the samples) within just 15 minutes (with some variation between transformants) indicating very significant enzyme activity. By differential centrifugation it can be demonstrated that an appreciable proportion of the enzyme is trapped in the microsomal fraction, indicating retention in the ER. Additionally the apoplastic fluid of tobacco leaves can be isolated using the method of Husted *et al.* (1995). Possible absence of appreciable arabinanase activity in the apoplastic fluid can be taken as evidence against missorting of the enzyme to the apoplastic space.

EXAMPLE 11

30 Targeting an enzyme to the vacuole

As for retention in the ER, exemplification of vacuolar targeting shall be seen in the context of "self processing plant material". A single gene-construct demonstrating targeting to an intracellular compartment has been presented in Example 3. Enzymes which are believed to be stable in the acidic environment of the vacuole may be stored in this orga-

nelle. Two general approaches are at hand: Equipping the gene of interest with a 5'-sequence from a gene whose product is accumulated there as is; or alternatively engineering the gene of interest with an N-terminal extension which will be cleaved off (partially or *in toto*) upon entry into the vacuole. The N-terminal portions of the vacuolar potato patatin protein (148 amino acids) (Sonnewald *et al.*, 1991) and the sweet potato sporamin protein (111 amino acids) (Turk *et al.*, 1997) are suitable candidates for this purpose.

In sweet potato sporamin, the vacuolar targeting information resides in the N-terminal part of the primary structure. Following cleavage of the N-terminal signal sequence, which ensures transport of the protein to ER, the pro-form is efficiently targeted to the vacuole where the pro-peptide is cleaved off (Koide *et al.*, 1997). Unlike potato patatin, where the exact localization of the vacuolar targeting determinant is known to reside in the N-terminal but where the exact localisation is unknown, the vacuolar targeting signal in sporamin is well characterized. Accordingly, sporamin is used for targeting of heterologous proteins to the plant vacuole. Following translocation into the vacuole, the majority of the sporamin part of the fusion protein will be cleaved off, thereby resulting in a heterologous protein with a higher degree of authenticity. A similar approach with patatin will result in a permanent N-terminal extension, which may lead to misfolding and activity loss of the heterologous protein.

To this end, the vacuole-directing potato patatin CDR and 111 amino acids of the sweet potato sporamin coding region were cloned and sequenced. Constructs can be generated that harbour fusions between the N-terminal of sporamin/patatin and suitable endo-polygalacturonase; see the following example. Western blot analysis can be used to verify processing upon vacuolar entry (where applicable). Evaluation of transformants parallel to what has been described for ER-retained endo-arabinanase will show accumulation of active endo-PG in the vacuole.

EXAMPLE 12

Self-processing tubers comprising double constructions expressing galactanase + endo-polygalacturonase

A double construct harbouring the galactanase destined for secretion into the apoplast as well as an *endo*-PG of fungal or plant origin targeted for internal storage can be prepared,

WO 01/59137

73

PCT/DK01/00093

see "Design of "Self processing" DNA constructs" in Example 4. The galactanase should be regarded as a place holder for any enzyme catalysing a desirable pectin tailoring *in vivo*. Plant and fungal *endo*-polygalacturonases are used to exemplify 'self processing plant material' in this example. However, it should be borne in mind that also lyases of
5 plant or microbial origin are similarly useful in this context.

Fungal *endo*-polygalacturonases are selected for their stability properties (e.g. with the acidic vacuolar environment in mind), with regard to their sensitivity to homogalacturonan decoration (acetylation in particular) and with regard to pH-optimum for catalysis. Polyga-
10 lacturonases I, II and III from *Aspergillus aculeatus*, accession number AFO74213, WO 94/14952 and WO 94/14952, cover much of the range in biochemical properties of interest, but other polygalacturonases can also be used.

Comparison of higher plant *endo*-PG protein sequences has revealed two distinct types of
15 *endo*-PGs. Those that possess a propeptide located in between the signal peptide and the mature protein and those that do not possess such a propeptide. The function of the propeptide has yet to be established.

Targeting of the double construct harbouring non-secreted *endo*-PG of the type which
20 does not possess a propeptide (modified *endo*-PG A, B, and C) can be done as already exemplified for the targeting of the *endo*-arabinanase to the ER (Example 10) and the vacuole (B and C) (Example 11). In this case, however, accumulation of the gene products in the cytoplasm is also considered (A). Wegener *et al.* (1996) describe how an *Erwinia carotovora* pectate lyase was accumulated in the cytoplasm in both leaves and tubers of
25 transgenic potatoes without detectable phenotypic changes. Expressed thermostable bacterial cellulases have also been successfully accumulated in the cytoplasm of transgenic plants. Ziegelhoffer and co-workers produced the E2 and E3 cellulases from *Thermomonospora fusca* in transgenic alfalfa, potato and tobacco, although in very limited amounts (Ziegelhoffer *et al.*, 1999). No phenotypic effect of cellulase expression was de-
30 tected.

Whereas KDEL, as described previously, retains an already translocated protein in the ER, the signal peptide is responsible for the actual translocation. Thus, in order to obtain cytoplasmic accumulation of the enzymes in question, the signal peptide has to be re-
35 moved prior to expression in the plant host. In case the signal peptide cleavage site has

not been determined by protein sequencing, determination of the most likely cleavage site can be made, for example using the neural network SignalP (Nielsen *et al.*, 1997).

The physical removal of the signal peptide is done at the DNA level by the use of PCR with primers specific for the mature part of the enzyme in question. This approach also ensures the introduction of a start codon and sequences for optimal translation of the mature part of the enzyme destined for cytoplasmatic accumulation.

Representative plant *endo*-PGs without propeptide include, but are not limited to,
10 AF128266: PG1 from *Glycine max* and U70480:TAPG2 from tomato.

Targeting of non-secreted *endo*-PG of the type which posses a propeptide (modified *endo*-PG D-I) to the cytoplasm, the ER, or the vacuole should for each compartment be accomplished by two versions of modified *endo*-PG. One series (D, F and H) where the
15 three modifications described in the previous section leave the propeptide sequence intact in front of the mature protein and one series (E, G and I) of three where the propeptide is removed, resulting in a total of six different constructs (D-I) covering three different localisations with or without propeptide included. Examples of plant *endo*-PGs with propeptide are X9500: RDPG1 from oilseed rape and P35336 from kiwi fruit. Analysis according to
20 Example 6 can be used to verify that the wall phenotype resulting from galactanase expression is as expected from the results of Examples 5 and 6. In addition, expression and accumulation of functional *endo*-polygalacturonase will be established by Northern and Western blot analysis as well as assays of polygalacturonase activity.

REFERENCES

- Baron-Epel, O., Gharyal, P.K. & Schindler, M. (1988) Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells *Planta* **175**:389-395.
- 5 Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973) *Anal. Biochem.* **54**:484-489.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* **15**:441-447
- 10 Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Betteridge, M.B., Hawes, C. (1998) Stacks on tracks: The plant golgi apparatus traffics on an ER/actin network. *Plant J.* **15**:441-447
- 15 Braccini, I., Grasso, R.P., Pérez, S., (1999) Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydr. Res.* **317**:119-130.
- Bush, M.S., McCann, M.C. (1999) Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Physiol. Plant.* **107**:201-213.
- 20 Carpita, N.C. & Gibeaut, D. M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**:1-30.
- 25 Chanliaud, E., Gidley, M. J. 1999. In vitro synthesis and properties of pectin/Acetobacter xylinus cellulose composites. *Plant J.* **20**:25-35.
- Chen, L., Carpita, N. C., Reiter, W.-D., Wilson, R. H., Jeffries, C. & McCann, M. C. 1998. A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J.* **16**:385-392.
- 30 Christgau, S., Sandal, T., Kofod, L.V. & Dalbøge, H. (1995) Expression cloning, purification and characterization of a b-1,4-galactanase from *Aspergillus aculeatus*. *Curr. Genet.* **27**:135-141
- 35 Côté, F. & Hahn, M.G. (1994) Oligosaccharins: structures and signal transduction *Plant Mol. Biol.* **26**:1379-1411.
- 40 Daas, P.J.H., Arisz, P.W., Schols, H.A., de Ruiter, G.A., Voragen, A.G.J. (1998) Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **257**:195-202.
- 45 Datla, R. S., Hammerlindl, J. K., Panchuk, B., Pelcher, L. E. & Keller, W. (1992) *Gene* **122**, 383-384. [published erratum appears in *Gene* **129**:311.
- Dhugga, K.S., Tiwari, S.C., Ray, P.M. (1997) A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved plant cell wall synthesis: Purification, gene cloning, and trans-50 Golgi localization *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:7679-7684

- Edwards, G.A., Hopher, A., Clerk, S.P. & Boulter, D. (1991) Pea lectin is correctly processed, stable and active in leaves of transgenic potato plants. *Plant Mol. Biol.* **17**:89-100
- Essl, D., Dimberger, D., Gomord, V., Strasser, R., Faye, L., Glossl, J., Steinkellner, H. (1999) The N-terminal 77 amino acids from tobacco N-acetylglucosaminyltransferase I are sufficient to retain a reporter protein in the Golgi apparatus of *Nicotiana benthamiana* cells. *FEBS Lett* **453**(1-2):169-73
- Fry, S.C. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**:165-86.
- Gibeaut, D.M., Carpita, N.C. (1990) Separation of membranes by flotation centrifugation for in vitro synthesis of plant cell wall polysaccharides *Protoplasma* **156**:82-93
- 15 Hakomori SI (1964) A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J Biochem* **55**:205-208
- Herbers, K., Wilke, I., Sonnewald, U. (1995) A thermostable Xylanase from *Clostridium thermocellum* expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco.
- 20 *Biotechnology* **13**:63-66
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research* **16**:7351-7367.
- 25 Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**:1229-1231.
- 30 Huisman, M.M.H.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J.(1999) Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal. *Carbohydrate Polymers* **38**:299-307
- Husted, S., Schjoerring, J. K. (1995). Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* **109**:1453-1460.
- 35 Kempin, S.A., Liljgren, S.J., Block, L.M., Rounsley, S.D. Yanofsky, M.F. (1997) Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* **389**:802-803.
- Jarvis, M.C., Hall, M.A., Threlfall, D.R. & Friend, J. (1981) The polysaccharide structure of potato cell walls: chemical fractionation. *Planta* **152**:93-100.
- 40 Jones, L., Seymour, G.B. & Knox, J.P. (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1,4)-b-D-galactan. *Plant Physiol* **113**:1405-1412.
- 45 Koide, Y., Hirano, H., Matsuoka, K., and Nakamura, K. (1997). The N-terminal propeptide of the precursor of sporamin acts as a vacuole-targeting signal even at the C terminus of the mature part in tobacco cells. *Plant physiol* **114**:863-870.
- 50 Kuipers, A.G.J., Jacobsen, E., and Visser, R.G.F. (1994) Formation and deposition of amylose in the potato tuber starch granule are affected by the reduction of granule-bound starch synthase gene expression. *Age Okabt /cekk* **6**:3-52

- Landsmann, J., Uhrig, H. (1985) Somoelonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. *Theor. Appl. Genet.* **71**:500-505
- 5 Lau, J.M., McNeil, M., Darvill, A.G. & Albersheim, P. (1985) Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Res.* **137**:111-125.
- Lever, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. - *Analytical Biochemistry*. **47**:273-9
- 10 Libakova, G., Skjot, M., Sørensen, S., Jørgensen, B., Ulvskov, P. (1999). Influence of constructs harbouring an arabinanase encoding cDNA on potato transformation efficiency. "From Cell to Crops". The Third International Symposium in the Series: Recent Advances in Plant Biotechnology. September 1999, Stara Lesna, Slovak Republic.
- 15 Mayer, F. (1998) Potato pulp: properties, physical modification and applications. *Polymer Degrad. and Stability* **59**:231-235.
- McCann, M. C. & Roberts, K. (1994) Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany* **45**:1683-1691.
- 20 McCann, M.C., Hammouri, M.K., Wilson, R.H., Belton, P.S. & Roberts, K. (1992) Fourier transform infrared microscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiol.* **100**:1940-1947.
- 25 Moloshok, T., Pearce, G., and Ryan, C. A. (1992). Oligouronide signaling of proteinase inhibitor genes in plants: structure-activity relationships of Di- and trigalacturonic acids and their derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**:731-734.
- 30 Munro, S. (1991). Sequences within and adjacent to the transmembrane segment of alpha-2,6-sialyltransferase specify Golgi retention. *EMBO J* **10**:3577-88.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot. Engineering* **10**:1-6.
- 35 O'Neill, M.A., Albersheim, P. & Darvill, A.G. (1990) in *The pectic polysaccharides of primary cell walls*, ed. Dey, P.M. pp. 415-441.
- 40 O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G. & Albersheim, P. (1996) Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester - In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer *J. Biol. Chem.* **271**:22923-22930.
- 45 Paulsen, B.S. (ed.) (2000) Bioactive carbohydrate Polymers. Proceedings of the phytochemical society of Europe. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Ray, P.M., Shiniger, T.L., Ray, M.M. (1969) Isolation of β -glucan synthetase particles from plant cells and identification with golgi membranes *Proc Natl Acad Sci USA* **64**:605-612
- 50 Rogers, S.O., Bendich, A.J. (1988) Extraction of DNA from plant tissues. In: Plant Molecular Biology Manual. S.B. Gelvin & R.A. Schilperoort (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. A6/1-11.

- Ryden, P., Selvendran, R.R. (1990) Structural features of cell wall polysaccharides of potato (*Solanum tuberosum*). *Carbohydr. Res.* **195**:257-272.
- 5 Sakurai, M.H., Kiyohara, H., Matsumoto, T., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y., Yamada, H. (1998) Characterization of antigenic epitopes on anti-ulcer pectic polysaccharides from *Bupleurum falcatum* L. using several carbohydrases. *Carbohydrate Res.* **311**:219-229
- 10 Salehuzzaman, S.N.I.M., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. (1992) Cloning, partial sequencing and expression of a cDNA coding for branching enzyme in cassava. *Plant Mol. Biol.* **20**:809-819
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory
- 15 Samuelsen, A.B., Lund, I., Djaromi, J.M., Paulsen, B.S., Wold, J.K., Knutsen, S.H. (1999) Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. *Carbohydraten Polymers* **38**:135-143
- 20 Samuelsen, AB, Paulsen, BS, Wold, JK, Knutsen, SH, Yamada, H. (1998) Characterisation of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers* **35**:145-153
- 25 Satoh, S. 1998. Functions of the cell wall in the interactions of plant cells: Analysis using carrot cultured cells. - *Plant Cell Physiology.* **39**:361-368.
- Selvendran, R.R., March, J.F. & Ring, S.G. (1979) Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fibre *Anal. Biochem.* **96**:282-292.
- 30 Schols, H.A., Voragen, A.G.J. (1996) Complex pectins: structure elucidation using enzymes, In Progress in Biotechnology 14 Pectins and Pectinases Eds: J. Visser and A.G.J. Voragen, Elsevier Amsterdam NL: 3-20
- 35 Sonnewald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stütt, M., and Willmitzer, L. (1991). Transgenic tobacco plants expressing yeast derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant Jour.* **1**:95-106.
- 40 Sørensen, S.O., Skjøl, M., Ulvskov, P., Dalbøge, H., Borkhardt, B. (1999). Modification of pectin by expression of a fungal endo- β -1,4-galactanase in potato. *Plant Protein Club Workshop on Plant Proteins and the Mechanical Properties of Cell Walls*, Alicante Spain. Abstract # 49
- 45 Turk, S. C. H. J., Roos, K. d., Scotti, P. A., Dun, K. v., Weisbeek, P., and Smeeckens, S. C. M. (1997). The vacuolar sorting domain of sporamin transports GUS, but not levansucrase, to the plant vacuole. *New phytol* **136**:29-38.
- 50 Visser, J., Voragen, A.G.J. (eds.) (1996) Pectins and Pectinases Progress in Biotechnology 14, Elsevier Science, Amsterdam
- Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tiss. Cult. Man.* **B5**:1-9.

- Visser, R. G. F., Stolle, A. & Jacobsen, E. 1991. Expression of a chimeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants. - *Plant Molecular Biology*. **17**:691-699.
- 5 Voragen, A.G.J., Pilnik, W., Thibault, J.-F., Axelos, M.A.V. & Renard, C.M.G.C. (1995) In *Food Polysaccharides and Their Applications*, ed. Stephen, A.M. (Marcel Dekker, Inc.): 287-339.
- Voragen, A.G.J., Schols, H.A. and Pilnik, W. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. *Food Hydrocolloids* **1** (1), 1986, 65-70.
- 10 Wee, E., Sherrier, J. D., Prime, T., and Dupree, P. (1998). Targeting of active sialyltransferase to the plant golgi apparatus. *Plant Cell* **10**:1759-1768.
- 15 Wegener, C., Bartling, S., Olsen, O., Weber, J., Wettstein, D. v. (1996) Pectate lyase in transgenic potatoes confers preactivation of defence against *Erwinia carotovora*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **49**:359-376.
- Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H., and Paulson, J. C. (1987). Primary structure of b-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH2-terminal signal anchor. *J. Biol. Chem.* **262**:17735-17743.
- 20 Yamada, H. & Kiyohara H. (1999) Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. In *Immunomodulatory Agents from Plants*, ed. Wagner, H., Birkhäuser Verlag Basel, pp 161-202
- Ziegelhoffer, T., Will, J., and Austin-Phillips, S. (1999). Expression of bacterial cellulase genes in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.) and 30 *Nicotiana tabacum* L.). *Mol. Breed.* **5**:309-318.

WO 01/59137

80

PCT/DK01/00093

CLAIMS

1. A method for providing a transgenic plant material that, relative to the wild type state, is modified in a complex cell wall polysaccharide structure, the modification being at least one of the overall glycosidic linkage pattern and the monosaccharide profile, the method comprising
- (i) providing a nucleic acid construct comprising a nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell, results in an altered production of at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme,
- (ii) transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and
- (iii) deriving from said transformed plant cell a plant cell culture, a plant tissue or a transgenic plant in which the production of the at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is altered
- to obtain transgenic plant cells, plant tissues or plants in which the targeted substrate cell wall polysaccharide, relative to the wild type plant, is modified to have a monosaccharide profile where the proportion of at least one monosaccharide is changed by at least 10% or the proportion of at least one glycosidic linkage is changed by at least 10%.
2. A method according to claim 1 wherein the nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell, results in an altered production of at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme is a sequence coding for such an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide.
3. A method according to claim 2 wherein the coding sequence is operably linked to a promoter directing the expression of the coding sequence.
4. A method according to claim 1 wherein the at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, the production of which is altered, is an endogenous enzyme.
5. A method according to claim 4 wherein the nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell results in an altered production of at least one

WO 01/59137

81

PCT/DK01/00093

target cell wall polysaccharide-modifying enzyme is a sequence that modulates the expression of an endogenous sequence coding for an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide.

- 5 6. A method according to claim 5 wherein the sequence that modulates the expression of an endogenous sequence coding for an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide is a sequence coding for an antisense sequence that reduces the expression of a repressor or reduces the production of an inhibitor of the endogenous target cell wall polysaccharide-modifying enzyme.

10

7. A method according to claim 5 wherein the sequence that modulates the expression of an endogenous sequence coding for an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide is a sequence that, following a recombination event, causes the insertion of a new or modified promoter operably linked to the endogenous target cell wall-
15 modifying enzyme, said promoter is capable of directing the expression of the coding sequence for the cell wall-modifying enzyme.

8. A method according to claim 4 wherein the nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell results in an altered production of at least one
20 target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, is a sequence that, following a recombination event, causes the expression of an endogenous sequence coding for an enzyme that is capable of modifying the targeted cell wall polysaccharide to be targeted to a different location.

- 25 9. A method according to claim 2 in which the polysaccharide-modifying enzyme is of microbial or fungal origin.

10. A method according to any of claims 1-6 and 9 wherein the nucleic acid construct is a viral vector that, following introduction into a plant cell, is not integrated into the genome of
30 the cell.

11. A method according to claim 3 wherein the promoter is derived from a plant.

12. A method according to claim 11 wherein the promoter is a tissue or organ specific promoter including a storage organ specific promoter.
13. A method according to claim 12 wherein the promoter is a promoter capable of directing expression in potato tubers including a promoter selected from the group consisting of the granule bound starch synthase (GBSS) promoter and the B33 promoter.
14. A method according to any of claims 1-13 wherein the targeted complex cell wall polysaccharide is selected from the group consisting of a pectin and a hemicellulosic polysaccharide.
15. A method according to any of claims 1-14 wherein the polysaccharide-modifying enzyme is selected from the group consisting of an *endo*-rhamnogalacturonan hydrolase, an *endo*-rhamnogalacturonan lyase, an *endo*-galactanase, an *endo*-arabinanase, an arabinofuranosidase, a galactosidase such as a beta-galactosidase, a xylosidase and an exo-galacturonase and an ortholog or isoform hereof.
16. A method according to any of the preceding claims wherein the nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell, results in an altered production of at least one target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, is sufficiently different from endogenous genes of the host plant so that co-suppression will not occur.
17. A method according to any of the preceding claims in which an auxiliary enzyme is co-expressed with the target cell wall polysaccharide-modifying enzyme, wherein co-expression facilitates access of the polysaccharide-modifying enzyme to its substrate.
18. A method according to claim 17 wherein the auxiliary enzyme is selected from the group consisting of an esterase, including a methyl esterase and an acetyl esterase, and a glycosidase that removes single monosaccharides from polymers, such as an arabinofuranosidase, a galactosidase, a xylosidase or a fucosidase.
19. A method for modifying the biosynthesis in a plant cell of at least one complex cell wall polysaccharide to obtain a transgenic plant material that, relative to the wild type state, is modified in a complex cell wall polysaccharide structure, the modification being at

WO 01/59137

83

PCT/DK01/00093

least one of the overall glycosidic linkage pattern and the monosaccharide profile, the method comprising

(i) providing a nucleic acid construct comprising a nucleotide sequence, the expression of which in a plant cell results in that at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to a compartment in the plant cell where it is not normally present or in that the expression of a polypeptide naturally produced in the plant cell and affecting the biosynthesis of a cell wall polysaccharide is changed,

10 (ii) transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and

(iii) deriving from said transformed plant cell a plant cell culture, a plant tissue or a transgenic plant in which the at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme, relative to the wild type plant, occurs in a different compartment.

15

20. A method according to claim 19 wherein the obtained transgenic plant cells, plant tissues or plants in which the targeted substrate cell wall polysaccharide, relative to the wild type plant, is modified to have a monosaccharide profile where the proportion of at least one monosaccharide is changed by at least 10% or the proportion of at least one glycosidic linkage is changed by at least 10%.

20

21. A method according to claim 19 wherein the at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to the Golgi apparatus including membrane vesicles fusing with or budding off from the Golgi stacks.

25

22. A method according to claim 21 wherein the nucleotide sequence, the expression of which in a plant cell results in that at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to the Golgi apparatus is a sequence coding for a chimeric gene product comprising the at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme and a sequence capable of targeting the chimeric gene product to the Golgi.

30

23. A method according to 22 wherein the targeting sequence is a type II membrane anchored Golgi protein or a fragment thereof or a soluble Golgi targeted protein or a fragment thereof.

35

24. A method according to claim 23 wherein the soluble Golgi targeted protein is *Pisum sativum* reversibly glycosylatable polypeptide (RGP1).
25. A method according to claim 23 wherein the type II membrane anchored Golgi protein is selected from the group consisting of a sialyl transferase, a N-acetylglucosaminyl-transferase, a fucosyl transferase, a xylosyl transferase and a galactosyl transferase.
26. A method according to any of claims 19-25 wherein the nucleotide sequence, the expression of which in a plant cell results in that at least one cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to a compartment in the plant cell where it is not normally present, is operably linked to a promoter in the genome of the plant cell into which it is introduced.
27. A method for providing a transgenic plant comprising parts in which at least one complex cell wall polysaccharide can be enzymatically processed after harvest by an enzyme present in the plant material itself, the method comprising
- (i) providing a nucleic acid construct comprising a nucleotide sequence, which, following the introduction of the construct into a plant cell, causes a cell wall polysaccharide-modifying enzyme to be expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment or the expression of a cell wall polysaccharide-modifying enzyme in a form that is inactive under *in vivo* conditions but can be activated after harvest of plant material derived from the plant cell,
- (ii) transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and
- (iii) deriving from said transformed plant cell a transgenic plant material in which, under appropriate post harvest conditions, the at least one complex cell wall polysaccharide can be enzymatically processed after harvest by bringing the at least one complex cell wall polysaccharide into contact with the cell wall polysaccharide-modifying enzyme that is expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment or by subjecting the harvested plant material to conditions under which the enzyme being expressed in an *in vivo* inactive form is activated.

28. A method according to claim 27 wherein the nucleotide sequence, which, following the introduction of the nucleic acid construct into a plant cell, causes a cell wall polysaccharide-modifying enzyme to be expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment is a sequence causing the cell wall polysaccharide-modifying enzyme to be targeted during growth of the plant to a cell compartment selected from the group consisting of a vacuole, the endoplasmic reticulum, the cytoplasm and a plastid.

29. A method according to claim 28 wherein the cell wall polysaccharide-modifying enzyme caused to be expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment is encoded by a sequence comprised in the nucleic acid construct that is introduced into the plant cell.

30. A method according to claim 28 wherein the cell wall polysaccharide-modifying enzyme caused to be expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment is encoded by an endogenous sequence present in the genome of the cell into which the nucleic acid construct is introduced.

31. A method according to any of claims 27-30 wherein the cell wall polysaccharide-modifying enzyme is selected from the group consisting of an *endo*-polygalacturonase, an *endo*-pectin lyase, a pectate lyase, a rhamnogalacturonan hydrolase, a rhamnogalacturonan lyase, an *endo*-glucanase, an *endo*-xylanase and an isoform or ortholog hereof.

32. A method according to any of claims 27-31 wherein expression of the cell wall polysaccharide-modifying enzyme is directed by a plant promoter.

33. A method according to any of claims 27-32 wherein the at least one complex cell wall polysaccharide that can be enzymatically processed after harvest by an enzyme present in the plant material itself is selected from the group consisting of a pectin and a hemicellulosic polysaccharide.

34. A method according to claim 33 wherein the post harvest processing of pectin is in the regions between rhamnogalacturonan and homogalacturonan regions.

35. A method according to any of claims 27-34 wherein the plant cell is further transformed with a nucleic acid sequence causing an enzyme that is capable of *in vivo* modification.

WO 01/59137

86

PCT/DK01/00093

fyng the structure of at least one complex cell wall polysaccharide including a cell wall polysaccharide that can be enzymatically processed after harvest by an enzyme present in the plant material itself to be expressed.

- 5 36. A method according to claim 35 wherein the nucleic acid sequence causing an enzyme that is capable of *in vivo* modifying the structure of at least one complex cell wall polysaccharide to be expressed is a sequence coding for a cell wall polysaccharide-modifying enzyme.
- 10 37. A method according to claim 36 wherein the nucleic acid sequence causing an enzyme that is capable of *in vivo* modifying the structure of at least one complex cell wall polysaccharide is a sequence coding for a product that affects the expression of an endogenous sequence coding for a cell wall polysaccharide-modifying enzyme.
- 15 38. A method according to claim 36 or 37 wherein the cell wall polysaccharide-modifying enzyme is targeted to the apoplast.
39. A method according to any of claims 35-38 wherein the enzyme that is capable of *in vivo* modifying the structure of at least one complex cell wall polysaccharide is selected
- 20 from the group consisting of an *endo*-rhamnogalacturonan hydrolase, an *endo*-rhamnogalacturonan lyase, an *endo*-galactanase, an *endo*-arabinanase, an arabinofuranosidase, a galactosidase such as a beta-galactosidase, a xylosidase and an *exo*-galacturonase and an ortholog or isoform hereof.
- 25 40. A method of providing a plant cell wall polysaccharide material having, relative to the wild type state, a modified structure and composition, the method comprising:
- (i) providing transgenic plants using a method according to any of claims 28-39,
- 30 (ii) cultivating and harvesting said plants and isolating herefrom parts in which at least one complex cell wall polysaccharide can be enzymatically processed after harvest by an enzyme present in the plant material itself,
- (iii) subjecting said parts to conditions where the cell wall polysaccharide-modifying enzyme expressed in a non-apoplastic or non-Golgi compartment is brought into contact
- 35

WO 01/59137

87

PCT/DK01/00093

with its cell wall polysaccharide substrate or the cell wall polysaccharide-modifying enzyme expressed in a form that is inactive under *in vivo* conditions becomes activated to obtain a modified cell wall polysaccharide, and

5 (iv) isolating the modified cell wall polysaccharide material.

41. A method according to claim 40 wherein the obtained modified cell wall polysaccharide in the material as obtained is modified to have a monosaccharide profile where the proportion of at least one monosaccharide is changed by at least 10% or the proportion of
10 at least one glycosidic linkage is changed by at least 10%.

42. A method according to claim 40 or 41 wherein the plant parts in which at least one complex cell wall polysaccharide is enzymatically processed after harvest by an enzyme present in the plant material itself is a potato plant part.

15 43. A method according to any of claims 39-42 wherein the cell wall polysaccharide that is post harvest modified is pectin.

44. A plant cell wall polysaccharide material having, relative to the wild type state, a modified structure and composition, said material is obtained by the method of any of claims
20 39-43.

45. A transgenic plant or progeny of the plant or part thereof obtained by the method of any of claims 1-18.

25 46. A plant cell wall polysaccharide-containing material obtained from the transgenic plant or progeny or part according to claim 45.

47. A plant cell wall polysaccharide-containing material according to claim 46 which, relative to a material containing the corresponding wild type cell wall polysaccharide, has at
30 least one altered functional characteristic.

48. A plant cell wall polysaccharide-containing material according to claim 47 where the altered functional characteristic is selected from the group consisting of pharmaceutical

WO 01/59137

88

PCT/DK01/00093

activity, water binding capacity, processibility, gelling property, thickening property and digestibility.

49. Use of the transgenic plant or progeny of the plant or part thereof according to claim
5 45 or the plant cell wall polysaccharide-containing material according to any of claims 46-48 in the manufacturing of a product selected from the group consisting of a food product, a feed product, a pharmaceutical or medical product and a cosmetic products.

50. A pharmaceutical or medical product comprising a plant cell wall polysaccharide-con-
10 taining material according to any of claims 46-48, including a product selected from the group consisting of a pharmaceutical composition, an implant material, a medical device, a wound dressing and a surgical adhesive.

51. A transgenic plant or progeny of the plant or part thereof obtained by the method
15 according to any of claims 19-39.

52. A plant cell wall polysaccharide-containing material obtained from the transgenic plant or progeny or part according to claim 51.

20 53. A plant cell wall polysaccharide-containing material according to claim 52 which, relative to a material containing the corresponding wild type cell wall polysaccharide, has at least one altered functional characteristic.

54. A plant cell wall polysaccharide-containing material according to claim 53 where the
25 altered functional characteristic is selected from the group consisting of pharmaceutical activity, water binding capacity, processibility, gelling property, thickening property and digestibility.

55. Use of the transgenic plant or progeny of the plant or part thereof according to claim
30 51 or the plant cell wall polysaccharide-containing material according to any of claims 52-54 in the manufacturing of a product selected from the group consisting of a food product, a feed product, a pharmaceutical or medical product and a cosmetic products.

56. A pharmaceutical or medical product comprising a plant cell wall polysaccharide-con-
35 taining material according to any of claims 52-54, including a product selected from the

WO 01/59137

89

PCT/DK01/00093

group consisting of a pharmaceutical composition, an implant material, a medical device, a wound dressing and a surgical adhesive.

57. A method of producing a material comprising a complex plant cell wall polysaccharide
5 having, relative to the corresponding cell wall polysaccharide in the wild type state, a modified structure and/or a modified composition, the method comprising

(i) providing a cultivatable transgenic plant using a method according to any of claims 1-18 and 19-39 or a cultivatable progeny hereof,

10

(ii) cultivating said transgenic plant or progeny under appropriate plant cultivation conditions to obtain a plant material comprising at least one complex cell wall polysaccharide having a modified structure and/or modified composition, and

15 (iii) isolating from the cultivated plants the material comprising the modified cell wall polysaccharide.

58. A method according to claim 57 wherein the plant or progeny that is cultivated is a potato plant.

20

59. A method according to claim 57 or 58 wherein the material isolated from the cultivated plants comprises a cell wall polysaccharide that, relative to the wild type plant, is modified to have a monosaccharide profile where the proportion of at least one monosaccharide is changed by at least 10% or the proportion of at least one glycosidic linkage is changed by
25 at least 10%.

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

1/3

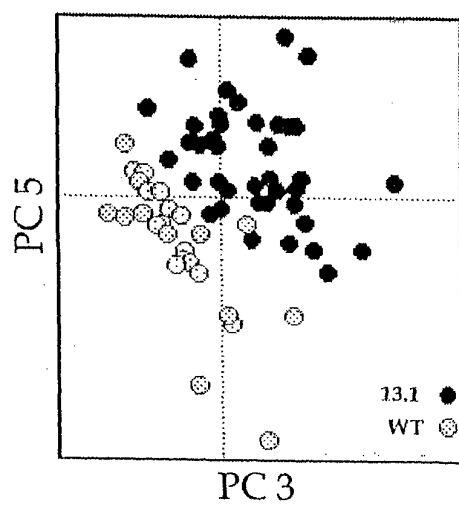


Fig. 1

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

2/3

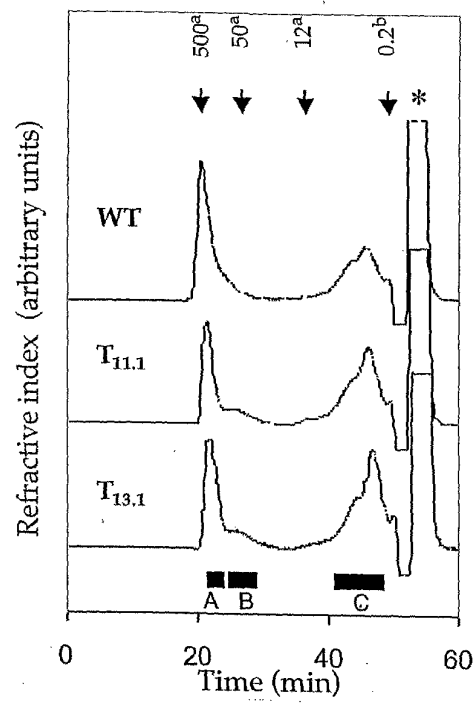


Fig. 2

WO 01/59137

PCT/DK01/00093

3/3

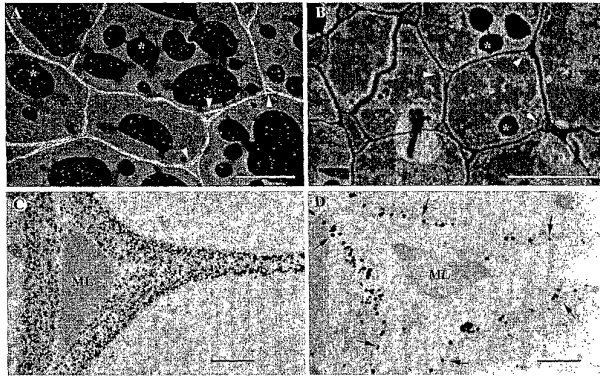


Fig. 3

WO 01/59137

1

PCT/DK01/00093

SEQUENCE LISTING

5 <110> Peter Ulskov
 Henk Shols
 Richard Visser
 Bernhard Borkhardt
 Susanne O. Sørensen
 Ronald Oomen
 10 Jean-Paul Vincken
 Maureen McCann
 Michael Skjøl
 Max Bush
 Chantal Doeswijk Voragen
 15 Gerrit Beldman

 <120> Method for remodelling cell wall polysaccharide
 structures in plants
 20
 <130> 24017 PC 1

 <150> EP00610020.0
 <151> 2000-02-10
 25
 <160> 17

 <170> FastSEQ for Windows Version 3.0
 30
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 35
 <220>
 <223> Primer used for amplification of the granule
 starch synthase promoter region from the vector
 pFGB121s
 40
 <400> 1
 gattacgcca agctttaacg 20

 <210> 2
 <211> 32
 45 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer used for amplification of the granule
 starch synthase promoter region from the vector
 pFGB121s
 50
 <400> 2
 ggtttgcga cgaaatcaga aataattgga gg 32
 55
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

WO 01/59137

2

PCT/DK01/00093

<220>
 <223> Oligonucleotide used for the production of DNA
 construct pGB121s-B
 5
 <400> 3
 tcgaccggta cctaggcccg g 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10
 <220>
 <223> Oligonucleotide used for the production of DNA
 construct pGB121s-B
 15
 <400> 4
 gatcccgggc ctaggtaccg g 21
 <210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 <223> Oligonucleotide used for the production of DNA
 construct pGED
 25
 <400> 5
 tcgacaagct ttctagagcc tcgagg 26
 <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30
 <220>
 <223> Oligonucleotide used for the production of DNA
 construct pGED
 35
 <400> 6
 gatccctcga ggctctagaa agcttg 26
 <210> 7
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> Oligonucleotide used for the production of the DNA
 construct pADAF
 45
 <400> 7
 tcgaccggta ccaagcttgc gggctctaga ctcgagccta ggcgcg 47
 <210> 8
 <211> 47
 <212> DNA

WO 01/59137

3

PCT/DK01/00093

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide used for the production of the DNA
 5 construct pADAF
 <400> 8
 gatcccgggc ctaggtcga gtctagagcc cgaagcttg gtaccgg 47
 10 <210> 9
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Oligonucleotide used for the production of DNA
 construct pGB121s-B-B33
 <400> 9
 20 aattcaagct tg 12
 <210> 10
 <211> 12
 <212> DNA
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide used for the production of DNA
 construct pGB121s-B-B33
 30 <400> 10
 aattcaagct tg 12
 <210> 11
 35 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> GBSSpro primer used for the amplification of the
 arabinanases encoding cDNA
 <400> 11
 45 acagctcaac aagtggtaac 20
 <210> 12
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 50 <220>
 <223> ARA-KDEL primer2 used for the amplification of the
 arabinanases encoding cDNA
 55 <400> 12
 gacttctcga gtggctggcc tgttgtgaag gatgaacttt agtctagaaa tgctc 55
 <210> 13
 <211> 28

WO 01/59137

4

PCT/DK01/00093

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ST SOE FWD primer used for the production of DNA
 construct pADA/ST-ARA
 5
 <400> 13
 gaagaagctt atgattcata ccaacttg 28
 10
 <210> 14
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> ST SOE REV primer used for the production of DNA
 construct pADA/ST-ARA
 20
 <400> 14
 ggagccgggg ttggcgtagg ccactttctc ctggctc 37
 <210> 15
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 25
 <220>
 <223> ARA SOE FWD primer used for the production of DNA
 construct pADA/ST-ARA
 30
 <400> 15
 gagccaggag aaagtggcct acgccaaccc cggtccc 37
 35
 <210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> ARA SOE REV primer used for the production of DNA
 construct pADA/ST-ARA
 45
 <400> 16
 cagtctagac tacacaacag gccagcc 27
 <210> 17
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 50
 <220>
 <223> Oligonucleotide self-annealed and ligated into the
 EcoRI restricted pBI221 vector, creating the
 vector pBI221-2HindIII
 55
 <400> 17
 aattaagctt 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DK 01/00093
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/82 A61L27/20		
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) IPC 7 C12N A61L		
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 practical, search terms used) EPO-internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 08299 A (ICI PLC) 13 June 1991 (1991-06-13) abstract disclosure examples 1-5 claims.	1-20
X	WO 99 07857 A (DOMINGO CARRASCO CONCEPCION ; ROBERTS KEITH (GB); PLANT BIOSCIENCE) 18 February 1999 (1999-02-18) abstract disclosure examples	1-20
X	WO 93 13212 A (ICI LTD) 8 July 1993 (1993-07-08) the whole document	1-20
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April 2001		Date of mailing of the international search report 14/05/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Panzica, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Application No. PC I / UK 01/00093
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 786 470 A (GREENSHIELDS RODERICK ET AL) 28 July 1998 (1998-07-28) abstract description examples	50
Y	WO 94 20611 A (CHRISTGAU STEPHAN ; HELDT HANSEN HANS PETER (DK); KAUPPINEN MARKUS) 15 September 1994 (1994-09-15) cited in the application disclosure examples abstract claim 10	1-49
Y	WO 95 23227 A (ZENECA LTD ; BIRD COLIN ROGER (GB); BURRIDGE BRETT ERIC (GB); TUCKE) 31 August 1995 (1995-08-31) the whole document	1-50
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 02, 31 March 1995 (1995-03-31) & JP 06 329546 A (KAO CORP), 29 November 1994 (1994-11-29) abstract	50
Y	DHUGGA KANWARPAL S ET AL: "A reversibly glycosylated polypeptide (RGPI) possibly involved in plant cell wall synthesis: Purification, gene cloning, and trans-Golgi localization." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 94, no. 14, 1997, pages 7679-7684, XP002165565 1997 ISSN: 0027-8424 the whole document	21-24

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/DK 01/00093	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9108299 A	13-06-1991	AT 140977 T	15-08-1996		
		AU 646422 B	24-02-1994		
		AU 6974591 A	26-06-1991		
		BR 9007881 A	29-09-1992		
		CA 2069437 A	31-05-1991		
		DE 69027996 D	05-09-1996		
		DE 69027996 T	09-01-1997		
		EP 0502995 A	16-09-1992		
		ES 2090304 T	16-10-1996		
		JP 5504056 T	01-07-1993		
		JP 3074018 B	07-08-2000		
		US 5413937 A	09-05-1995		
		US 5296376 A	22-03-1994		
		ZA 9009614 A	30-10-1991		
WO 9907857 A	18-02-1999	AU 8639098 A	01-03-1999		
WO 9313212 A	08-07-1993	AU 3166693 A	28-07-1993		
		EP 0637338 A	08-02-1995		
		US 5659121 A	19-08-1997		
US 5786470 A	28-07-1998	GB 2261671 A,B	26-05-1993		
		US 6033712 A	07-03-2000		
		US 6174549 B	16-01-2001		
		AT 189820 T	15-03-2000		
		AU 2933592 A	15-06-1993		
		AU 2948892 A	15-06-1993		
		BG 63014 B	31-01-2001		
		BG 98769 A	30-06-1995		
		CA 2123602 A	27-05-1993		
		CA 2123613 A	27-05-1993		
		DE 69230690 D	23-03-2000		
		DE 69230690 T	08-06-2000		
		DE 69231698 D	29-03-2001		
		DK 612326 T	05-06-2000		
		EP 0646135 A	05-04-1995		
		EP 0612326 A	31-08-1994		
		EP 0990443 A	05-04-2000		
		ES 2141729 T	01-04-2000		
		FI 942245 A	13-05-1994		
		WO 9310157 A	27-05-1993		
		WO 9310158 A	27-05-1993		
		GR 3033214 T	31-08-2000		
		HU 67479 A,B	28-04-1995		
		JP 7501216 T	09-02-1995		
		JP 7502057 T	02-03-1995		
		NO 941813 A	13-05-1994		
		RO 113041 B	30-03-1998		
		US 5530112 A	25-06-1996		
		US 5633032 A	27-05-1997		
		US 5876779 A	02-03-1999		
		ZA 9208825 A	21-06-1993		
WO 9420611 A	15-09-1994	AU 6202894 A	26-09-1994		
		EP 0687297 A	20-12-1995		
WO 9523227 A	31-08-1995	AU 690962 B	07-05-1998		
		AU 1713295 A	11-09-1995		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/DK 01/00093	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9523227	A	CA 2180003 A	31-08-1995		
		EP 0746617 A	11-12-1996		
		JP 9509322 T	22-09-1997		
		US 5910632 A	08-06-1999		
JP 06329546	A	29-11-1994	NONE		

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/732	A 6 1 K 31/736	4 C 0 8 1
A 6 1 K 31/736	A 6 1 K 35/78	X 4 C 0 8 6
A 6 1 K 35/78	A 6 1 L 27/00	V 4 C 0 8 8
A 6 1 L 15/16	A 6 1 L 31/00	T
A 6 1 L 26/00	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 L 27/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 L 28/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 L 31/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 17/02	C 1 2 P 19/04	Z
A 6 1 P 29/00	A 2 3 L 1/04	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 L 15/01	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 L 25/00	S
C 1 2 P 19/04	A 6 1 L 25/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 ショルス, ハンク
オランダ、エヌエルー 6 7 0 7 エイチジー ワゲニンゲン、ヘイズカン 2 ビー
- (72)発明者 ヴィゼール, リカルド
オランダ、エヌエルー 6 7 2 1 イーティ ベネコム、エンマラーン 1 7
- (72)発明者 ボークハルト, ベルナルド
デンマーク、ディケイー 3 5 2 0 ファルム、リンデガルスベイ 2 7
- (72)発明者 ソレンセン, スサンス, オー.
デンマーク、ディケイー 2 6 6 5 ヴァレンスバーク ストランド、ヒッテランデン 1
- (72)発明者 オーメン, ロナルド
オランダ、エヌエルー 8 0 1 7 ケイエイチ ウォール、コッジカデ 1 1 4
- (72)発明者 ヴィンケン, ジャンーポール
オランダ、エヌエルー 6 8 7 1 ゼットエス レンカム、ウィレブロードウェグ 2 3
- (72)発明者 スクジョ, ミハエル
デンマーク、ディケイー 2 6 4 0 ヘデハウゼン、バルデルスブロンド バイ、エル. エー. リングス ヴァング (番地なし)
- (72)発明者 ヴォラゲン, カントル, ダズウィク
オランダ、エヌエルー 6 7 0 8 ケイエエル ワゲニンゲン、ログルスト 2 8 3
- (72)発明者 ベルトマン, ゲリット
オランダ、エヌアイー 6 7 0 8 エスエル ワゲニンゲン、レオナルド ロッジヴィーンストラート 6 7

F ターム (参考) 2B030 AA02 AB03 AD08 CA06 CA17 CA19 CB03 CD07 CD09
4B018 LB03 LB07 LE04 MD39 ME12
4B024 AA01 AA03 AA05 AA08 BA07 BA79 BA80
4B041 LC03 LC05 LD01 LH05
4B064 AF11 CA11 CA19 CC24 DA01 DA10 DA11
4C081 AA01 AA12 AB11 AB25 AC01 CD011 DA02
4C086 AA01 AA03 EA20 GA02 MA01 MA04 MA34 MA63 MA67 NA14

	ZA89	ZB02	ZB11	ZB26						
4C088	AB12	AB48	AB49	AC01	AC05	AC13	BA12	MA34	MA63	MA67
	NA14	ZA89	ZB02	ZB11	ZB26					