(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6316810号
(P6316810)

(45)発行日　平成30年4月25日(2018.4.25)　(24)登録日　平成30年4月6日(2018.4.6)

(51)Int.Cl.		F I		
C12P 7/22	(2006.01)	C12P	7/22	ZNA
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
A01H 5/00	(2018.01)	A01H	5/00	A
A01H 6/60	(2018.01)	A01H	6/60	
C07D 311/62	(2006.01)	C07D	311/62	

請求項の数 7　(全 35 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-524459(P2015-524459)
(86)(22)出願日　平成25年7月26日(2013.7.26)
(65)公表番号　特表2015-529455(P2015-529455A)
(43)公表日　平成27年10月8日(2015.10.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/052174
(87)国際公開番号　WO2014/018822
(87)国際公開日　平成26年1月30日(2014.1.30)
審査請求日　平成28年7月25日(2016.7.25)
(31)優先権主張番号　61/675,869
(32)優先日　平成24年7月26日(2012.7.26)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　515022098
カサルカ　ソシエダ　アノニマ
ＣａｓａＬｕｋｅｒ　Ｓ．Ａ．
コロンビア共和国　ボゴタ，カジェ　１３，ヌメロ　６８－９８
(73)特許権者　515022102
クエロ　レンジフォ，ラウル
ＣＵＥＲＯ　ＲＥＮＧＩＦＯ，Ｒａｕｌ
アメリカ合衆国　テキサス州　７７４３３，サイプレス，プレーリーヴィレッジ　７２１９
(74)代理人　110001302
特許業務法人北青山インターナショナル

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａｃａｃａｏ）からのフェノール化合物の生成を増大させる方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ココアカルスからの１つまたは複数のフェノール化合物の生成を高める方法であって、前記方法が、カルスをＤＮＡによって形質転換された宿主細胞に接触させるステップを含んでなり、
前記ＤＮＡコンストラクトが、５’から３’に向けて、遺伝子要素：
（１）配列番号１と少なくとも９０％の相同性を有するＰＡＬプロモーター；
（２）ヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアーリアーゼを発現する配列番号５と少なくとも９０％の相同性を有する遺伝子；および
（３）配列番号１１と少なくとも９０％の相同性を有するリボソームスイッチ；
をこの順で含んでなり、
前記宿主細胞が、バチルス・プミルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｕｍｉｌｕｓ）、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）またはサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）を含んでなる
ことを特徴とする方法。
【請求項２】
請求項１に記載の方法において、前記ＤＮＡコンストラクトがプラスミド中にあることを特徴とする方法。
【請求項３】
請求項１に記載の方法において、前記ＤＮＡコンストラクトがＰＢＳＫＩＩ中にあるこ

とを特徴とする方法。
【請求項４】
請求項１乃至３の何れか一項に記載の方法において、前記カルスが、前記宿主細胞との接触に先だってキトサン中で培養されることを特徴とする方法。
【請求項５】
請求項４に記載の方法において、前記キトサンが、６０％～１００％アセチル化されていることを特徴とする方法。
【請求項６】
請求項４に記載の方法において、前記キトサンが、３～２０個のグルコサミン単位および／またはＮ－アセチルグルコサミン単位を含んでなることを特徴とする方法。
【請求項７】
ＤＮＡによって形質転換された宿主細胞を含んでなるココアカルスであって、
前記ＤＮＡコンストラクトが、５’から３’に向けて、遺伝子要素：
（１）配列番号１と少なくとも９０％の相同性を有するＰＡＬプロモーター；
（２）ヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアーリアーゼを発現する配列番号５と少なくとも９０％の相同性を有する遺伝子；および
（３）配列番号１１と少なくとも９０％の相同性を有するリボソームスイッチ；
をこの順で含んでなり、
前記宿主細胞が、バチルス・プミルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｕｍｉｌｕｓ）、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）またはサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）を含んでなる
ことを特徴とするココアカルス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願特許請求は、その内容全体を参照によって本明細書に援用する、２０１２年７月２６日に出願された米国仮出願第６１／６７５，８６９号明細書の優先権を主張する。
【０００２】
配列表の相互参照
本明細書に記載される遺伝子要素は、配列識別子番号（配列番号）によって参照される。配列番号は、配列表の配列識別子＜４００＞１、２＜４００＞などに、数値的に対応する。コンピューター可読形式（ＣＦＲ）で既述された配列表は、参照によってその内容全体を援用する。
【背景技術】
【０００３】
組織培養は、新しい植物品種の増殖、倍加半数体の作成、冷凍保存、希少な絶滅危惧植物の保存、繁殖困難な植物の栽培、および二次代謝産物と遺伝子組換え植物の生産で使用される。組織培養は、作物植物および果樹の育成のための高品質の無病植物材料の生産に、重点的に取り組んでいる。しかし依然として、改良された植物の植物育種と迅速な生産のための、高品質植物材料の生産および流通には大きな問題がある。目下、組織培養は、林業および農業で幅広い用途がある技術である大規模植物繁殖および微細繁殖のために、特に使用されている。世界中で数百の商業的微細繁殖研究所が、目下、所望の品種および局所微生物叢の多数のクローンを繁殖させている（ＩＡＥＡ，２００４）。
【０００４】
一般市民の間では、植物の形質転換に関して、特に環境問題を非常に懸念する人々によって、異なる意見が確立されている。対照的に、科学者は、特定の標的遺伝子変化によって生じる植物が、育種および選択プロセスによって開発された植物と、識別不能であることを認識する。唯一の違いは、遺伝子修飾が無作為でなく指向性であり得るために、標的植物を改変する過程が、大幅に加速され得ることである。相同組換えによる指向性改変は

、相同組換え依存性遺伝子ターゲッティング（ｈｒｄＧＴ）で試験されている（Ｄｏｅｔｓｃｈｍａｎら，１９８７）（Ｇｕｐｔａ　＆　Ｄｈｕｇｇａ，２０１０）。この取り組みの問題は、非正統的組換えによる無作為の挿入速度と比較した相同組換えの相対速度が、動物細胞よりも植物細胞でより低いことである。植物細胞中における外来遺伝子の発現によって、この制限に対処する努力がなされている。これらの方法の効果的な遺伝子ターゲティングにおける成功は、限定的であった。さらにこれらの改変細胞を使用して相同組換えをもたらしても、結果として生じた改変細胞は、相同組み換え体を選択するのに使用された外来性遺伝子を依然として含み、したがって規制当局および環境を懸念する人々や団体によって、依然として遺伝子改変植物と見なされる。

【０００５】

相同組換えを伴わないその他の方法、および特異的組換え部位およびトランスポゾンに由来するリコンビナーゼの利用が、国際公開第０１／８５９６９号パンフレットおよび国際公開第９９／２５８２１号パンフレットに記載される。このアプローチの問題は、オリゴヌクレオチドの混合構造が、ゲノム組み込みによる組換えを妨げるおそれがあることである。

【０００６】

植物を遺伝的にハイブリダイズする最も一般的な技術の１つは、プラスミド保有アグロバクテリウム・ツメファシェンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）の使用である。Ａ．ツメファシェンス（Ａ．ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）プラスミドの生活環の一部は、植物の感染に関与する。Ａ．ツメファシェンス（Ａ．ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）は、植物細胞核に一本鎖形態のプラスミドを導入する。組換えＡ．ツメファシェンス（Ａ．ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）プラスミドを使用して、植物細胞に外来性ＤＮＡを導入し得る。

【０００７】

異なる細菌プラスミド遺伝子処理が、利用されている。例えば単純なＤＮＡ組換えプラスミド、または相同組換えを確実にするための特定の遺伝子カセットを保持するプラスミドが、使用されている。この方法によってハイブリダイズされた植物は、遺伝子改変生物（ＧＭＯ）に分類されて、食品および製薬産業では依然として問題である。

【０００８】

植物転写因子をコードする核酸を使用して、遺伝子組換え植物のサイズおよび収量を増大させ、ならびに植物の開花を遅延させる方法が確立されている（米国特許第７，８５８，８４８号明細書）。しかしこれらの方法もまた、植物を遺伝的に形質転換することを伴う。さらに二次代謝産物の抽出には、通常、最初に、大量の植物バイオマスまたは材料が必要である。一般に植物代謝産物の抽出は、農耕実施、化学物質の使用、および時間がかかり高価である抽出法を要する、大量の新鮮バイオマス材料から実施される。

【発明の概要】

【０００９】

本明細書に記載されるのは、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）からのフェノール化合物の生成を高める方法である。例えば本明細書に記載される装置および方法は、工業的および経済的価値がある、ココア植物からのフェノール化合物の生産を増大させる。装置および方法によって生産されるフェノール化合物は、従来のまたは商業的方法において一般的である、超高純度精製を必要としない。本明細書に記載される装置および方法はまた、植物の成長速度も高める。

【００１０】

本発明の利点は、一部は続く説明に記載され、一部は説明から明白であり、または下述する態様の実施によって習得されてもよい。下述の利点は、特に添付の特許請求の範囲で指摘される要素と組み合わせによって、実現化され達成されるであろう。前述の概要と以下の詳細な説明は、どちらも例証および説明のみを意図し、制限を意図しないものと理解される。

【００１１】

本明細書に組み込まれて本明細書の一部を構成する添付図面は、下述されるいくつかの態様を例証する。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】図１は、プラスミドに組み込まれた、本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクトを示す。

【図２】図２は、Ｂ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）装置および対照（フェノールＤＮＡなしのＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ））のコロニーを示す。Ｂ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）装置（下列）を組み込んだコロニーは、対照（上部）よりも高いコロニー個体数を示す。下列右のペトリ皿内のコロニーは、タンパク質フェニルアラニン－アンモニアリアーゼ（ＰＡＬ）を含有するＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）装置であり、これはより高い細菌個体数を示した。

【図３】図３は、対照ゲル（非形質転換した細菌）をＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）装置のタンパク質ゲルに重ね合わせて、二次元２Ｄ－ＤＩＧＥゲル中のタンパク質の発現を示す。写真は、タンパク質の下方制御および蛍光低下を示す対照（パネルＢを参照されたい）と対比して、ＰＡＬタンパク質があるフェノールＤＮＡを含有するＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）装置に対応する、上方制御されたタンパク質のより高い発現（より強度の高い蛍光点）（パネルＣを参照されたい）を示す。分析は、ＭＡＬＤＩ－ＭＳを使用して実施された。

【図４】図４は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）装置のコロニーを示す。Ｂ： Ｂ：対照（フェノールＤＮＡなしの細菌）は、フェノールＤＮＡを含有する細菌装置であるＡおよびＣよりも、低いコロニー形成を示す。ＡおよびＣでは、コロニー集団が寒天プレートを完全に覆っている。

【図５】図５は、ムラシゲ・スクーグ（ＭＳ）培地中で培養したココア胚性カルスを示す。比較胚性カルスは、対照との対比で、フェノール化合物を生成する異なる処理に相当する。フェノールＤＮＡ含有または非含有の異なる濃度の細菌装置、およびフェノールＤＮＡを含有する異なるタイプの細菌装置をいくつかのカルスに接種した。使用された２種の細菌は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）およびＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）であった。

【図６】図６は、組織培養アッセイからのココア（カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ ｃａｃａｏ）カルスを示す。キトサンおよび生物学的装置で処理したカルスのサイズ増大の誘導もまたを示される。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

本化合物、組成物、物品、装置、および／または方法を開示して説明する前に、下述の態様は、特定の化合物、合成法に限定されず、またはそれ自体の使用も、もちろん変動してもよいものと理解される。本明細書で使用される用語法は、特定の態様の説明のみを目的として、制限を意図しないこともまた理解される。

【００１４】

本明細書およびそれに続く特許請求の範囲では、以下の意味を有すると定義されるいくつかの用語を参照する：

本明細書および添付の特許請求範囲の用法では、文脈上例外が明記されていない限り、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、複数指示対象を含むことに留意すべきである。したがって例えば「生物活性剤」への言及は、このような２種以上の作用物質などの混合物を含む。

【００１５】

「任意選択の」または「任意選択的に」は、引き続いて記述される事象または状況が、存在し得て、または存在し得ないことを意味し、そして記述は、事象または状況が存在する事例、および存在しない事例を含むことを意味する。例えば「任意選択の成分」という語句は、成分が存在しても、または存在してなくてもよいことを意味する。

【００１６】

範囲は、本明細書で、「約」１特定値から、「約」別の特定値までとして表されてもよい。このような範囲が表される場合、別の態様は、１特定値から、および／または別の特定値までを含む。同様に、先行する「約」の使用によって、値が近似値として表される場合、特定値は、別の態様を形成するものと理解される。各範囲の終点が、別の終点に関して、および別の終点とは独立しての双方で、有意であることもさらに理解される。

【００１７】

開示されるのは、開示される組成物および方法のために使用し得る、それと併せて使用し得る、それを調製するのに使用し得る、またはその生成物である、材料および成分である。これらのおよびその他の材料は本明細書で開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示される場合、これらの化合物のそれぞれの、様々な個別のおよび集合的な、組み合わせおよび置換に対する特定の言及が、明示的に開示されなくてもよい一方で、それぞれは本明細書で具体的に検討され、説明されるものと理解される。例えば細菌が開示され考察されて、いくつかの異なる適合性細菌プラスミドが考察される場合、特に別段の指定がない限り、細菌および細菌プラスミドの可能なありとあらゆる組み合わせおよび置換が、具体的に検討される。例えば分子Ａ、Ｂ、およびＣのクラス、ならびに分子Ｄ、Ｅ、およびＦのクラスが開示されて、分子Ａ～Ｄの組み合わせの一例が開示される場合、たとえそれぞれが個別に列挙されなくても、それぞれが個別におよび集合的に検討される。したがって本実施例では、Ａ～Ｅ、Ａ～Ｆ、Ｂ～Ｄ、Ｂ～Ｅ、Ｂ～Ｆ、Ｃ～Ｄ、Ｃ～Ｅ、およびＣ～Ｆの組み合わせのそれぞれが具体的に検討されて、Ａ、Ｂ、およびＣ；Ｄ、Ｅ、およびＦの開示；およびＡ～Ｄの組み合わせの実施例から、開示されたと見なされるべきである。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせもまた、具体的に検討され開示される。したがって例えばＡ～Ｅ、Ｂ～Ｆ、およびＣ～Ｅのサブグループが具体的に検討されて、Ａ、Ｂ、およびＣ；Ｄ、Ｅ、およびＦの開示；およびＡ～Ｄの組み合わせの実施例から、開示されたと見なされるべきである。この概念は、開示された組成物を作成して使用する方法のステップをはじめとするが、これに限定されるものではない、本開示の全ての態様に適用される。したがって多様な追加的ステップを実施し得る場合、これらの追加的ステップのそれぞれは、開示された方法のあらゆる特定の実施形態または実施形態の組み合わせによって実施し得るものと理解され、このようなそれぞれの組み合わせが具体的に検討されて、開示されるものと理解される。

【００１８】

明細書中の、および結びの特許請求の範囲における、組成物または物品中の特定の構成要件または構成要素の重量部への言及は、それに対して重量部が表された、組成物または物品中の要素または成分と、あらゆるその他の要素または成分との間の重量関係を意味する。したがって２重量部の成分Ｘと５重量部の成分Ｙを含有する化合物中には、ＸおよびＹが２：５の重量比で存在し、追加的な構成成分が化合物中に含有されるかどうかにかかわりなく、このような比率で存在する。

【００１９】

成分の重量％は、特に断りのない限り、その中に成分が含まれる調合物または組成物の総重量を基準にする。

【００２０】

本明細書に記載されるのは、本明細書でココアとも称される、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）の生理学的を強化する方法である。本明細書で定義される「生理学的特性」という用語は、本明細書に記載される方法を使用して改善される、あらゆる物理的、化学的、生化学的、または生物学的特性を含む。一態様では、方法は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）によって産生されるフェノール化合物の生産を向上させ得る。その他の態様では、方法は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）の成長速度を向上させ得る。

【００２１】

Ｉ．ＤＮＡコンストラクトおよび生物学的装置

本明細書の用法では、「植物」は広い意味で使用され、例えば木質、観賞植物、作物、

穀類、果実、または野菜植物、ならびに光合成緑藻類のあらゆる種を含む。「植物」はまた、植物の発達のあらゆる段階に存在する構造に分化した、複数の植物細胞も指す。このような構造としては、果実、苗条、茎、葉、花びら、根、塊茎、球茎、鱗茎、種子、配偶子、子葉、胚軸、幼根、胚、配偶体、腫瘍などが挙げられるが、これに限定されるものではない。「植物細胞」、「植物細胞群」、または「植物組織」は、本明細書の用法では、上述の何れかの組織に存在するものをはじめとする、植物の分化および未分化組織、ならびに例えば、単細胞、プロトプラスト、胚、カルスなどの培養物中の細胞を指す。

【００２２】

「異種」遺伝子およびタンパク質は、実験的に細胞中に入れられた、常態では細胞によって発現されない、遺伝子およびタンパク質である。異種遺伝子は、受容細胞または生物とは異なる細胞型または種からクローンされてもよく、またはそれらに由来してもよい。異種遺伝子は、形質導入または形質転換によって細胞に導入されてもよい。

【００２３】

「単離」核酸は、常態では核酸の天然原料中に存在する、その他の核酸分子および／または細胞物質（ペプチド、タンパク質、脂質、糖類など）から分離されたものである。「単離」核酸は、自然に存在するような核酸の両側に見られる隣接配列を任意選択的に含まなくてもよい。単離核酸は、自然に存在し得て、化学的に合成され得て、またはｃＤＮＡ分子であり得る（すなわち、逆転写酵素およびＤＮＡポリメラーゼ酵素を使用してｍＲＮＡテンプレートから合成される）。

【００２４】

「形質転換」または「形質移入」は、本明細書の用法では、宿主細胞に異種ＤＮＡが導入されるプロセスを指す。形質転換は、自然条件下で生じ得て、または様々な当該技術分野で公知の方法を使用して誘導されてもよい。形質転換のための多数の方法が、当該技術分野で公知であり、熟練した実務家は、形質転換される細胞タイプに基づいて、最適な形質転換法をどのように選択するかを理解するであろう。形質転換のための方法としては、例えば、ウイルス感染、電気穿孔、リポフェクション、化学転換、および粒子衝突が挙げられる。細胞は、安定して形質転換されてもよく（すなわち異種ＤＮＡが自律性プラスミドとしてまたは宿主染色体の一部として、自己複製能力を持つ）、または一過性に形質転換されてもよい（すなわち限定的期間のみ異種ＤＮＡが発現する）。

【００２５】

「コンピテント細胞」は、異種ＤＮＡを取り込む能力のある微生物細胞を指す。コンピテント細胞は、商業的供給元から購入し得て、または当該技術分野で公知の手順を使用して、細胞をコンピテントにしてもよい。コンピテント細胞を生成する例示的な手順は、実施例に提供される。

【００２６】

本明細書に記載される生物学的装置を使用して、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）の生理学的な特性を向上させ得る。一態様では、生物学的装置は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）によるフェノール化合物の産生を増大させ得る。装置は、一般に宿主細胞から構成され、宿主細胞は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）中のフェノール化合物の産生を促進する、本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクトで形質転換される。

【００２７】

本明細書に記載される遺伝子要素およびＤＮＡコンストラクトの変異体および誘導体を定義する１つの方法は、特定の既知の配列との相同性／同一性に関して、変異体および誘導体を定義することによるものと理解される。当業者は、２つの核酸相同性をどのように判定するかを容易に理解する。例えば相同性は、相同性がその最高レベルになるように、２つの配列を整列させた後に、計算し得る。相同性を計算する別の方法は、公開されたアルゴリズムによって実施し得る（少なくとも核酸アラインメントに関連した題材については、参照によって本明細書に援用する、Ｍ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４４：４８－５２，１９８９，Ｊａｅｇｅｒら　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：７７０

６－７７１０，１９８９，Ｊａｅｇｅｒら Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８３：２８１－３０６，１９８９を参照されたい）。

【００２８】

本明細書の用法では、「保存的」変異は、ＤＮＡ配列から生成されるタンパク質にアミノ酸変化をもたらす変異である。保存的変異が生じると、新しいアミノ酸は野性型アミノ酸と同様の特性を有して、一般にタンパク質の機能または折り畳みは大幅に変化しない（例えばバリンのイソロイシンによる置換は、どちらも小型の分枝疎水性アミノ酸であることから、保存的変異である）。その一方で「サイレント変異」は、タンパク質をコードする遺伝子の核酸配列を変化させるが、タンパク質のアミノ酸配列を変化させない。

【００２９】

保存的変異および相同性の説明は、特定配列と、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％の相同性を有する実施形態など、あらゆる組み合わせで共に組み合わせ得て、変異体は保存的変異であると理解される。本明細書に記載される配列のいずれもが、上に列挙した相同性値を有する変異体または誘導体であり得るものと理解される。

【００３０】

一態様では、本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクト（本明細書で「フェノールＤＮＡ」と称される）は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ ｃａｃａｏ）からの１つまたは複数のフェノール化合物の発現を促進し得る。「フェノール化合物」という用語は、芳香族環上に存在する少なくとも１つのヒドロキシル基を有する、あらゆる芳香族化合物と定義される。このようなフェノール化合物の例としては、没食子酸、ｐ－ヒドロキシ安息香酸、コーヒー酸、カテキン、およびｐ－クマル酸などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【００３１】

一態様では、ＤＮＡコンストラクトは、５’から３’に向けて、（１）ＰＡＬプロモーター、２）ヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアーリアーゼを発現する遺伝子、（３）リボソーム結合部位、および（４）ターミネーターの順の遺伝子要素である。特定の態様では、ＤＮＡコンストラクトは、ヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアーリアーゼを発現する遺伝子とリボソーム結合部位との間のリボソームスイッチをさらに含んでなり、それは翻訳およびタンパク質発現を高め得る。

【００３２】

一態様では、ヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現する遺伝子が、細菌から単離される。一態様では、細菌は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種である。さらなる態様では、細菌は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、Ｐ．デニトリフィカンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｄｅｎｉｔｒｉｆｉｃａｎｓ）、Ｐ．レシノボランス（Ｐ．ｒｅｓｉｎｏｖｏｒａｎｓ）、Ｐ．プロテゲンス（Ｐ．ｐｒｏｔｅｇｅｎｓ）、Ｐ．フルオレッセンス（Ｐ．ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）、または別のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種である。別の態様では、ヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現する遺伝子が、植物から単離される。一態様では、植物は、シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ）である。別の態様では、植物は、イヌタカヒバ（Ｓｅｌａｇｉｎｅｌｌａ ｍｏｅｌｌｅｎｄｏｒｆｆｉｉ）、ヒメツリガネゴケ（Ｐｈｙｓｃｏｍｉｔｒｅｌｌａ ｐａｔｅｎｓ）、トウモロコシ（トウモロコシ（Ｚｅａ ｍａｙｓ）、またはソルガムまたはマイロ（モロコシ（Ｓｏｒｇｈｕｍ ｂｉｃｏｌｏｒ）である。さらなる態様では、ＤＮＡコンストラクト中でフェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現する遺伝子は配列番号５を有し、またはその誘導体または変異体である。別の態様では、ＤＮＡコンストラクト中でフェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現する遺伝子は配列番号６または７を有し、またはその誘導体または変異体である。

【００３３】

別の態様では、ＤＮＡコンストラクトは、（５）抗生物質に対する耐性を与える遺伝子

（「選択マーカー」）、（６）レポータータンパク質、またはそれらの組み合わせをさらに含む。

【００３４】

一態様では、ベクターの遺伝子操作に先だって、制御配列が、例えばプラスミドなどのベクターに既に組み込まれている。別の態様では、制御配列は、制限酵素または当該技術分野で公知のあらゆるその他の技術の使用を通じて、ベクターに組み込まれ得る。

【００３５】

一態様では、制御配列はプロモーターである。「プロモーター」という用語は、コード配列の発現を制御できるＤＮＡ配列を指す。一態様では、制御されるコード配列は、プロモーターの３’側に位置する。別の態様では、プロモーターは、天然遺伝子に由来する。代案の態様では、プロモーターは、異なる遺伝子および／またはプロモーターに由来する、複数構成要素から構成される。プロモーターは、自然に見られる要素から、人工および／または合成要素から、またはそれらの組み合わせから構築し得る。当業者は、異なる組織または細胞タイプ中で、異なる発達段階で、異なる環境的または生理的条件に答えて、および／または異なる種の中で、異なるプロモーターが遺伝子発現を誘導し得ることを理解する。一態様では、プロモーターはスイッチとして機能し、遺伝子の発現を活性化する。

【００３６】

一態様では、プロモーターは「構成的」である。構成的プロモーターは、大部分の細胞型でほぼ常に遺伝子を発現させるプロモーターである。別の態様では、プロモーターは「調節される」。調節プロモーターは、特定の刺激に応えて活性になるプロモーターである。プロモーターは、例えば、特定の代謝産物（例えば乳糖またはトリプトファン）、金属イオン、病原体によって分泌される分子などの存在または不在などに応えて、化学的に調節されてもよい。プロモーターはまた、例えば、熱、低温、水分ストレス、塩分ストレス、酸素濃度、照明、創傷などに応えて、物理的に調節されてもよい。

【００３７】

本明細書に記載されるヌクレオチド配列の発現を駆動するのに有用なプロモーターは数多く、当業者に良く知られている。適切なプロモーターとしては、ＰＡＬプロモーター、Ｔ３プロモーター、Ｔ７プロモーター、Ｆｅプロモーター、およびＧＡＬ１プロモーターが挙げられるが、これに限定されるものではない。これらのプロモーターの変異体もまた、検討される。当業者は、部位特異的変異誘発および／またはその他の変異誘発技術を利用して、プロモーターを改変し、より効率的な機能を促進できるであろう。プロモーターは、例えばリボソーム結合部位から１０～１００ヌクレオチド離れて位置してもよい。

【００３８】

一態様では、プロモーターはＰＡＬプロモーターである。一態様では、ＤＮＡコンストラクト中のＰＡＬプロモーターは、配列番号１であり、またはその誘導体または変異体である。別の態様では、ＰＡＬプロモーターは配列番号２、３、または４であり、またはその誘導体または変異体である。

【００３９】

別の態様では、ＤＮＡコンストラクト中でヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現する遺伝子は、配列番号５であり、またはその誘導体または変異体である。別の態様では、遺伝子は配列番号６または７であり、またはその誘導体または変異体である。

【００４０】

リボソーム結合部位（および任意選択の）リボソームスイッチの選択は、宿主細胞の選択に応じて変動し得る。一態様では、ＤＮＡコンストラクト中のリボソーム結合部位は配列番号８または９であり、またはその誘導体または変異体である（例えばその中で配列番号８がＡ、Ｔ、Ｇ、またはＣであり得る）。特定の態様では、ＤＮＡコンストラクトがリボソームスイッチをさらに含む場合。一態様では、リボソームスイッチは配列番号１１、１２、１３または１４であり、またはその誘導体または変異体である。

【００４１】
別の態様では、制御配列は、ターミネーターまたは終止配列である。本明細書の用法では、ターミネーターは、転写される遺伝子またはオペロン末端を標識するＤＮＡ配列である。さらなる態様では、ターミネーターは、内在性ターミネーターまたはρ－依存性転写ターミネーターである。本明細書の用法では、「内在性ターミネーター」とは、新生転写物中でヘアピン構造が形成し得て、ヘアピンがｍＲＮＡ／ＤＮＡ／ＲＮＡポリメラーゼ複合体を妨害する配列である。本明細書の用法では、「ρ－依存性」転写ターミネーターは、ｍＲＮＡ／ＤＮＡ／ＲＮＡポリメラーゼ錯体を妨害するのに、ρ要素タンパク質複合体を必要とする。
【００４２】
一態様では、ＤＮＡコンストラクト中のターミネーターは、配列番号１０であり、またはその誘導体または変異体である。
【００４３】
さらなる態様では、制御配列は、プロモーターと、ターミネーターまたは終止配列との双方を含む。なおもさらなる態様では、制御配列は、複数のプロモーターまたはターミネーターを含み得る。エンハンサーなどのその他の調節因子もまた、検討される。エンハンサーは、転写されるＤＮＡの開始コドンから５’方向に、約１～約２０００ヌクレオチドに位置してもよく、または転写されるＤＮＡの３’に位置してもよい。エンハンサーは「シス作用性」であってもよく、すなわちそれらが発現に影響を及ぼす遺伝子と同一のＤＮＡ分子上に位置する。
【００４４】
特定の態様では、ＤＮＡコンストラクトは、レポータータンパク質を発現する遺伝子を含み得る。レポータータンパク質の選択は、様々であり得る。例えばレポータータンパク質は、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であり得る。一態様では、レポータータンパク質を発現する遺伝子は、配列番号１５を有する。生物学的装置生成される蛍光の量は、植物細胞に組み込まれたＤＮＡコンストラクトの量と相関し得る。装置によって生成される蛍光は、当該技術分野で公知の技術を使用して検出および定量化し得る。例えば分光蛍光光度計が、蛍光を測定するために典型的に使用される。実施例は、ＤＮＡ発現の結果としての蛍光の量を測定するための例示的な手順を提供する。
【００４５】
本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクトは、ベクターの一部であり得る。一態様では、ベクターは、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体、細菌人工染色体、ウイルス、ファージ、またはトランスポゾンである。
【００４６】
一般に、宿主との関連で、これらの宿主細胞に適合する種に由来するレプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターが、使用される。組換え遺伝子およびタンパク質を高レベルで発現できるベクターは、当該技術分野で周知である。ベクターは、通常、形質転換細胞中において表現型選択を提供できる、複製起点ならびに標識配列を保有する。多様な宿主細胞の形質転換に有用なプラスミドベクターは、周知であり市販される。このようなベクターとしては、ｐＷＬＮＥＯ、ｐＳＶ２ＣＡＴ、ｐＯＧ４４、ＰＸＴ１、ｐＳＧ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ｐＳＶＫ３、ｐＢＳＫ、ｐＢＲ３２２、ｐＹＥＳ、ｐＹＥＳ２、ｐＢＳＫＩＩ、およびｐＵＣベクターが挙げられるが、これに限定されるものではない。
【００４７】
プラスミドは、宿主細胞染色体に組み込まれない、二本鎖の自律的に自己複製する遺伝要素である。さらにこれらの遺伝要素は、通常は、宿主細胞の中央代謝の一部でない。細菌中では、プラスミドは、１キロベース（ｋｂ）から２００ｋｂを超える範囲であってもよい。プラスミドは、二次代謝産物の生成、抗生物質耐性、有用なタンパク質の生成、複合分子および／または環境毒素の分解などをはじめとする、いくつかの有用な形質をコー

ドするように改変され得る。プラスミドは、例えば微生物中における外来性ＤＮＡのための都合良い発現ベクターであるので、プラスミドは、遺伝子工学の分野で多くの研究の対象となっている。プラスミドは、一般に、プロモーターおよびターミネーターなどの調節因子を含有し、また通常は、独立した複製起点を有する。理想的には、プラスミドは、宿主細胞毎に複数コピー存在し、選択可能なマーカー（抗生物質耐性遺伝子など）を含有して、当業者が、（例えば抗生物質を含有する培地中で宿主細胞を培養することにより）プラスミドで成功裏に形質移入された宿主細胞を選択できるようにする。

【００４８】

一態様では、ベクターは、選択マーカーをコードする。さらなる態様では、選択マーカーは、抗生物質に対する耐性を与える遺伝子である。特定の態様では、ベクターで形質転換された宿主細胞の発酵中に、細胞を抗生物質に接触させる。例えば抗生物質が、培地に含まれてもよい。成功裏に形質転換されなかった細胞は、抗生物質存在下で生存し得ず；抗生物質耐性を与えるベクターを含有する細胞のみが、生存し得る。任意選択的に、発現されるベクターを含有する細胞のみが培養され、これは所望の遺伝子産物（例えばフェノール化合物合成に関与するペプチド）の最大生産効率をもたらすであろう。さもなければベクターを含有しない細胞が、資源について形質転換細胞と競合する。一態様では、抗生物質は、テトラサイクリン、ネオマイシン、カナマイシン、アンピシリン、ハイグロマイシン、クロラムフェニコール、アンホテリシンＢ、バシトラシン、カルバペネム、セファロスポリン、エタンブトール、フルオロキノロン、イソニジド、メチシリン、オキサシリン、バンコマイシン、ストレプトマイシン、キノリン、リファンピン、リファンピシン、スルホンアミド、セファロチン、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ペニシリン、その他の通常使用される抗生物質、またはそれらの組み合わせである。

【００４９】

一態様では、ベクターがプラスミドである場合、プラスミドは、多重クローニング部位またはポリリンカーもまた、含有し得る。さらなる態様では、ポリリンカーは、複数制限酵素の認識部位を含有する。ポリリンカーは、最大で２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２０を超える制限酵素認識部位を含有し得る。さらに制限酵素認識部位は、必要に応じて、当該技術分野で公知の技術を使用して、付加、抑制、または除去されてもよい。一態様では、プラスミドは、例えば、ＨｉｎｄＩＩＩ、ＫｐｎＩ、ＳａｃＩ、ＢａｍＨＩ、ＢｓｔＸＩ、ＥｃｏＲＩ、ＢｓａＢＩ、ＮｏｔＩ、ＸｈｏＩ、ＳｐｈＩ、ＳｂａＩ、ＡｐａＩ、ＳａｌＩ、ＣｌａＩ、ＥｃｏＲＶ、ＰｓｔＩ、ＳｍａＩ、ＸｍａＩ、ＳｐｅＩ、ＥａｇＩ、ＳａｃＩＩ、またはそれらのあらゆる組み合わせなどのあらゆる既知の制限酵素に対する、制限酵素認識部位を含有する。さらなる態様では、プラスミドは、同一制限酵素に対して、２つ以上の認識部位を含有する。

【００５０】

一態様では、制限酵素は、回文構造または非対称制限部位で、ＤＮＡを切断し得る。さらなる態様では、制限酵素は、ＤＮＡを切断して平滑末端を残し；代案の態様では、制限酵素は、ＤＮＡを切断して「粘着性」またはオーバーハング末端を残す。別の態様では、酵素は、制限部位から２０塩基～１０００以上塩基離れた距離で、ＤＮＡを切断し得る。多様な制限酵素が市販され、それらの認識配列、ならびに使用説明書（例えば必要なＤＮＡの量、正確な試薬容積、精製技術、ならびに塩濃度、ｐＨ、最適温度、培養時間などに関する情報）は、商業的酵素供給業者から入手できるようになっている。

【００５１】

一態様では、１つまたは複数の制限酵素認識部位を含有するポリリンカーがあるプラスミドを１種の制限酵素で消化し得て、市販のＤＮＡリガーゼ酵素を使用して、関心のあるヌクレオチド配列をプラスミドにライゲートし得る。いくつかのこのような酵素は、使用するのに必要な全ての試薬および使用説明書を含むキットとして、入手できることが多い。別の態様では、２つ以上の制限酵素認識部位を含有するポリリンカーがあるプラスミドを２種の制限酵素で同時に消化し得て、ＤＮＡリガーゼ酵素を使用して、関心のあるヌク

レオチド配列をプラスミドにライゲートし得る。２種の制限酵素を使用して、ＤＮＡ中に非対称切断を提供することで、二本鎖プラスミドの特定の方向に、および／または特定の鎖上に、関心のあるヌクレオチド配列を挿入できるようになる。ＤＮＡテンプレートからのＲＮＡ合成は、往々にしてプロモーターのすぐ後に始まって、５’から３’へ進行するので、プラスミドに要素が挿入される順序および方向は、特に重要である。プラスミドが、複数制限酵素によって同時に消化される場合、これらの酵素は、緩衝液、塩濃度、およびその他の培養パラメータに関して適合性でなくてはならない。

【００５２】

いくつかの態様では、リガーゼ酵素を使用したライゲーションに先だって、制限酵素で消化されたプラスミドをアルカリホスファターゼ酵素で処理して、５’末端リン酸基を除去する。これはプラスミドの自己ライゲーションを防止して、ひいては異種核酸断片のプラスミドへのライゲーションを促進する。

【００５３】

一態様では、プラスミドまたはその他のベクターへのライゲートに先だって、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクトで使用される核酸（例えばヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現する遺伝子）を増幅し得る。典型的に、ＰＣＲ増幅技術は、増幅されるＤＮＡまたはヌクレオチド配列の側面に位置する各鎖の領域とそれぞれ相補的である、プライマーまたは短い化学合成オリゴヌクレオチドを利用する。当該技術分野の当業者は、所望の実験条件に基づいて、プライマーをデザインまたは選択できるであろう。一般に、プライマーは、標的核酸の効率的かつ忠実な複製を提供するように、デザインされるべきである。各遺伝子の増幅毎に、１つはセンス鎖（すなわち対象遺伝子を含有する鎖）のため、もう１つはアンチセンス鎖（すなわち対象遺伝子と相補的な鎖）のための、２つのプライマーが必要である。プライマー対は、ＰＣＲ反応のアニーリング温度に近い、同様の融解温度を有するべきである。ＰＣＲ反応を促進するために、プライマー中では、モノヌクレオチド反復、混合物中のその他のプライマーとの相補性、自己相補性、および内部ヘアピンおよび／またはループの特徴を回避すべきである。プライマーをデザインする方法は当該技術分野で公知であり；さらに、プライマーデザインのために、普通に熟練した実務家を補佐し得るコンピュータプログラムも存在する。プライマーの５’末端に制限酵素認識部位を任意選択的に組み込んで、後からのプラスミドまたはその他のベクターへのライゲーションを助け得る。

【００５４】

ＰＣＲは、精製ＤＮＡ、ベクターに組み込まれた未精製ＤＮＡ、または未精製ゲノムＤＮＡを使用して、実施し得る。ＰＣＲを使用して標的ＤＮＡ増幅するプロセスは、増幅される配列を含有する混合物に、上述の特性を有する過剰な２種のプライマーを導入するステップと、とそれに続いて、例えば、Ｔａｑ、Ｐｆｕ、Ｐｗｏ、Ｔｆｌ、ｒＴｔｈ、Ｔｌｉ、またはＴｍａポリメラーゼの何れかなどの耐熱性または好熱性ＤＮＡポリメラーゼの存在下における、一連の加熱サイクルからなる。ＰＣＲ「サイクル」は、加熱とそれに続くプライマーの標的ＤＮＡへのアニーリングと、それに続いて、必要に応じて緩衝液、塩、およびその他の試薬と共に、好熱性ＤＮＡポリメラーゼおよびデオキシリボヌクレオチド三リン酸（すなわちｄＣＴＰ、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、およびＴＴＰ）の供給を使用して、プライマーを伸長させることを通じた、ＤＮＡ変性を伴う。一態様では、ＰＣＲプロセス中にプライマー伸長によって生じるＤＮＡ断片は、追加的なＰＣＲサイクルのためのテンプレートの役割を果たし得る。多数のＰＣＲサイクルを実施して、高濃度の標的ＤＮＡまたは遺伝子を作成し得る。ＰＣＲは、任意選択的に、変性、アニーリング、および伸長ステップのためのプログラム可能な温度サイクルがある、機器または装置上で、実施し得る。さらに、選択されるプライマーは、選択される遺伝子に特異的であるので、ＰＣＲは、同一反応容器または微量遠心管内において、複数遺伝子上で同時に実施し得る。ＰＣＲ産物は、例えば商業的キットおよび試薬を使用して、ゲル電気泳動とそれに続くゲルからの抽出などの当該技術分野で公知の技術によって精製し得る。

【００５５】

さらなる態様では、ベクターは、複製起点を含み得て、それが宿主細胞の複製機構を利用して、それ自体のコピーを作り出せるようにする。

【００５６】

本明細書の用法では、「作動可能に連結する」とは、片方の機能がもう１つの機能に影響を及ぼすような、単一核酸断片上の核酸配列の結合を指す。例えば複数遺伝子の配列が単一プラスミドに挿入される場合、それらの発現は作動可能に連結してもよい。代案としては、プロモーターが、コード配列の発現に影響を及ぼすことができれば、それはコード配列と作動的に連結すると言われる。

【００５７】

本明細書の用法では、「発現」は、遺伝子またはＤＮＡ断片に由来するｍＲＮＡの転写および／または蓄積を指す。発現はまた、ｍＲＮＡのペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質への翻訳を指すために使用してもよい。

【００５８】

本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクトを生成する例示的な方法は、実施例に提供される。当該技術分野で公知の制限酵素および精製技術を使用して、ＤＮＡコンストラクトを調製し得る。ＤＮＡコンストラクトを組み込んだベクターを作成した後、それを下述の方法を使用して宿主細胞に組み込み得る。

【００５９】

ＩＩ．生物学的装置

一態様では、「生物学的装置」は、本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクトで、微生物細胞が形質移入されると形成される。生物学的装置は、一般に微生物宿主細胞から構成され、宿主細胞は本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクトで形質転換される。

【００６０】

一態様では、ＤＮＡコンストラクトは、発現ベクターによって細胞に運び入れられ、宿主細胞のゲノムとは分離している。別の態様では、ＤＮＡコンストラクトは、宿主細胞のゲノに組み込まれる。なおも別の態様では、宿主細胞へのＤＮＡコンストラクトの組み込みは、宿主細胞がフェノール化合物を産生できるようにする。

【００６１】

本明細書で言及される宿主細胞は、細胞分裂によって形成されるあらゆる全ての後続の世代である、それらの子孫を含む。全ての子孫は、故意または偶発変異のために、同一でなくてもよいものと理解される。宿主細胞は、「形質移入」または「形質転換」されてもよく、これはそれによって外来性核酸が、宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。形質転換細胞には、初代対象細胞およびその子孫が含まれる。宿主細胞は、自然に存在する細胞または「組換え」細胞であり得る。組換え細胞は、分子生物学的技術を使用して取り込まれた核酸配列を含有しない、天然細胞と区別できる。一態様では、自然にカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）と関わりがある宿主細胞を本明細書中で使用することができる。一態様では、宿主細胞は、例えばバチルス・プミルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｕｍｉｌｕｓ）または大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）などの原核細胞である。その他の態様では、宿主細胞は、例えばサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの酵母である。本明細書に記載されるＤＮＡコンストラクトで形質転換された宿主細胞は、生物学的装置と称される。

【００６２】

ＤＮＡコンストラクトは、最初に宿主細胞中に送達される。この送達は、細胞株を形質転換するための十分に開発された実験手順を使用して、試験管内で達成されてもよい。細菌細胞株の形質転換は、多様な技術を使用して達成し得る。一方法は、塩化カルシウムを含む。カルシウムイオンへの曝露は、細胞がＤＮＡコンストラクトを取り込めるようにする。別の方法は、電気穿孔である。この技術では、高電圧電界を細胞に短時間印加して、細胞膜中に一過性の孔を作成し、それを通じてＤＮＡコンストラクトを含有するベクターを入れる。本明細書に記載される特定のＤＮＡを用いて、酵母および細菌を形質転換する例示的な手順は、実施例に提供される。特定の態様では、宿主細胞に２種以上のＤＮＡタ

イプを組み込み得る。したがって同一植物から、異なる代謝産物を高速に生産し得る。

【００６３】

ひとたびＤＮＡコンストラクトが宿主細胞に組み込まれたら、細胞が増殖するように、細胞を培養する。満足できる微生物学的培養は、水素供与体および受容体、炭素、窒素、イオウ、リン、無機塩、および特定例ではビタミンまたはその他の増殖促進物質の利用可能源を含有する。ペプトンの添加は、容易に利用できる窒素源および炭素を提供する。グルコースおよびフルクトースなどの単糖類、乳糖およびスクロースなどの二糖類、オリゴ糖類、デンプンなどの多糖類、およびそれらの混合物をはじめとするが、これに限定されるものではない、多様なその他の炭素源が、検討される。原材料から抽出される未精製混合物もまた検討され、糖蜜、大麦麦芽、および関連化合物と組成物が挙げられる。その他の解糖作用およびトリカルボン酸回路中間体もまた炭素源として検討され、適合性生物の場合は、二酸化炭素および／またはメタノールなどの一炭素基質についても検討される。炭素源利用は、培養される特定の生物によってのみ制限される。

【００６４】

さらに異なる培地の使用は、異なる成長速度および異なる定常期密度をもたらす。二次代謝産物生産は、細胞が定常期にある場合に、最大である。富栄養培地は、短い倍加時間と、定常期におけるより高い細胞密度とをもたらす。最少培地は、緩慢な増殖と、低い最終細胞密度とをもたらす。効率的な撹拌および曝気は、最終細胞密度を増大させる。当業者は、宿主細胞の特定の種および／または株を培養するのに、いずれの培地タイプが最適であるかを判定できるであろう。

【００６５】

宿主細胞の培養または発酵は、当該技術分野で公知のあらゆる技術によって達成されてもよい。一態様では、バッチ発酵を実施し得る。バッチ発酵では、培養開始時に培地組成を設定し、システムは将来の人為的変更について閉鎖している。いくつかの態様では、限定的形態のバッチ発酵を実施し得て、酸素濃度およびｐＨなどの要素が操作されるが、追加的な炭素は添加されない。連続発酵法もまた、検討される。連続発酵では、同等量の規定培地が、バイオリアクターに継続的に添加され、それから取り出される。その他の態様では、微生物宿主細胞が基材上に固定化される。発酵は、あらゆる規模で実施し得て、その中で文字通りの「発酵」が実施される方法、ならびに非発酵性であるその他の培養方法を含んでもよい。

【００６６】

ＩＩＩ．カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）の生理学的特性を強化する方法

一態様では、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスを上述の生物学的装置に接触させると、フェノール化合物の生産が高まる。カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスを培養する例示的な手順は、実施例に提供される。一態様では、２～６週間、から３～６週間、４～６週間、または約５週間にわたり増殖させたカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスを使用し得る。

【００６７】

一態様では、植物細胞を上述の生物学的装置に接触させると、フェノール化合物の生産が高まる。受容細胞標的としては、分裂組織細胞や、Ｉ型、ＩＩ型、およびＩＩＩ型カルスや、未熟胚や、小胞子、花粉、精子、および卵細胞などの配偶子細胞が挙げられるが、これに限定されるものではない。生殖力のある植物がそれから再生されてもよいあらゆる細胞が、受容細胞として有用であることが検討される。Ｉ型、ＩＩ型、およびＩＩＩ型カルスは、未熟胚、未熟花序、苗頂端分裂組織、小胞子などをはじめとするが、これに限定されるものではない、組織源から開始されてもよい。カルスとして増殖できる細胞もまた、本明細書で有用である。植物細胞を培養する方法は、当該技術分野で公知である（米国特許第７，９１９，６７９号明細書を参照されたい）。植物カルスを培養する例示的な手順は、実施例に提供される。一態様では、２～４週間培養した植物カルスを本明細書で使用し得る。植物細胞はまた、様々な日齢の植物に由来し得る。例えば授粉後８０日～１２０日齢の植物を使用して、本明細書で有用なカルスを作成し得る。

【００６８】
カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスは、いくつかの異なる方法で生物学的装置と接触させ得る。一態様では、装置は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスを含有する培地に添加し得る。別の態様では、装置は、シリンジによってカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスに注入し得る。装置の量および装置への曝露持続期間もまた、様々であり得る。一態様では、装置の濃度は、約10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、または10^9細胞／ｍＬ水である。一態様では、宿主細胞が細菌である場合、装置の濃度は、10^6である。別の態様では、宿主細胞が酵母である場合、装置の濃度は、10^9である。２５μＬ～５００μＬの範囲の異なる容積の生物学的装置もまた、使用し得る。

【００６９】
ひとたびカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスが、フェノール化合物を生成するのに十分な時間にわたり生物学的装置と接触したら、フェノール化合物が単離される。一態様では、フェノール化合物は、生物学的装置およびカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスを含有する培地から抽出される。抽出溶剤の選択は、代謝産物の溶解度に応じて変動し得る。本明細書に記載される生物学的装置によって産生される代謝産物を抽出する例示的な手順は、実施例に提供される。

【００７０】
現行の技術では、植物から生成される代謝産物の抽出には、通常、最初に植物バイオマスまたは材料が大量に必要であり、それは次により大量の抽出溶剤を必要とする。より大量の抽出溶剤の使用は、フェノール化合物の生産費用を増大させる。より大量の有機溶剤の使用は、環境リスクもまた提示する。しかし本明細書に記載される生物学的装置の使用は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）からフェノール化合物などの代謝産物を顕著により大量に生成し、これは、代謝産物を生産して単離するのに必要なバイオマスが、既存の技術と比較してより小量であることを意味する。さらに下の実施例に示されるように、本明細書に記載される生物学的装置は、いくつかの異なるフェノール化合物を産生し、これもまた望ましい。現行の技術を使用した植物代謝物の抽出には新鮮なバイオマスが必要であり、それには、農耕法、化学薬品の使用、および時間のかかる抽出法が必然的に伴う。したがって本明細書に記載される生物学的装置の使用は、フェノール化合物を合成および抽出する従来の方法よりも、費用効率がより高く、環境に対してより安全である。一態様では、本明細書に記載される方法は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）からの１つまたは複数のフェノール化合物の生産を高め、フェノール化合物の生産に要する時間を短縮し、過酷な環境条件に起因する、天然栽培カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）からのフェノール化合物の予測不可能な生産レベルの問題を克服する。

【００７１】
その他の態様では、本明細書に記載される装置および方法は、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）植物の成長速度を増大させ得る。特に本明細書に記載される装置および方法は、組織培養の初期段階で、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）植物の成長を加速させるのに効果的である。初期段階における植物成長を加速させることで、植物からより多くの代謝産物を収穫することが可能である。さらに本明細書に記載される装置および方法は、組織培養に伴う問題である微生物汚染から、植物組織培養物を保護する。最後に、従来の組織培養法は、環境への懸念を引き起こし得る２－４－Ｄなどの合成成長因子の使用を伴う。本明細書に記載される装置および方法は、このような化合物に対する必要性を回避する。

【００７２】
特定の態様では、本明細書に記載される生物学的装置を多糖類と組み合わせて使用して、植物の１つまたは複数の生理学的特性を高め得る。一態様では、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）細胞を最初に生物学的装置と接触させ、次に引き続いて多糖類と接触させる。別の態様では、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）細胞を最初に多糖類に接触させ、次に引き続いて生物学的装置と接触させる。さらなる態様では、植物細胞

を多糖類のみと接触させ、生物学的装置には接触させない。なおもさらなる態様では、植物細胞を多糖類および生物学的装置に同時に接触させる。

【００７３】

一態様では、多糖類はキトサン、グルコサミン（ＧｌｃＮ）、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＮＡＧ）、またはそれらのあらゆる組み合わせを含む。キトサンは、一般にグルコサミン単位およびＮ－アセチルグルコサミン単位から構成され、節足動物外骨格および真菌および微生物細胞壁の成分であるキチンから、化学的または酵素的に抽出され得る。特定の態様では、培養中の組織増殖ならびに代謝産物生産を高めるために、キトサンを特定のアセチル化度にアセチル化し得る。一態様では、キトサンは、６０％～約１００％、７０％～９０％、７５％～８５％、または約８０％アセチル化される。キトサンを生成および単離する例示的な手順は、実施例に提供される。一態様では、カニ、エビ、ロブスター、および／またはオキアミの殻から単離されるキトサンが、本明細書で有用である。

【００７４】

キトサンの分子量はまた、様々であり得る。例えばキトサンは、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０グルコサミン単位および／またはＮ－アセチルグルコサミン単位を含んでなる。別の態様では、キトサンは、５～７グルコサミン単位および／またはＮ－アセチルグルコサミン単位を含む。一態様では、キトサンは、１重量％未満、０．７５％重量％未満、０．５０％重量％未満、０．２５％重量％未満、または０．１０％重量％未満の水および酢酸溶液である。別の態様では、植物細胞に適用されるキトサンの量は、０．１０％～０．０１重量％、０．０７５％～０．０２５重量％、または約０．０５重量％である。多糖類本明細書で使用されるのは、一般に天然ポリマーであり、したがって環境への懸念は提示しない。さらに多糖類は、許容できる低濃度で使用され得る。特定の態様では、多糖類を１つまたは複数の成長調節物質と組み合わせて使用し得る。

【００７５】

一態様では、植物成長調節物質は、オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシシン酸、またはポリアミンである。さらなる態様では、オーキシンは天然または合成オーキシンである。なおもさらなる態様では、オーキシンは、インドール－３－酢酸（ＩＡＡ）、４－クロロインドール－３－酢酸（４－Ｃｌ－ＩＡＡ）、２－フェニル酢酸（ＰＡＡ）、インドール－３－酪酸（ＩＢＡ）、２，４－ジクロロフェノキシ酢酸（２，４－Ｄ）、α－ナフタレン酢酸（α－ＮＡＡ）、２－メトキシ－３，６－ジクロロ安息香酸（ジカンバ）、４－アミノ－３，５，６－トリクロロピコリン酸（トルデンまたはピクロラム）、２，４，５－トリクロロピコリン酸（２，４，５－Ｔ）、またはそれらの組み合わせである。別の態様では、サイトカイニンは、ゼアチン、カイネチン、６－ベンジルアミノプリン、ジフェニル尿素、チジアズロン（ＴＤＺ）、６－（γ，γ－ジメチルアリルアミノ）プリン、またはそれらの組み合わせである。別の態様では、ジベレリンは、ジベレリンＡ１（ＧＡ１）、ジベレリン酸（ＧＡ３）、ｅｎｔ－ジベレラン、ｅｎｔ－カウレン、またはそれらの組み合わせである。さらに別の態様では、ポリアミンは、プトレシン、スペルミジン、またはそれらの組み合わせである。

【００７６】

一態様では、植物細胞またはカルスを最初に多糖類に接触させ、引き続いて植物成長調節物質に接触させる。別の態様では、植物細胞またはカルスを最初に植物成長調節物質に接触させ、引き続いて多糖類に接触させる。代案の態様では、植物細胞またはカルスを多糖類および植物成長調節物質に同時に接触させる。さらなる態様では、植物細胞またはカルスを多糖類のみに接触させ、植物成長調節物質には接触させない。

【００７７】

カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）細胞は、いくつかの技術を使用して多糖類に接触させ得る。一態様では、植物細胞または生殖器官（例えば植物胚）は、寒天および多糖類溶添加培地中で培養し得る。その他の態様では、多糖類は、例えばカルスを被覆する（例えば噴霧または別の方法によって）、または多糖類をカルスに注入するなどの技術

によって、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスに適用し得る。多糖類の量は、特に、植物細胞の選択および数に応じて変動し得る。本明細書に記載される方法における多糖類の使用は、室温での迅速な組織培養を可能にする。微生物汚染を防止する能力のために、組織培養物は、数日間から数週間にわたって長期間増殖させ得る。さらに多糖類を用いた組織培養は、暗所および／または明所で実施し得る。

【００７８】

上で考察されるように、植物細胞は、本明細書に記載される生物学的装置の何れかと任意選択的に接触させ得る。したがって多糖類および本明細書に記載される生物学的装置の使用は、強化された生理学的特性があるカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）細胞を培養および栽培する用途の広い方法である。

【００７９】

その他の態様では、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）細胞をバイオリアクター内の液体培地中で、より大規模に培養し得る。例えばカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）細胞を寒天および培地中で培養して、次に引き続いて本明細書に記載される生物学的装置と接触させ得る（例えば注入）。十分な培養期間（例えば２～４週間）後、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）細胞を上で使用したのと同じ培地、そして多糖類と共に、容器に装入する。特定の態様では、多糖類は、アルギン酸塩（例えばナトリウム、カルシウム、カリウムなど）をはじめとするが、これに限定されるものではない、アニオン性多糖類と共に装入し得る。多糖類の装入後、所望の結果（例えば所望の代謝産物の生成）が得られるまで、十分な時間にわたり溶液を混合する。

【００８０】

一態様では、植物カルスを多糖類（例えばキトサン）溶液に浸漬して、次に装置を接種する。一態様では、植物カルスは、ココア（カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスである。植物カルスは、装置接種に先だって、２日～２０日齢であり得る。次に植物カルスが十分な重量およびサイズになるまで、増殖させる。一態様では、接種後１～１０週間にわたり、植物カルスを増殖させる（すなわち培養する）。次のステップは、フェノール化合物をカルスから取り出すことを伴う。一態様では、カルスを溶剤で浸軟して、浸軟物にする。次にフェノール化合物を取り出すために、浸軟物を溶剤で抽出する。抽出溶剤は、過酷な溶剤でなく、一般に環境に優しい。一態様では、抽出溶剤はアセトンである。本明細書に記載される装置およびフェノール化合物抽出を使用して、カルスを生成する例示的な方法は、実施例に提供される。

【００８１】

一態様では、植物カルスから生成されるフェノール化合物は、薬学的用途で有用であり得る。理論による拘束は望まないが、カルスから生成されるフェノール化合物は、不純物がより少なく、したがって薬学的用途のために精製するのがより容易であろう。

【００８２】

別の態様では、上述の植物カルスを栽植して成長させ、果実および葉を有する植物に成熟させ得る。一態様では、フェノール化合物は、本明細書に記載される装置を接種して、多糖類（例えばキトサン）に任意選択的に接触させた植物カルスから栽培された植物から、単離し得る。一態様では、フェノール化合物は、本明細書に記載される装置を用いて栽培された植物の果実、種子、または葉から取り出し得る。一態様では、本明細書に記載される装置を接種したカルスから栽培されたカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）の果実および葉は、フェノール化合物の豊かな供給源を提供する。カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）の果実および種子からフェノール化合物を単離する例示的な方法は、実施例に提供される。

【００８３】

一態様では、本明細書に記載される装置の助けを借りて栽培された植物の果実、種子、および葉は、フェノール化合物で強化されたいくつかの食品の製造において有用であり得る。次に、消費者は、健康上の利点を提供するフェノール化合物のレベルが増大している天然製品を食べることになる。

【００８４】
一態様では、本明細書に記載されるような生物学的装置に接触させた、植物細胞、植物カルス、および／または植物によって産生されるフェノール化合物の量は、本明細書に記載されるような生物学的装置に接触させていない、その他の点では同一の植物細胞、植物カルス、および／または植物によって産生されるフェノール化合物の量よりも、１．１～４倍高い。
【００８５】
本明細書に記載される装置および方法はまた、植物の成長速度も高める。例えば本明細書に記載される装置および方法を使用して栽培された植物は、従来の圃場栽培で典型的に必要な３２週間と対比して、２～４週間で成長し得る。したがってより短期間でより大量の植物を収穫し得て、したがってより多くのフェノール化合物を生産し単離し得る。さらに本明細書に記載される装置および方法は、合成化学薬品の使用を必要とせず、野外でなく、閉鎖環境で使用し得る。したがって本明細書に記載される装置および方法は、植物を栽培して、望ましい代謝産物を顕著な量で生産する、用途の広いおよび費用効率が高い方法を提供する。
【００８６】
本明細書に記載される装置および方法はまた、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）の成長速度も高める。例えば本明細書に記載される装置および方法を使用して栽培されたカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）は、従来の圃場栽培で典型的に必要な３２ヶ月と対比して、２～４週間で栽培し得る。さらに本明細書に記載される装置および方法は、合成化学薬品の使用を必要とせず、野外でなく、閉鎖環境で使用し得る。したがって本明細書に記載される装置および方法は、植物を栽培して、望ましい代謝産物を顕著な量で生産する、用途の広いおよび費用効率が高い方法を提供する。
【００８７】
別の実施形態では、本明細書に記載される装置および方法によって生成される代謝産物を使用して、カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）が１つまたは複数の疾患に罹患するのを予防して、植物の物理的特性を高め得る。例えば代謝産物は、抗真菌剤として使用し得る。
【実施例】
【００８８】
以下の実施例は、本明細書で説明され特許請求される化合物、組成物、および方法をどのように生成して評価するかという、完全な開示および説明を当業者に提供するために提示され、純粋に例示的であることが意図され、本発明者らが彼らの発明と見なすものの範囲を制限することは意図されない。数字（例えば、量、温度など）に関して、正確さを保証するための努力がなされたが、いくらかの誤差および偏差は考慮されるべきである。特に断りのない限り、部は重量部であり、温度は℃でありまたは環境温度であり、圧力は大気圧前後である。記載される方法から得られる生成物の純度および収率を最適化するために使用し得る、例えば成分濃度、所望の溶剤、溶剤混合物、温度、圧力およびその他の反応範囲および条件などの、反応条件の多数のバリエーションおよび組み合わせがある。このようなプロセス条件を最適化するためには、妥当で日常的な実験法のみが必要であろう。
【００８９】
ＤＮＡコンストラクトの調製
ＤＮＡコンストラクトは、本明細書に記載される遺伝子要素から構成され、プラスミドベクター（例えばｐＹＥＳおよびｐＢＳＫＩＩ）に構築された。実験的実験室手順は、（Ｇｉｅｔｚ，Ｒ．Ｄ．ａｎｄ　Ｒ．Ｈ．Ｓｃｈｉｅｓｔｌ，２００７，Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，”Ｑｕｉｃｋ　ａｎｄ　ｅａｓｙ　ｙｅａｓｔ　ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｕｓｉｎｇ　ｔｈｅ　ＬｉＡｃ／ＳＳ　ｃａｒｒｉｅｒ　ＤＮＡ／ＰＥＧ　ｍｅｔｈｏｄ，”２：３５－３７）に従った。ＤＮＡコンストラクトは、本明細書に記載される遺伝子要素から構成され、プラスミドベクター（例えばｐＹＥＳおよびｐＢＳＫＩ

Ｉ）に構築された。所望の特性がある遺伝子および／またはタンパク質の配列は、ＧｅｎＢａｎｋ中で同定され；これらはヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子を含んだ。これらの配列は、ＣｌｏｎｅＴｅｘ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）によって合成された。例えば、プロモーター遺伝子（例えばＰＡＬプロモーター）、レポーター遺伝子（例えばシアン蛍光レポータータンパク質）、ターミネーター配列、および調節タンパク質（例えばリボソーム結合部位）をはじめとする、その他の遺伝子部分もまた、ＤＮＡコンストラクトに組み入れるために入手された。プラスミドベクターへの挿入を容易にするために、これらの遺伝子部分は、制限酵素認識部位を含んだ。

【００９０】

特異的配列プライマーおよび標準増幅法を用いて、標準５３３２エッペンドルフサーモサイクラー（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ Ｎｏｒｔｈ Ａｍｅｒｉｃａ．１０２ Ｍｏｔｏｒ Ｐａｒｋｗａｙ，Ｈａｕｐｐａｕｇｅ，ＮＹ，１１７８８）を使用して、ＰＣＲを使用してＤＮＡ濃度を高めた（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｅ．Ｆ．Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｔ．Ｍａｎｉａｔｉｓ．１９８９．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄ．，ｖｏｌ．１．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．）。制限酵素および試薬（ＰＣＲマスター混合物、制限酵素：ＸｈｏＩ、ＫｐｎＩ、ＸｂａＩＥｃｏＲＩ、ＢａｍＨＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ、アルカリホスファターゼ、および迅速ライゲーションキット、全てＰｒｏｍｅｇａから得られる）を使用する、消化およびライゲーションを使用して、ＤＮＡ合成部分の構築を確実にした。ＮａｎｏＶｕｅ分光光度計（ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用し、２８０ｎｍと２６０ｎｍにおける吸光度の比率を使用するＵＶ／可視分光光度計もまた使用して、ＤＮＡを定量化した。最終ライゲーションを確認するために、標準Ｔｈｅｒｍｏ ＥＣ－１５０動力源を使用して、電気泳動によってＤＮＡを視覚化し精製した。

【００９１】

ＤＮＡコンストラクトは、例えば、リボソーム結合部位、天然および構成的プロモーター、レポーター遺伝子、および転写ターミネーターまたは停止部位などの発現に必須の遺伝子部分をはじめとする、３０ｂｐ～１０００ｂｐの異なる配列サイズを有する異なる遺伝子部分から作成された。主鎖プラスミドおよび合成インサートは、ライゲーションの目的で、１：１、１：２、１：３、１：４、および最大で１：５の範囲の異なる比率で共に混合し得て、評価された。一態様では、主鎖プラスミドと合成挿入断片の比率は、１：４である。ＤＮＡコンストラクトを含んでなるベクターを作成した後、得られたベクターを下述の方法を使用して、宿主細胞に組み込み得る。

【００９２】

フェノール化合物誘導のためのＤＮＡコンストラクト（「フェノールＤＮＡ」）は、（１）ＰＡＬプロモーター（配列番号１）、（２）ヒスチジン／フェニルアラニンアンモニアーリアーゼ（配列番号５）を発現する遺伝子、（３）リボソームスイッチＲｐｏＳ（配列番号１１）、（４）リボソーム結合部位（配列番号８）、および（５）ターミネーター（配列番号１０）の順で遺伝子要素を有するプラスミド（ＰＢＳＫＩＩ）を構成することで、構築された。特定の実施形態では、リボソーム結合部位とターミネーターの間に、蛍光を生じるレポータータンパク質（配列番号１５）を付加し得る。蛍光の量は、組織および培地中の代謝産物生産に相関する。このフェノールＤＮＡを下述するように細胞に形質転換して、生物学的装置を作成した。フェノールＤＮＡを含有するプラスミドは、図１に示される。

【００９３】

宿主細胞精製および形質転換

酵母形質転換のために、確立された実験手順に従った（Ｇｉｅｔｚ ａｎｄ Ｓｃｈｉｅｓｔｌ、２００７を参照されたい）。酵母（サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＡＴＣＣ２００８９２）または大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（商標）からの

ＴＯＰ１０またはＤＨ１０Ｂ（商標）化学的コンピテント細胞）またはバチルス・プミルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｕｍｉｌｕｓ）（ＡＴＣＣ８４７１）などの細菌細胞をフェノールＤＮＡで形質転換した。宿主細胞は、場合によっては、果実および植物組織から内部寄生菌として単離された。果実および植物組織を層流キャビネット内の完全無菌条件下で消毒して、エタノール（７０％）溶液に２分間、次に次亜塩素酸ナトリウム（５％）中に２分間入れて、次に無菌蒸留水で３回水洗した。消毒サンプル希釈物およびサンプル切片を細菌および酵母のための異なる選択的および非選択培地に入れて、嫌気的または好気的条件下に置いた。培養後、異なる細菌および酵母を単離した。病原性アッセイ後、病原性の低い細胞を植物組織誘導のための理想的宿主細胞として選択した。選択された細胞は、リボソームＲＮＡ遺伝子配列決定によって同定した。同定された細菌は、ＡＴＣＣから購入された。

【００９４】

形質転換は、製造会社のプロトコルに従って進めた。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）の場合、化学転換を実施した。Ｇｉｅｔｚ，Ｒ．Ｄ．　＆　Ｒ．Ｈ．Ｓｃｈｉｅｓｔｌ，２００７で開示される方法によって、酵母装置をコンピテントにして、形質転換した。バチルス・プミルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｕｍｉｌｕｓ）の形質転換は、３．９秒間にわたり１．２５Ｖ／ｍｍを使用して、コンピテント細胞を電気穿孔し、３０℃で１時間にわたり、２５０ｍＭのスクロース、１ｍＭの$MgCl_2$、および５ｍＭの$MgSO_4$で強化された、１ｍｌのチオグリコレートブロスを用いて細胞を回収し、アンピシリン添加Ｍｕｌｌｅｒ　Ｈｉｌｔｏｎ寒天上に播種することで、達成された。細胞は、０．５ＭのＨＥＰＥＳ、０．５Ｍのスクロース、８０％グリセロール、および２５ｍＭの$MgCl_2$を含有する電気穿孔緩衝液を用いて、新しい化学的処理調製物によってコンピテントにした。無菌条件下、４℃の温度で一晩培養後、ペレット化した細胞に緩衝液を添加した。ペレットを遠心分離して、緩衝液で３回洗浄し、等分して、即座に使用し、または－８０℃で貯蔵した。

【００９５】

ＤＮＡ発現および形質転換有効性は、２０／２０照度計（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、製造会社によって提供されるプロトコルに従って、蛍光ユニット（ＦＳＵ）で表される、形質転換細胞の蛍光によって判定した。４５０／６００ｎｍの波長を使用する青色蛍光モジュールを使用して、形質転換の有効性を評価した。プラスミドＤＮＡ抽出物精製、ＰＣＲ、およびゲル電気泳動もまた使用して、形質転換を確認した。

【００９６】

異なる形質転換装置が得られた。全ての形質転換細胞または装置について、異なるタイプの蛍光レポータータンパク質（黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、およびシアン蛍光タンパク質）を使用した。しかしシアン蛍光タンパク質が好ましかった。蛍光レポータータンパク質が構築されない場合、蛍光は観察されなかった。

【００９７】

キトサン

キトサンは、ランダムに分布したβ－（１－４）－結合Ｄ－グルコサミンとＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミン残基から構成される、天然直鎖多糖類化合物である。キトサンを生成するために、最初に甲殻類（例えばエビおよび／またはカニ）の外骨格からキチンを抽出した。サンプルを無機酸（ミネラル除去のため）、水酸化ナトリウム（タンパク質除去のため）、および有機溶剤（脂質とその他の疎水性成分除去のため）を用いて、様々に処理した。水酸化ナトリウムを再度使用して、キチンを脱アセチル化して、キトサン（およそ７０～８０％のアセチル化度）を生成した。ここでキトサンを氷酢酸に溶解し、１％濃縮物として使用した。

【００９８】

成熟ココア（カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）果実をカルス発生のための胚細胞原料として使用した

石鹸水溶液と、それに続く１５分間にわたるヨウ素溶液（３ｍｇ／Ｌ）処理を使用して、成熟ココア果実を最初に表面消毒した。次に、ココア種子（子実）をエタノール溶液（

７０％）で３分間処理し、それに続いて次亜塩素酸ナトリウム溶液（１％）で１０分間処理することで、種子の消毒を実施した。最後に、種子を無菌蒸留水で３回洗浄した。表面消毒処理は、無菌条件下の層流キャビネット内で実施した。

【００９９】

表面滅菌後、以下のようにして、特定の組織培養培地中で種子（子実）にカルス誘導を実施した（Ｍｕｒａｓｈｉｇｅ，Ｔ．ａｎｄ Ｓｋｏｏｇ，Ｆ．”Ａ ｒｅｖｉｓｅｄ ｍｅｄｉｕｍ ｆｏｒ ｒａｐｉｄ ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ ｂｉｏａｓｓａｙｓ ｗｉｔｈ ｔｏｂａｃｃｏ ｔｉｓｓｕｅ ｃｕｌｔｕｒｅｓ，”Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉａ Ｐｌａｎｔａｒｕｍ，１９６２，Ｖｏｌ １５：４７３－４９５を参照されたい）。消毒ココア種子を無菌条件下で胚細胞抽出に供し、無機塩類および微量元素を含有してミオイノシトール（１００ｍｇ／Ｌ）およびスクロース（３０ｇ／Ｌ）で強化されジェランガム（２．４（ｇ／Ｌ）をゲル化剤とする、増殖培地（ＭＳ）に移した。ココア外植片を暗所で７日間にわたり、２２～２４℃で培養した。培養期間後、上述の培地と同じ成分タイプであるが、異なる濃度のオーキシン（成長ホルモン２，４－Ｄ）を含有する栄養培地中で、４つの異なる濃度（０、０．１、０．５、１．０、および２．０ｍｇ／Ｌ）を使用して、ココア胚細胞を継代培養した。１００日間にわたって２２～２４℃で、３つの複製および１０個の実験単位を用いるランダム実験デザインを使用した。

【０１００】

研究では、カルスを培養するための標準培地を使用した（表１）。主要培地は、スクロース添加（３０ｇ／Ｌ）標準ＭＳ培地をベースとして調製された。培地はジェランガム塩基（２．４（ｇ／Ｌ）を含み、ｐＨ５．８で調製された。全ての培養カルスは、暗所において２５℃で培養した。データは、ＡＮＯＶＡおよび有意性レベルをはじめとする、統計学的分析にかけた。

表 1:ココアカルス誘導培地の組成

塩溶液	原液濃度 (g/L)	原液容積 (mL/L)	最終濃度 (mg/L)
NH_4NO_3	82.50	20	1650
KNO_3	95.00	20	1950
H_3BO_3	1.24	5	6.20
KH_2PO_4	34.00		170
KI	0.166		0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.05		0.25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.005		0.025
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	88.00	5	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	74.00	5	370.0
$MnSO_4 \cdot H_2O$	3.38		16.9
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.72		8.6
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$*	0.005		0.025
$Na_2 \cdot$ EDTA	7.45	5	37.25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.57		27.85
ミオイノシトール	20	5	100

【０１０１】

成長調節物質を使用してカルスの細胞質量を増大させる

０、０．１、０．２、０．５、１、２、４、ｍｇ／Ｌをはじめとする、異なる濃度のカイネチンを評価した。カイネチンはまた、２ｍｇ／Ｌの濃度の２，４－Ｄありまたはなしで使用した。カルスの増殖を１００日後に評価して、異なるパラメータを使用して、カルスの離解％および高さおよび直径をはじめとする、カルス増殖に対する成長調節物質の効果を判定した。１０個の実験単位と共に、ランダム二因子デザインを使用した。各実験は、３回反復した。全ての実験は、上述したような組織培養標準法に従って実施した。

【０１０２】

研究では、可能なポリフェノール化合物の生産との関連で、カルスの発達に対する効果を判定するために、日齢の異なるココアの３つの異なるクローン（表２）を使用した。

表 2.日齢の異なるココアの異なるクローンを使用して、カルス発達を誘導した。

ココアクローン (品種)	ココア果実日齢 (日)
CCM 51	40
	80
	120
TSH 565	40
	80
	120
ICS 60	40
	60
	120

【０１０３】
カルス発達に対するココア果実の表現型および日齢の影響
表３は、発達初期段階におけるカカオカルスの増殖刺激に対する、２，４－Ｄの好ましい効果を示す。２ｍｇ／Ｌの濃度の成長調節物質２－４－Ｄは、ココアカルスにより大きな増殖を引き起こした。この効果は、使用されたココアの３つの表現型の全てで観察された。この好ましい効果はまた、成熟ココア果実でより大きかった（２０日齢）。

表 3.3 つの異なるココア表現型の初期カルス発達に対する、単独のまたはキトサンと組み合わせた 2,4-D 成長調節物質の効果。

処理 mg/L	カルス発達%
2,4 D (A)	
0 mgL^{-1}	7.63889
2 mgL^{-1}	22.9167
標準誤差	3.72678
キトサン (B)	
0.1 重量%	2.22222
0.02 重量%	8.05556
0.05 重量%	12.7778
0 重量%	38.0556
標準誤差	5.27046
日齢 (C)	
40 日	7.91667
80 日	13.3333
120 日	24.5833
標準誤差	6.45497
クローン (D)	
TSH	10.8333
ICS	14.5833
CCM	20.4167
EE	4.56762
A 因子	DS
B 因子	DS
C 因子	DS
D 因子	NS
ABC の相互作用	DS

【０１０４】

初期カルス増殖中にフェノール化合物を誘導するためのキトサンの使用

キトサン処理は単独で、カルス増殖の初期段階における、より高いポリフェノール化合物生産を引き起こした。この効果は、カルスが培養された寒天培地中で観察された。しかしこの効果は、カルス発達のより後の段階で（例えば３週間後）、より明白であった。

【０１０５】

キトサンは、１週間以内のカルス誘導と、２週間のカルス発達後におけるカルスの増殖およびフェノール化合物生産との双方で使用した。キトサンは、最初に、カルス増殖の誘導中に、および第１週中に、カルス細胞の凝集を刺激するために適用した。使用されたキトサンの濃度は、カルスクローンのタイプとサイズに左右された。したがって０、０．０２、０．０５、０．１、０．２、０．５、および１．０ｐｐｍの異なる濃度のキトサンを使用した。キトサンは、ペトリ皿内の培地に添加した。キトサンはまた、既述の濃度（０、０．１、０．２、１、および２ｍｇ／Ｌ）の従来の成長調節物質２，４－Ｄありまたはなしで使用した。

【０１０６】

キトサンはまたフェノール化合物の生成を高めるために、２週間のカルス発達後に使用した。キトサンは、拡散または注入によって適用した。カルスのサイズに応じて、１０μＬ、５０μＬ、１００μＬ、および１ｍＬをはじめとする、異なる容積のキトサン溶液を使用した。

【０１０７】

フェノール装置のカルスへの接種

ココア（カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）から作成された３週齢のカルス体細胞に、２種のフェノール装置を接種した。フェノール装置による処理に先立って、カルスを０．１％のキトサンで前処理した。カルスは、増殖の初日から１、２、３、４、５、および６週齢をはじめとする異なる増殖段階で使用され、５週齢カルスが好ましかった。選択されたカルスに、作成から４８時間目のフェノール装置を接種した。異なる希釈のフェノール装置（すなわち10^3、10^4、10^5、10^6、および10^9細胞／ｍＬ）が使用され、10^3、10^6、および10^9細胞／ｍＬが好ましかった。１０、５０、１００、３００、または５００μＬをはじめとする、異なる容積装置を使用して、拡散または注射によって、カルスへの細菌装置の接種が実施され、１５０μＬの容積を使用する注射による接種が好ましかった。（１）ＰＡＬ＋ＰＡＬプロモーター＋リボソーム結合部位＋転写停止部位の配列を含有する、形質転換Ｂ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）（フェノール装置ＩＩ）、および（２）＃１と同一であるが、蛍光性のレポータータンパク質が付加されて、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で構築されたもの（フェノール装置Ｉ）の２つの細菌装置を評価した。

【０１０８】

フェノール装置をカルスに接種した後、フェノール化合物をはじめとするポリフェノール化合物の生成についてカルスを評価した。異なるパラメータを使用して、カルス中のポリフェノール化合物の生成を評価した：

１．サイズおよびバイオマス重量によって判定されるカルスの増殖。

２．カルスの色およびテクスチャ。これは、裸眼での直接観察および写真観察によって判定された。

３．ポリフェノール化合物をはじめとするフェノール化合物の生成。これは下述の標準手順に従って、カルスが培養された寒天培地中のフェノール化合物の存在によって、および抽出とＨＰＬＣ定量化による化学分析的によって判定された。

４．カルスを接種するのに使用された形質転換細菌の濃度はまた、コロニー形成単位（ＣＦＵ）の計数などの標準微生物学的方法、および６００ｎｍの波長に設定されるＵＶ／可視分光光度計を使用した測定光学濃度（ＯＤ）によって判定された。

【０１０９】

全ての実験は、３～６個の複製で実施した。平均値および標準偏差（ＳＤ）は、各実験について計算された。

【０１１０】

カルス中のポリフェノール化合物の生成を評価するのに使用された主なパラメータは、次のとおりであった：

１．カルスの増殖。これは、バイオマス重量およびカルスサイズを判定することで実施した。

２．無菌条件下で触ることによるカルスのテクスチャ。
３．カルスの色。この発達段階では全てのカルスは褐色であったので、これは淡褐色から暗褐色の間の相対的任意観察尺度によって実施した。この段階で、写真を撮影した。
４．フェノール化合物をはじめとするポリフェノール化合物の生成は、抽出または消化によって判定し、ＨＰＬＣによって定量化した。カルスが培養される寒天培地中の茶色がかった色の存在観察もまた、フェノール化合物をはじめとするポリフェノール化合物の生成の指標として記録した。
５．カルス接種に使用されたフェノール装置の細菌細胞濃度の判定。これは、必要な場合は希釈して、コロニー形成単位（ＣＦＵ）を測定する標準微生物学的方法によって、および／または６００ｎｍにおける光学濃度（ＯＤ）分光光度法によって実施した。
６．これらのパラメータの評価は、毎日および／または毎週実施した。フェノールＤＮＡ　ＰＡＬタンパク質、および／またはフェノール化合物をはじめとするポリフェノール化合物の生成に関与するタンパク質をコードするその他の遺伝子を含有する装置の遺伝的適応度を評価するために、装置の全ＤＮＡおよびＲＮＡ、および蛍光もまた判定した。標準分子生物学および合成生物学手順が使用された（Ｃｕｅｒｏら　”Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｅｄ　Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｓｅｎｓｏｒ　ｔｏ　Ｅｎｈａｎｃｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｍｅｔａｌｓ”Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０１２，Ｖｏｌ　１５８：１－７）。

【０１１１】
ポリフェノール化合物生成に関与するタンパク質および／または酵素の発現は、リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲおよび２Ｄ　ＤＩＧＥ分離と、それに続く質量分光分析の双方によって判定された。

【０１１２】
図２～５および表４は、それぞれ大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）およびＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）細菌中のベクターｐＹＥＳ中のＰＡＬ遺伝子およびその他の遺伝子部分の構築効率を示す。数値は、最終的にカルスに接種されるフェノール装置の大量の増殖を示す。したがってフェノール装置（すなわちコロニー）のより大きな増殖は、ポリフェノール化合物生成に関与するタンパク質ＰＡＬのより大きな発現を表す。図３および表４は、ポリフェノール化合物の生成に関連するタンパク質の高い生成を裏付ける。図３中のより明るい点は、いくつかのタンパク質の発現を表し；これらのタンパク質は表４に記載される。

【０１１３】
フェノール装置ＩおよびＩＩは、対照（形質転換なしの大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）またはＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ））よりも高いポリフェノール化合物誘導を示した。ｑＰＣＲからの結果は、対照（非形質転換細菌）と比較して、細菌装置（形質転換細菌）中における、より高いフェノール化合物生成とより高い遺伝子発現の間の相関を裏付ける。

【０１１４】
図３および下の表は、対照（ＰＡＬ遺伝子またはその他の構築遺伝子部分を含有しない細菌を接種したカルス）と比較して、タンパク質ＰＡＬおよびその他の遺伝子部分を用いて構築された細菌装置を接種したカルス中における、遺伝子およびタンパク質発現およびフェノール化合物生成の間の高い相関を示す。下の表はまた、ＰＡＬタンパク質を含有するフェノール装置中におけるＤＮＡの、特にフェノール化合物生成関連タンパク質をコードする遺伝子の、より高い発現も示す。同様に、図３および表４は、フェノール化合物生成関連タンパク質のより高い発現を示す。

表 4.未処置ココアカルス中のフェノール化合物生成と比較して、PAL タンパク質によって構築されたフェノール装置中で高度に発現され同定されたタンパク質。

タンパク質/酵素	機能
GroEL	植物ストレスに関与するタンパク質複合体。
サブチリシン	ペプチド結合を切断し、その他のタンパク質の合成に関与する非特異的プロテアーゼ。
カルボキシエステラーゼ	エステルおよびアミド基の加水分解を触媒し;芳香族化合物の代謝にもまた関与する。
ORF6	植物-細菌相互作用、共生、接合、および遺伝子調節に関与するチオエステラーゼ。
2-ケト-3-デオキシ-D-アラビノヘプツロソン酸-7-リン酸シンターゼ	ホスホエノールピルビン酸とエリスロース-4-リン酸との縮合を通じて、芳香族アミノ酸の生合成開始を触媒する。
アントラニル酸ホスホリボシル-トランスフェラーゼ	トリプトファン合成の初期反応を触媒し;5-ホスホリボシル-α-ピロリン酸の 1 つの分子と、アントラニル酸の 1 つの分子とを縮合して、無機リン酸を放出する。
α-L-アラビノシダーゼ	α-L-アラビノフラノシドを加水分解するグリコシダーゼ;微生物に対する植物の応答機序にもまた関与する。
推定キチナーゼ	グリコシド結合切断に関与して、二次代謝産物の生成との関連で、植物細胞から炭水化物を放出できるようにする。

表 5.対照(非形質転換 B.プミルス(*B.pumilus*))と比較した、B.プミルス(*B.pumilus*)フェノール装置からの RNA 生成。測定は 260/280nm の分光光度計内で実施した。

サンプル	未希釈 RNA (ng/mL)	A260	A280	260/280
対照	74.3	0.223	0.112	1.99
実験的	488.8	0.611	0.295	2.07

表 6.PAL タンパク質をコードする遺伝子の発現を示す、タイム PCR(qPCR)結果(標準化)。

遺伝子	対照	実験的
PAL	1	1.27

【０１１５】

ココアカルス中のフェノール化合物誘導に対するフェノール装置濃度の効果

本明細書で開示される方法の効力は、異なるフェノール装置集団を使用多場合でも、明らかに観察された。６×１０^{5}、２×１０^{4}、１×１０^{3}、、および１００細胞／ｍＬをはじめとする、異なる濃度の細菌装置が使用された。しかし最初の３つの希釈液が、ココアカルス中のフェノール化合物生成誘導において最も効果的な濃度であった。

【０１１６】

図２、３、および５は、ココアカルスの増殖およびフェノール化合物生成の双方に対する、１０^{3}、１０^{6}および１０^{9}細胞／ｍＬの濃度における、ＰＡＬ配列があるＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）フェノール装置の強力な効果を示す。同様に、１０^{6}細胞／ｍＬの濃度でＰＡＬ配列を含有する大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）フェノール装置は、ココアカルスの増殖およびフェノール化合物生成の双方に対する、強力な効果を示した。フェノール化合物の存在は、寒天表面で肉眼で見られ、カルス中の濃度は、ＨＰＬＣによって容易に定量化し得る。

【０１１７】

ココアカルスからのポリフェノール化合物の抽出および定量化

ポリフェノール化合物をはじめとするフェノール化合物抽出の標準プロトコルに従った。Ｆｏｌｉｎ－Ｃｉｏｃａｌｔｅａｕ法（Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ，ＶＬ，Ｏｒｔｈｏｆｅｒ，Ｒ，Ｌａｍｕｅｌａ－Ｒａｖｅｎｔｏｓ，ＲＭ．，１９９９，”Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｏｔａｌ ｐｈｅｎｏｌｓ ａｎｄ ｏｔｈｅｒ ｏｘｉｄａｔｉｏｎ ｓｕｂｓｔａｎｃｅｓ ａｎｄ ａｎｔｉｏｘｉｄａｎｔｓ ｂｙ ｍｅａｎ ｏｆ Ｆｏｌｉｎ－ｃｉｏｃａｌｔｅａｕ ｒｅａｇｅｎｔ，”Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，２９９：１５２－１７８； Ｅｂｅｌ，Ｊ．，１９８６，”Ｐｈｙｔｏａｌｅｘｉｎ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：ｔｈｅ ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｒ ｔｈｅ ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｐｒｏｃｅｓｓ，”Ａｎｎ Ｒｅｖ．Ｐｈｙｔｏｐａｔｈｏｌ．２４：２３５－２６４；Ｍａｎｓｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ｗ．，１９８３，”Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，”Ｉｎ：Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｌａｎｔ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ，Ｅｄ：Ｊ．Ａ．Ｃａｌｌｏｗ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｌｔｄ．Ｐｐ．２３７－２６５）。ＨＰＬＣ法を使用して、ポリフェノール化合物をはじめとするフェノール化合物を同定し定量化した（Ｃ．Ｓｔａｌｉｋａｓ，２００７，”Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ，Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｈｅｎｏｌｉｃ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｆｌａｖｏｎｏｉｄｓ，”Ｊ．Ｓｅｐ．Ｓｃｉ．，３０：３２６８－３２９５）。

【０１１８】

フェノール／ポリフェノール化合物の抽出および定量化は、細菌装置ありまたはなしでの１５日間の処理後にカルス上で以下のように実施された：

１．５０％、６０％、７０％、８０％、９５％異なる濃度のアセトンと混合されたカルスバイオマスの浸軟、７０％が好ましかった。

２．５０、９０、１００、２００、および３００ｒｐｍをはじめとする異なる振盪速度で、上記からの液体抽出物を電気的に均質化し、９０ｒｐｍが好ましかった。

３．濾過および遠心分離。遠心分離を９０００ｒｐｍ、４℃で、１０分間実施した。

４．溶液から残留アセトンを排除するために回転蒸発を実施し、したがってＨＰＬＣによるフェノール／ポリフェノール化合物の最終分析のための水溶液を得た。

５．ＨＰＬＣによるフェノール／ポリフェノール化合物の同定および定量化。

【０１１９】

抽出されたポリフェノール化合物は、最初に、ＵＶ／可視分光光度計を使用してＦｏｌｉｎ－Ｃｉｏｃａｌｔｅａｕ法によって定量化され、結果は、バイオマス中の没食子酸（ＧＡ）乾燥重量を基準にして、脂肪質なしで表された。

【０１２０】

逆相ＨＰＬＣを使用したポリフェノール化合物の同定および定量化

ＨＰＬＣ法を使用して、抽出フェノール化合物に対してポリフェノール化合物の同定を実施した。ＨＰＬＣ分析では、異なるフェノール化合物標準物質を使用した。ＨＰＬＣ中の標準物質の滞留時間を、これもまた同様のＨＰＬＣ動作可能条件下でＨＰＬＣに注入された抽出フェノール化合物の滞留時間と比較した。次に、フェノール化合物標準物質と、カルスから抽出されたフェノール化合物の定量的結果を比較した。コーヒー酸、カテキン、ｐ－クマル酸、没食子酸、ｐ－ヒドロキシ安息香酸、およびバニリン酸をはじめとする、異なるポリフェノール化合物標準物質を使用した。

【０１２１】

ＨＰＬＣ較正の標準操作手順に従って、ＨＰＬＣの内部検量線のために、上述のフェノール化合物を使用した。フェノールサンプルおよび標準物質は、ＨＰＬＣに注入する前に濾過した。１０μＬの注入容積を使用して；各サンプル２つの複製を注入した。流速は１ｍＬ／ｍｉｎであり、検出器波長は２１０ｎｍであった。

【０１２２】

移動相Ａ：リン酸（０．１％）添加脱イオン水；移動相Ｂ：リン酸（０．１％）添加アセトニトリル。合計実行時間は３５分間であり、以下のように配分された：０～２２分間の９５％Ａ、５％Ｂ；２２～２９分間の９０％Ａ、１０％Ｂ；２９～３０分間の８０％Ａ

相、２０％Ｂ相；３０～３５分間の９５％Ａ、５％Ｂ。

【０１２３】

ココアカルスからのポリフェノール化合物の抽出、同定、および定量化

カルスからのポリフェノール化合物抽出は、より多くの植物バイオマスおよび脂肪質を排除する必要性がある、ココア種子を使用する従来法と比較して、より容易でありより費用効率が高かった。ほとんどのココア種子または子実は、抽出のためにより大量の化学溶剤の使用を要する、１３～５５％の脂肪質を含有する。しかし本明細書に記載される方法を使用したココアカルスからのポリフェノール化合物の抽出は、脂肪質の除去を必要としない。さらにカルスバイオマスは、ココア種子よりも小さく、より柔軟である。したがって本方法は、より費用効率が高く、より時間効率的が高く、よりエネルギー効率が高い（ポリフェノール化合物の抽出に加熱が必要でない）。

【０１２４】

ココア種子または子実からのポリフェノール化合物の分析はまた、ＵＶ／可視分光光度計を使用して、没食子酸相当量（ＥＡＧ）に基づいて、Ｆｏｌｉｎ－Ｃｉｏｃａｌｔｅａｕ法によっても実施した。したがって１００ｇサンプル乾燥質量あたりの没食子酸当量を基準にしてデータが提供され、カルスは、標準プロトコルに従ったポリフェノール化合物の分析前に、乾燥され微粉砕される。

【０１２５】

ココア種子または子実に、最初に（種子の４５～６５％を構成する）脂肪質除去を実施した。処理は、ｎ－ヘキサン溶剤を使用して実施した。標準手順を使用したポリフェノール化合物の定量化に対する干渉を回避するのに十分な脂肪を排除するために、脂肪質の抽出を３回実施した。

【０１２６】

以下に提供されるのは、本明細書で使用される例示的な抽出処理の説明である：

１．アセトン／水（７０：３０、６０：４０、５０：５０）の混合物による、ココア種子からのポリフェノール化合物の抽出、７０：３０が好ましい。

２．環境温度（２６℃）での振盪。

３．濾過；濾液を脱イオン水で洗浄し、次の段階のために保存する。

４．得られた材料に回転蒸発を実施してアセトン残渣を排除し、水溶液を生成する。

５．全ての溶液を体積基準で標準化し、Ｆｏｌｉｎ－Ｃｉｏｃａｌｔｅａｕ試験を実施して、上述したような分光光度計中で分析した。

６．精製サンプルを７６５ｎｍで分光光度計下で定量化した。

【０１２７】

ポリフェノール化合物のＦｏｌｉｎ－Ｃｉｏｃａｌｔｅａｕ分析を実施するために、ベールの法則を使用した２～１４ｐｐｍの濃度の没食子酸に基づく、標準曲線を実施した。

【０１２８】

ポリフェノール化合物の濃度は、０．９９９１５の相関係数（r^2）および１０．０９９に等しい定数ｋ１で、下の式を使用して、吸光度（Ａ）に基づいて分光光度法で判定した。Ａは、サンプルの吸光度である。

ｃ＝ｋ１×Ａ

【０１２９】

最終結果は、下の式を使用して、ポリフェノール化合物の百分率として表される。

$$\%\text{ポリフェノール} = \frac{\text{濃度}\left(\frac{mg}{L}\right) \times \text{容積} \quad (L) \times FD}{\text{サンプル重量} \quad (mg)} \times 100$$

ポリフェノール化合物の百分率は、上述したようにＥＡＧ／１００ｇサンプルで表される。得られたサンプル吸光度が、上述の没食子酸標準曲線と交差すれば、最終濃度が得られる。ＦＤは希釈係数であり、容積（Ｌ）はＦｏｌｉｎ－Ｃｉｏｃａｌｔｅａｕ分析で使用されたアリコートである。結果は、表７に提供される。

表 7.分光光度計分析後のココアカルス中のポリフェノール化合物濃度。

処理	ココアの品種	サンプル重量 (mg)	%総ポリフェノール類 (EAG/100g)	SD
対照カルス	ICS	512	7.35	0.03321
装置(コンストラクト PAL 10^9 B.プミルス(*B. pumilus*)	CCM	418	47.51	0.01848
ココア果実 1		10000	11.06	0.3564
ココア果実 3		10000	14.57	0.00434

注記:20 日間の増殖後、ココアカルスにフェノール装置(B.プミルス(*B.pumilus*))を接種した。分析は接種の 15 日後に実施した。

【０１３０】

逆相ＨＰＬＣによるポリフェノール化合物定量化

ポリフェノール化合物標準物質の純度に基づく標準曲線を使用して、それらの滞留時間（ＲＴ）を判定することで、ポリフェノール化合物のＨＰＬＣ分析および定量化を実施した。結果は、ココアカルスサンプルからの遊離ポリフェノール化合物の高い生産量と純度を示す。

【０１３１】

以下のように、逆相ＨＰＬＣによる分析において、各ポリフェノール化合物毎に、５つの異なる濃度を使用した：

１．各標準物質の滞留時間は、ＨＰＬＣによって判定した。

２．その他の化合物のいくつかは、いくらかの分子類似性を示すので、関心のあるポリフェノール化合物が、その他の化合物によって隠蔽されないことを確実にするために、ポリフェノール化合物標準物質の混合物もまた、ＨＰＬＣに通過させた。

３．ココアカルスから抽出されたサンプルを精製し、次にＨＰＬＣによって分析した。

４．データは、カルスからの抽出物の希釈、ＨＰＬＣによって得られた濃度、および注入されたサンプルの希釈を勘案して、分析した。以下の式を使用した：

$$\%\text{フェノール酸} = \frac{\text{濃度 } HPLC\ \left(\frac{mg}{L}\right) \times \text{容積}\,(L) \times FD}{\text{サンプル重量}\ \ (mg)} \times 100$$

５．結果は、対応する標準物質に関して表され、表８に提供される。

表 8.逆相 HPLC を使用したココアカルスからのポリフェノール化合物の定量化。

処理	ココア品種	p-クマル酸		没食子酸		p-ヒドロキシ安息香酸		カテキン		合計%平均	
		% p-CA	SD	%p-GA	SD	%p-HA	SD	%p-CAT	SD		SD
対照 (1)	ICS	1.37	0.81	0	0	1.93	0.03	0.36	0.17	0.85	0.33
対照 (2)	CCM 51	0.53	0.155	2.98	0.014	0.79	0.0091	0	0	1.43	0.0594
10^6 B.プミルス(*B.pumilus*) (3)	ICS	0	0	7.75	0	0	0	0	0	7.75	0
キトサン + PAL 10^6 B.プミルス (*B.pumilus*) (4)	TSH	0	0	0	0	2.18	0.0075	0	0	2.18	0.0075
PAL 10^6 B.プミルス(*B.pumilus*) (5)	CCM 51	2.51	0	7.75	0	0.8	0.0091	0	0	3.69	0.003
ココア 2	CCM 51	2.58	0.05	2.02	0.086	0	0	1.53	0.009	2.04	0.0489
ココア 3	ICS	8.4	7.49	0.97	0.14	1.58	0.01	2.77	0	3.43	1.9105

(1)処理対照 1=処理なしの ICS カルス単独

(2)処理対照 2=処理なしの CCM51 カルス単独

(3)カルス+装置 B.プミルス(*B.pumilus*)(10^6)

(4)カルス+装置 B.プミルス(*B.pumilus*)(10^6)+キトサン

(5)カルス+装置 B.プミルス(*B.pumilus*)(10^6)

注記:フェノール化合物の生成はまた、寒天中で ICS 品種のみを使用して測定した。1.17%(SD=5.05)の p-ヒドロキシ安息香酸のみが寒天中で生成した。

【０１３２】

ココア果実中のポリフェノール化合物の生体内抗菌性試験

目的は、ココアカルスから単離されたポリフェノール化合物が、果実を含むココア植物中で一般的疾患を防除する効力を実証することであった。４０日齢のココア果実に、ココア作物の一般的病原体である、真菌モニリオフトラ・ロレリ（Ｍｏｎｉｌｉｏｐｈｔｈｏ

ｒａ　ｒｏｒｅｒｉ）を接種した。上述したように、異なる濃度のポリフェノール化合物をココアカルスから抽出して、感染ココア果実中でＭ．ロレリ（Ｍ．ｒｏｒｅｒｉ）を防除するために使用した。

【０１３３】

標準手順に従って、ココア果実の表面をアルコール（７０％）および次亜塩素酸ナトリウム（１％）で消毒し、滅菌水で洗浄した。次に、以下のようにして、10^3胞子／ｍＬの希釈液を使用して、ココア果実にＭ．ロレリ（Ｍ．ｒｏｒｅｒｉ）溶液を接種した。

処理１：未処置ココア（対照）。

処理２：ココア果実＋真菌溶液。

処理３：ココア果実＋真菌溶液＋ポリフェノール溶液。

処理４：ココア果実＋ポリフェノール溶液のみ。

処理５：ココア果実＋フェノール溶液適用３日後に適用される真菌溶液。

【０１３４】

全ての真菌溶液を担体としてのポリソルベート２０溶液と混合し、それによってココア果実表面の真菌溶液拡散効力を確実にした。処理は、０．０２８ＥＡＧ／ｇのサンプルに相当する濃度のポリフェノール化合物溶液に、ココア果実を浸漬することで実施された。全ての処理を無菌デシケーターに入れて、２６℃および９９．７％相対湿度に設定した環境チャンバー内で１０日間培養した。

【０１３５】

フェノール装置を使用してカルスによって産生されるポリフェノール化合物は、ココア果実上で、Ｍ．ロレリ（Ｍ．ｒｏｒｅｒｉ）をはじめとする真菌増殖を効果的に防御した。処理は、ココア果実上であらゆる真菌増殖を完全に阻害し、鮮度および膨張などの果実の物理的特性もまた高めた。したがってフェノール装置によって産生されるフェノール化合物は、ココア果実の官能特性を高める。したがってポリフェノール化合物を使用して、果実の鮮度および／または官能特性を高めることで、ココアおよびあらゆるその他の果実の貯蔵品質を向上させ得る。

【０１３６】

カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）によるフェノール装置の取り込み

図６および下の表１０および１１は、本明細書に記載される方法を使用してココアからフェノール化合物を生成した結果を要約する。図６は、組織培養アッセイからのココア（カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスを示す。これらの実験では、フェノール装置ＩＩ（フェノールＤＮＡで形質転換されたＢ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ））を使用した。キトサンおよび装置ＩＩの使用は、ココアカルスのサイズを有意に増大させた。

【０１３７】

表１０は、細胞で処理されないカルス（対照）と比較した、ココア（カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスに注入されたフェノール装置ＩおよびＩＩのレポータータンパク質の蛍光を示す。蛍光は、微生物細胞が良好に形質転換して、フェノールＤＮＡが培養カルスに取り込まれたことを立証する。表１１は、ナノ分光法によって測定された、処理および非処理（対照）組織培養物のココア（カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）カルスから抽出された、ＲＮＡおよびＤＮＡ濃度を示す。濃度の差は、キトサンおよび／またはフェノール装置ＩおよびＩＩによる処理後の、組織植物成長に関連した遺伝子誘導、およびフェノール化合物の生成を実証する。結果は、ココアに存在する自然の細菌である、Ｂ．プミルス（Ｂ．ｐｕｍｉｌｕｓ）の宿主細胞としての使用の利点もまた示す。

表 10.形質転換細胞で処理されていないカルス(対照)と比較した、ココア(カカオ(*Theobroma cacao*))カルスに注入された形質転換細胞のレポータータンパク質の蛍光

	対照	装置 II による処理	装置 II + レポーターによる処理
蛍光(FSU) 平均 ± SD	0.2 ± 0.03	310 ± 16.4	498 ± 14.5

表 11.処理および非処理(対照)組織培養物のココア(カカオ(Theobroma cacao)カルスから抽出された RNA および DNA 濃度、ナノ分光法による測定。

	対照	フェノール装置 I による処理	フェノール装置 II による処理
RNA (μg/μL) 平均 ± SD	9.4 ±0.3	47.5 ± 1.5	52.3 ± 0.2
DNA (μg/μL) 平均 ± SD	3.2 ± 1.1	9.3 ± 1.3	10.9 ± 2

【０１３８】

本出願全体にわたり、様々な文献が参照される。これらの文献の開示は、本明細書に記載される化合物、組成物、および方法をより完全に説明するために、その内容全体を参照によって本出願に援用する。

【０１３９】

本明細書に記載される化合物、組成物、および方法に対する、様々な修正および変更が可能である。本明細書に記載される化合物、組成物、および方法のその他の態様は、本明細書で開示される化合物、組成物および方法の規格および実施の検討から、明らかになるであろう。規格および実施例は、例示的と見なされることが意図される。

【図１】

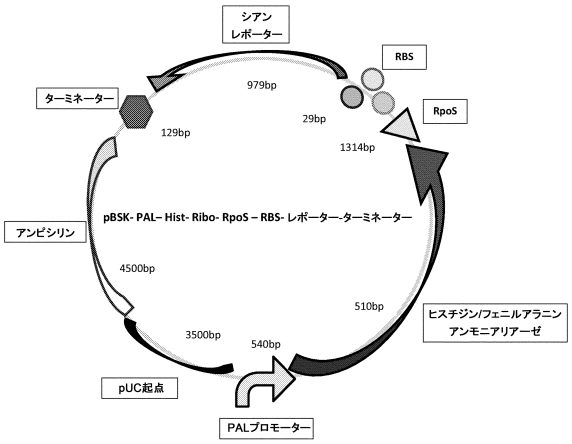

図1

【図２】

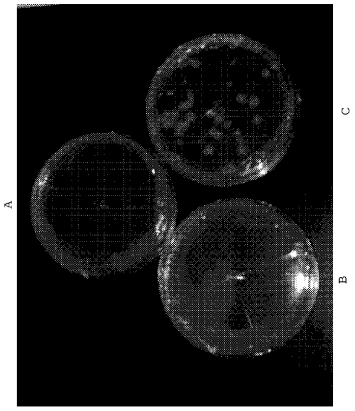

FIGURE 2

【図３】

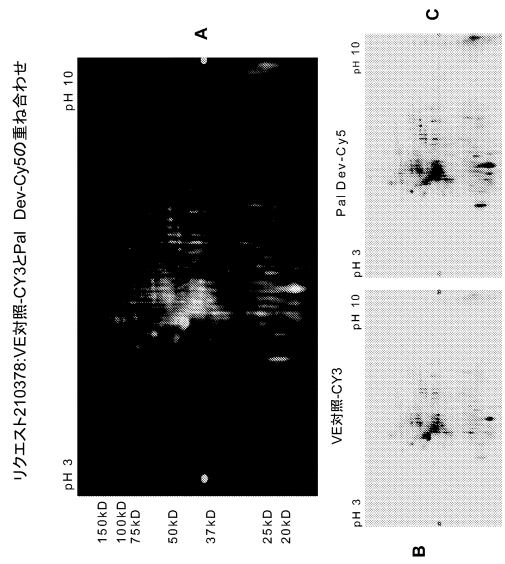

図3

【図４】

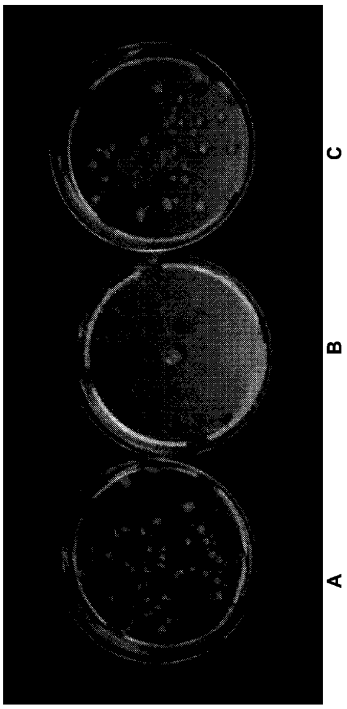

FIGURE 4

【図５】

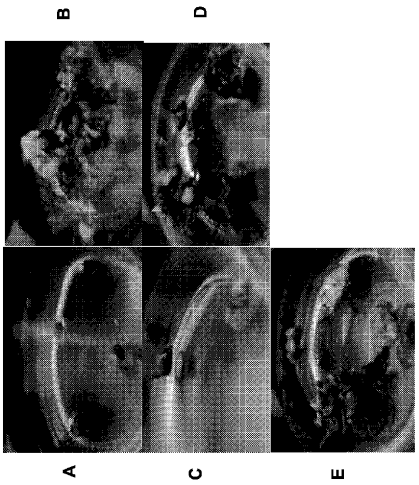

FIGURE 5

【図６】



図6

【配列表】

0006316810000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
A01H	*1/00*	*(2006.01)*	A01H	1/00	A
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10	

(72)発明者 クエロ レンジフォ, ラウル
アメリカ合衆国 テキサス州 ７７４３３, サイプレス, プレーリーヴィレッジ ７２１９

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 Plant Cell Tiss Organ Cult, ２００９年, Vol. 99, p. 287-298
山川隆, フェニルアントシアニンアンモニアリアーゼ遺伝子の導入によるストレス耐性植物の育成, １９９３年度実績報告書, １９９５年 2月 8日, ［平成２９年6月１９日検索］, ＵＲＬ, https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-05278212/052782121993jisseki/

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A01H 5／00
C12N 15／00
C12P 7／00
A01H 1／00
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）
ＦＳＴＡ（ＳＴＮ）
ＴＯＸＣＥＮＴＥＲ（ＳＴＮ）
ＡＧＲＩＣＯＬＡ（ＳＴＮ）