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

特許第3698722号

(P3698722)

(45)発行日　平成17年9月21日(2005.9.21)　(24)登録日　平成17年7月15日(2005.7.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12N 15/09	C12N	15/00	A
A01H 5/00	A01H	5/00	A
C12N 5/10	C12N	9/90	
C12N 9/90	C12N	5/00	C

請求項の数 16　(全 16 頁)

(21)出願番号	特願平6-519537
(86)(22)出願日	平成6年2月28日(1994.2.28)
(65)公表番号	特表平8-509861
(43)公表日	平成8年10月22日(1996.10.22)
(86)国際出願番号	PCT/EP1994/000575
(87)国際公開番号	WO1994/020627
(87)国際公開日	平成6年9月15日(1994.9.15)
審査請求日	平成13年1月10日(2001.1.10)
(31)優先権主張番号	9304200.0
(32)優先日	平成5年3月2日(1993.3.2)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者　501016559
シンジェンタ・パティシペーションズ・アクチェンゲゼルシャフト
Ｓｙｎｇｅｎｔａ　Ｐａｒｔｉｃｉｐａｔｉｏｎｓ　ＡＧ
スイス国，４０５８　バーゼル，シュバルツバルトアレー　２１５
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マンノースまたはキシロースに基づく陽性選択

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

少なくとも１種の化合物を含む培地上または中で培養された植物細胞集団から、形質転換の結果として代謝優勢を有する細胞を選択するにあたり、

ｉ)前記細胞を、マンノースホスフェートイソメラーゼまたはキシロースイソメラーゼをコードする領域をいずれかが含むヌクレオチド配列または共挿入ヌクレオチド配列で形質転換する、

ii)前記化合物が、マンノースまたはキシロースである、かつ

iii)前記化合物の細胞に対する毒性を低下および／または再生を促進させる薬剤を培地に添加すること、

を特徴とする方法。

【請求項２】

少なくとも１種の化合物を含む培地上または中で培養された、果実、圃場作物、小穀粒禾穀類(small grain cereals)および野菜から選択される植物細胞の集団から、形質転換の結果として代謝優性を有する細胞を選択するにあたり、

ｉ)前記細胞を、マンノースホスフェートイソメラーゼまたはキシロースイソメラーゼをコードする領域をいずれかが含むヌクレオチド配列または共挿入ヌクレオチド配列で形質転換する、かつ

ii)前記化合物がマンノースまたはキシロースである、

ことを特徴とする方法。

【請求項３】
該化合物がマンノースであり、ヌクレオチド配列または共挿入ヌクレオチド配列がマンノース－６－ホスフェートイソメラーゼをコードするものである、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
該化合物がキシロースであり、ヌクレオチド配列または共挿入ヌクレオチド配列がキシロースイソメラーゼをコードするものである、請求項１または２に記載の方法。
【請求項５】
ヌクレオチド配列(共挿入ヌクレオチド配列を含む。)の少なくとも１つが、当該配列が挿入された生物によって好まれるコドンが使用されて、修飾されたＤＮＡが前記生物中で発現されることにより、当該配列の酵素タンパク質コード成分が内因性である生物中において非修飾ＤＮＡの発現で得られたのと実質的に類似している酵素タンパク質を産生するように修飾されたＤＮＡを含むものである、請求項１～４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
化合物がマンノース、マンノース－６－ホスフェート、キシロースおよびＤ－マンノースアミンからなる群から選択される、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
該植物細胞が、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクタイルガンの使用、およびＲｉおよびＴｉプラスミドでの形質転換を含む既知の手段によって形質転換される、請求項１～６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
該植物細胞が、アグロバクテリウム種を使用して形質転換される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
形質転換細胞が陽性選択および陰性選択を組み合わせて選択されたものであり、当該形質転換細胞内のヌクレオチド配列は、毒素、抗生物質および除草剤からなる群から選択された少なくとも１つに対する耐性をコードする更なるヌクレオチド配列を共挿入されており、その中または上で細胞を培養する培地は形質転換細胞が耐性を有する毒素、抗生物質および除草剤からなる群から選択された少なくとも１つを含む、請求項１～８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
所望のヌクレオチド配列を、少なくとも２つの異なった選択遺伝子と共挿入する、請求項１～９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
毒性軽減剤がメチル－３－Ｏ－グルコースおよびフロリジンからなる群から選択されるものである、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
再生促進剤がシュークロースである、請求項１～１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
該植物細胞が、トマト、マンゴ、モモ、リンゴ、ナシ、イチゴ、バナナ、およびメロンから選択される、請求項１～１２のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】
該植物細胞が、キャノーラ、ヒマワリ、タバコ、シュガービート、トウモロコシ、およびワタから選択される、請求項１～１３のいずれかに記載の方法。
【請求項１５】
該植物細胞がコムギ、オオムギおよびイネから選択される、請求項１～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
該植物細胞がジャガイモ、ニンジン、レタス、キャベツおよびタマネギから選択される、請求項１～１５のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】
本発明は、その中に所望のヌクレオチド配列が挿入されている、遺伝子的に形質転換された細胞に、形質転換細胞に選択的優勢(selective advantage)を与えることにより選択する方法に関する。形質転換細胞が有する選択的優勢は、非形質転換細胞と比較して、栄養素、成長因子またはエネルギー源のような添加化合物の高められた利用能によるものであってよい。
遺伝子材料を形質転換により細胞集団中に挿入した場合、ある数の細胞しか形質転換が成功しないことは知られている。形質転換細胞の同定および分離は、伝統的に、形質転換細胞は生存および成育できるが、形質転換細胞がその形質転換によって寛容性である物質により非形質転換細胞は成育が阻害されまたは恐らく死滅さえする「陰性選択」を使用して成されている。
例えば、植物細胞集団が形質転換された場合、形質転換細胞の選択は、典型的には抗生物質または除草剤耐性を提供する「選択遺伝子」の存在に基づく。それ自身形質転換植物中では有用な機能を有しない可能性のある(実際植物中で望ましくない場合もあり得る)－選択遺伝子は、植物中に挿入すべき所望の遺伝子と両方の遺伝子が細胞集団内、または細胞の全ての形質転換の実行は、不可能でないにしても難しいため、むしろ細胞集団内のある程度に挿入されるように組み合わせて、または共挿入する。次いで、遺伝子的形質転換細胞は、選択遺伝子により耐性である抗生物質または除草剤を含む培地上または中で細胞を培養し、－抗生物質または除草剤耐性遺伝子を有しない－非形質転換細胞は成育阻害または死滅の対象となるため、それにより形質転換細胞を同定する。
これらの陰性選択法はある不利点を有する。例えば、非形質転換細胞は、成育培地中の抗生物質または除草剤の存在により死滅し得る。結果として、細胞集団がコヘレント(coherent)組織である場合、非形質転換細胞の死骸が形質転換細胞への栄養の供給を遮断し得るという事実のため、もしくは傷害を受けた末期の非形質転換細胞は有毒化合物を排出し得るため、非形質転換細胞だけでなく、形質転換細胞も死滅するという危険性がある。
陰性選択の他の不利点は、例えば抗生物質耐性を提供するような不必要な遺伝子の存在が望ましくない場合があり得る。植物および微生物に抗生物質耐性をコードする遺伝子を挿入することが安全か否かについて、環境保護グループおよび政府当局で懸念されている。この懸念は食用植物ならびに閉鎖環境中での使用のために設計されていない微生物(例えば農業で使用する微生物)および閉鎖環境の使用のために設計されているが、突発的にそこから放出され得る微生物について特に著しい。
陰性選択の他の不利点は、有毒物質で処理された植物組織または細胞は、細菌感染により感受性になるということである。これは、アグロバクター(Agrobacterium)が形質転換細胞として使用された場合、細菌成育を妨げるために抗生物質を使用したとしても、処理組織または細胞で細菌がはびこることがあるため、問題である。
加えて、陰性選択を使用した細胞または組織の選択は、選択工程に関して遺伝子を誘発する厳密なタイミングが必要である。無毒化遺伝子の発現前か、有毒化合物の作用を改善するために充分な遺伝子産物が産生される前にトランスジェニック細胞を有毒化合物で処理した場合、トランスジェニックおよび非トランスジェニック細胞の両方が死滅するであろう。もし選択が遅すぎれば、トランスジェニック細胞または組織の選択は、例えば、形質転換細胞を選択するために使用した化合物の浸透に対する障壁を形成する非トランスジェニック細胞または組織からの新芽またはカルス形成により妨げられ得る。
上記の不利点は、非形質転換細胞に障害を与えまたは死滅することなく、かつ抗生物質または除草剤耐性遺伝子の共挿入なく集団から遺伝子的形質転換細胞を同定および単離することを可能にした本発明の方法(「陽性選択」または組み合わさった「陽性／陰性」選択と命名)により、少なくともかなりの程度まで征服できる。抗生物質または除草剤耐性遺伝子の必要性を除いたという事実に加えて、本発明の陽性選択法は伝統的な陰性選択よりしばしば遥かに優れており、陽性および陰性選択の組み合わせは陰性選択単独使用で得られるより高くはなくても、同等なトランスジェニック新芽の選択頻度が得られる。更に、陽性選択の使用は、１個の遺伝子がレポーター遺伝子および選択遺伝子として使用され得

るため、ベクター構築物の単純化をもたらし、より安定な構築およびレポーターの発現と選択遺伝子の間の１００％の相関関係という利点を提供する。
選択化合物が、特定の基質上において挿入遺伝子の発現によりもたらされた遺伝子生産物の作用の結果産生され得るため、陽性選択は、タイミングに関する上記の問題を排除し得る。従って、選択化合物は選択遺伝子の発現の結果蓄積され得、充分な量の選択化合物が産生された場合、選択効果が現れる。
本発明により、少なくとも１種の化合物を含む培地上または中で培養された真核細胞集団から、形質転換の結果代謝優勢を有する細胞を同定または選択する方法を提供し、それは：
ｉ)前記細胞が(ａ)化合物の代謝に含まれるタンパク質をコードするか、および／または(ｂ)当該タンパク質をコードする遺伝子の活性を制御する領域を含むヌクレオチド配列または共挿入ヌクレオチド配列で形質転換されていること、および
ii)前記化合物がマンノースもしくはキシロースまたはそれらの誘導体または前駆体、または前記タンパク質の基質であるか、または形質転換細胞によりそのような基質に代謝される(ただし前記化合物は前記タンパク質がマンノース－６－リン酸イソメラーゼである場合、マンノースではない。)。
本発明は、更に少なくとも１種の化合物を含む培地上または中で培養された真核細胞集団から、形質転換の結果代謝優勢を有する細胞を同定または選択する方法を提供し、それは：
ｉ)前記細胞が(ａ)化合物の代謝に関与するタンパク質をコードするか、および／または(ｂ)タンパク質をコードする遺伝子の活性を制御する領域を含むヌクレオチド配列または共挿入ヌクレオチド配列で形質転換されていること、およびii)前記化合物の細胞に対する毒性を低下させる薬剤を培地に添加する。
好ましくは、毒性を減少させる薬剤を培地に添加する場合、化合物はマンノースであり、ヌクレオチド配列または共挿入ヌクレオチド配列はマンノース－６－リン酸イソメラーゼをコードする。
「代謝優勢」を有する細胞は、とりわけ、劣勢の細胞より早く成育することができ、および／または劣勢細胞が利用できない(栄養素前駆体等の)基質を有利に利用でき、および／または劣勢細胞に毒性またはそうでなければ成育阻害する基質を無毒化できる。
「化合物の代謝に関与する」タンパク質は、排他的ではないが典型的には、化合物またはその誘導体または前駆体の産生または利用を、直接または間接的に担い得る酵素である。タンパク質が化合物に結合し、化合物を細胞または組織または生物内の他の部位に移し、そうでなければ化合物を隔離し、それによりその局所能力を変えるのであれば、化合物の代謝にまた関与し得る。
「タンパク質をコードする遺伝子の作用を制御する」ヌクレオチド配列の領域は、プロモーターにより、またはそれによりプロモーター活性を有することにより、およびその近接部位内または近くに挿入することにより内因性遺伝子の発現のレベルを変え得る。「近く」は、１０，０００kbまでを意味する。別法として、間接制御は、ＲＮＡポリメラーゼの結合をタンパク質をコードする構造遺伝子のプロモーターに変え、または相補的結合を構造遺伝子の少なくとも一部分のヌクレオチド配列に変え、従って典型的には細胞中のタンパク質の量を減少することに起因し得る。
マンノースまたはキシロースの「誘導体」は、直接または間接的にマンノースまたはキシロースの代謝に関与する任意のタンパク質に利用され、結合し、基質になりまたは生産物であることができる任意の化合物を意味する。マンノースの場合、このような誘導体は、エピメラーゼ作用の対象となり、それによりマンノースまたは誘導体または前駆体が産生されるグルコースまたはガラクトースのような炭水化物を含むことは認められよう。「誘導体」は、残基が共有またはイオン結合している１個またはそれ以上の水酸基を有するマンノースまたはキシロースをまた含む。このような結合残基は、エステル、エーテル、アミノ基、アミド基、リン酸基、スルフェート基、カルボキシル基、カルボキシ－アルキル基およびそれらの組み合わせを含む。もし誘導体化がマンノースまたはキシロースを産生

するためにこのような方法での除去を担うのであれば、マンノースまたはキシロース誘導体は、マンノースまたはキシロース前駆体もまた含み得る。
本発明の明細書における「細胞」の語はプロトプラストを含み、「細胞集団」は組織、器官またはそれらの一部、基質中または上の個々の細胞集団または全生物、例えば植物を含む。
本発明は、本発明の方法を使用して選択された形質転換細胞および植物細胞のような形質転換細胞およびこのような細胞由来の植物、子孫または種子を含む。本発明の方法により選択し得る植物は：トマト、マンゴー、桃、リンゴ、ナシ、イチゴ、バナナおよびメロンを含む果実；キャノーラ、ヒマワリ、タバコ、サトウダイコンならびに小麦、大麦および米のような小穀粒穀物、トウモロコシおよび綿ならびにジャガイモ、ニンジン、レタス、キャベツおよびタマネギのような野菜を含む農地作物を含む。
特に好ましい植物はサトウダイコンおよびトウモロコシである。
イン・ビボでの本陽性選択法の使用は、形質転換細胞の選択を、隣接する非形質転換細胞を直接傷付けずに行うため、例えば全植物または植物部分(ここで、植物または部分は形質転換および非形質転換細胞を含むものである)上で行った形質転換に関して、特に適切である。このように、形質転換細胞は非形質転換細胞と比較して選択「優勢」を有する(例えば、新芽形成能力)が、抗生物質または除草剤を使用した陰性選択の場合のように、非形質転換細胞は傷害または死滅という意味で深刻な損失を被らない。
形質転換細胞が有する「選択優勢」は、形質転換細胞を、簡単な視覚的手段により、すなわちマーカー遺伝子の存在を測定するために別のアッセイーを使用する必要なく同定できるようにする差異または利点である。
細胞集団は、不活性であり得、直接または間接的に形質転換細胞中で活性化される少なくとも１種の化合物を含む培地上または中で培養し得、本化合物は、形質転換細胞を細胞集団から選択可能にするような選択優勢を提供するように、非形質転換細胞中で不活性または形質転換細胞中より非形質転換細胞中でのほうが活性が少ない。
細胞集団は、ヌクレオチド配列の発現または転写により形質転換細胞中で利用されるようになる化合物を含む培地上または中でまた栽培し得、本化合物は、形質転換細胞に選択優勢を提供するように、非形質転換細胞中で利用されず、または非形質転換細胞中であまり利用されない。
ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが形質転換細胞中で不活性化合物を直接活性化する場合、非形質転換細胞は、典型的には酵素であり得る上記ポリペプチドを一定量内因性に含むかまたは産生し得る。このような場合、「不活性化合物」は、化合物または栄養素が単に実質的に形質転換細胞中より、非形質転換細胞中で活性が低いだけで充分であり得るため、非形質転換細胞中で完全に不活性である必要はない。言い換えれば、形質転換細胞と非形質転換細胞の間の最初は不活性な化合物の活性化の量的差異が、選択の目的で充分であり得る。このような場合、天然酵素と競合する阻害剤または基質を、細胞に加え得る。特に好適には、阻害剤は天然酵素により活性化され、天然酵素が実質的に完全に阻害されるレベルまでの活性化阻害剤の産生の自己触媒をもたらす。
不活性化合物の「活性化」が、形質転換細胞による化合物の選択的取り込みを含み、非形質転換細胞による取り込みは、不可能であるか、少ない程度で行われるように、化合物の細胞膜の通過を可能にし、形質転換細胞内へ挿入させ、または他の(細胞小器官)膜を通過させるパーミアーゼまたは他の輸送因子をコードし得る共挿入ヌクレオチド配列で、細胞を形質転換し得る。細胞内への化合物の促進された取り込みの変わりに、共挿入ヌクレオチド配列は、その産生を、不活性化合物が位置する部位、例えば細胞質膜の外側または液胞中または小胞体へ代わりに向ける。
２種のヌクレオチドが細胞内へ共挿入される場所へ、細胞内の１つのヌクレオチド配列の存在が他の配列の細胞内の存在を示唆するかまたは存在の可能性を増大させる方法で所望により各々組み合わせてまたはそうでなければ一緒に挿入し得る。２個のヌクレオチド配列は、したがって、必須ではないが、典型的には同じ遺伝子構築物の一部であり、同じベクターを経由して挿入し得る。

挿入ヌクレオチド配列が形質転換細胞内で発現されることが必要であるため、２種のヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物は、典型的にはヌクレオチド配列の発現を可能にする制御配列、例えば既知のプロモーターおよび転写ターミネーターを一般的に含む。したがって、共挿入ヌクレオチド配列は、一般的には構造的または制御可能であり得るプロモーターと関連する。

本明細書に記載の方法は、２種のヌクレオチド配列が独立して挿入された場合も使用し得る。これは、例えば両方の遺伝子の取り込みのために同じ細菌を使用して、所望のヌクレオチド配列の相対的に多い数のコピーを細胞に取り込ませて行い得、それにより共挿入ヌクレオチド配列の発現を示す細胞がまた所望のヌクレオチド配列を含有し、発現する確立が相対的に高くなる。同じ細胞内での遺伝子の共発現をもたらす２個またはそれ以上の遺伝子の個々の挿入は、一般的に低い確実性が予期され、陽性選択法により得られる改善された選択頻度は、したがってこのような系で特に有利であると予期される。

選択の目的で使用される化合物は、加えて、陽性および陰性作用の両方を有し得る。例えば非常に高濃度のマンノースは殆どの植物にとって有毒であるが、マンノース代謝酵素を有している細胞においては陰性作用はなくなり、細胞はマンノースを炭水化物源として使用できるようになるという利点を更に得る。この場合、１個の化合物および１個の遺伝子が、共に複合陽性および陰性選択系を提供するが、このような系は、形質転換細胞内の化合物の陰性作用の阻害および化合物の陽性作用の明示を担う２個またはそれ以上の遺伝子と共に使用してまた確立し得る。

本方法の更なる態様において、ヌクレオチド配列の発現または転写が、形質転換細胞中における細胞集団に供給された化合物の代謝の阻止または化合物の合成の阻止をもたらし、それにより形質転換細胞が、非形質転換細胞から同定または選択できる。

本方法の更に別の態様において、形質転換細胞は、陽性選択および陰性選択を組み合わせて選択し得、形質転換細胞中のヌクレオチド配列は、毒素、抗生物質および除草剤からなる群から選択された少なくとも１つの要素に対する耐性をコードするヌクレオチド配列と共挿入され、細胞を培養する培地中または培地上に形質転換細胞が耐性を示す、毒素、抗生物質および除草剤からなる群から選択された少なくとも１つの要素を含有する。ヌクレオチド配列が、少なくとも２種の異なった選択遺伝子と共挿入されるのが好ましい。

化合物がマンノースまたはキシロースであるのが好ましい。上に示唆したように、化合物は、しかしながらマンノース誘導体、例えばマンノース－６－リン酸もしくはキシロースリン酸のようなキシロース誘導体もしくはマンノースまたはキシロース前駆体であり得る。

細胞は、その中に包含されるのが好ましい任意のヌクレオチド配列で形質転換し得る。このようなヌクレオチドは、ウィルス、真菌、細菌または線虫耐性を提供する遺伝子をコードし得る。

細胞は、化合物による形質転換細胞の選択が細菌による形質転換細胞の形質転換後感染の危険性を減少させる利点を有するように、化合物の感受性のアグロバクター種のような細菌により形質転換し得る。細胞を、電気泳動、顕微注射法、微小噴出ガン(micro-projectile gun)の使用ならびにＲiおよびＴiプラスミドでの形質転換を含む任意の好適な既知の手段で形質転換し得ることは認められよう。形質転換細胞は、好適な場合、組換ＤＮＡが安定にゲノム内へ取り込まれている全植物に再生し得る。

タンパク質は、好ましくはマンノースまたはキシロース代謝に関与する酵素である。このような酵素は、キシロイソメラーゼおよびマンノース－６－リン酸イソメラーゼおよびマンノース－１－リン酸－イソメラーゼのようなホスホマンノイソメラーゼ；炭水化物をマンノースへまたはマンノースをグルコースまたはガラクトースのような炭水化物に転換するようなマンノースエピメラーゼ；マンノース－６－ホスファターゼおよびマンノース－１－ホスファターゼのようなホスファターゼおよびマンノースまたは誘導体または前駆体の細胞内への輸送に関与するパーミアーゼを含む。

化合物の細胞への毒性を軽減する薬剤は、典型的にはメチル－Ｏ－グルコースまたはフロリジン(phloridzin)のようなグルコース誘導体である。

本発明は以下の文と図を組み合わせて考えて、更に明瞭になるであろう、その中で図は：
図１は、大腸菌(E.coli)ホスホマンノースイソメラーゼコード領域を含むＢＣｌ１/HindIII制限フラグメントの製造を示す；
図２は、プラスミドＥＰＬ(ピートルザック,Mら、Nucleic Acids Res.１４、５８５７～５８６８頁(１９８６))を示す；
図３はバイナリープラスミドｐＢＫＬ４(ニールセン,Ｋ.Ｋ.ら、Mol.Plant.Microbe Interact.６、４９５～５０６頁(１９９３))を示す；
図４は、ＧＵＳ遺伝子およびＮＰＴII遺伝子の間にマンＡ(man A)遺伝子を含むプラスミドｐＢＫＬ４を示す。

大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼコード配列含有バイナリーp(ＢＫＬ４－マンノース)の構築

大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼ(EC5.3.2.8)遺伝子は、プラスミドｐＧＳ６３(マイルス,Hら、Gene３２、４１～４８頁(１９８４))(図１)由来であり、構築物はｐＢＲ３２２由来であり、その中の独自のＰｓｔＩおよびHindIII部位の間の領域が、ホスホマンノースイソメラーゼの構造遺伝子(マンＡ)およびフマラーゼ(フムＡ(fum A))の隣接遺伝子のフラグメントを保持する大腸菌染色体の一部で置き換えられている。ｐＧＳ６３は、したがって、β－ラクタマーゼ遺伝子の部分を欠失しており、テトラサイクリン上で選択される。
完全なＰｓｔＩ/HindIII染色体フラグメントおよびｐＢＲ３２２の３５７bpセクションを含むＰｓｔＩ/ＢamＨＩフラグメント(２４６６bp)を、ｐＵＣ１８の多重クローニング部位にライゲーションし、ｐＤＯ１８を形成した(図１参照)。
ｐＤＯ１８をHindIIIで消化させ、残った休息３'末端をクレノーポリメラーゼを使用して満たす。HindIII部位(HindIII*)で満たされた開放ＤＯ１８プラスミド(図１参照)を、ＢcIIで消化させ、ホスホマンノースイソメラーゼコード領域を含む１２１８pbＢcII－HindIII*フラグメントを、最初にＳｍａＩおよび次いでＢamＨＩで消化させたプラスミド内へクローン化する。得られるプラスミドをp(ＥＰＬ－マンノース)と呼ぶ。
ｐＥＰＬは、ＣＡＴ遺伝子がＰｓｔＩにより除去されているＣａＭＶＣＮ(フロムら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA８２、５８２４頁(１９８５)；フロムら、Nature３１９、７１９頁(１９８６))から構築した。小リンカー(リンカー：ＰｓｔＩ－ＢamＨＩ－ＢaII－ＰｓｔＩ)を本プラスミドＰｓｔＩ部位に挿入し、ｐＬise(ｐＬ)と呼ぶプラスミドを得る。ｐＬは、HincIIおよびＢｇIIIで消化し、得られる３５ＳプロモーターおよびＮＯＳターミネーターを含むフラグメントを、ＥcoＲＶおよびＢｇIIIで消化した他のｐＬプラスミドにクローン化する。ＥcoＲＶおよびHincIIは、平滑末端部位である。得られる構築物をpEnhanced-Lise(ｐＥＬ)と呼ぶ。ｐＥＬは、変異体３５Ｓプロモーターをプロモーターの２５０bp上流の縦列複写と共に含むという点で、本質的にｐＣａＭＶＣＮと異なる。変異体３５Ｓプロモーターは天然３５Ｓプロモーター(ケーら、Science２３６、１２９９～１３０２頁(１９８７))の約１０倍高い転写活性を有する。ｐＥＬをＰｓｔＩおよびＢｇIIIで消化し、それによりＮＯＳターミネーターを除去し、ＣａＭＶターミネーター(ＤＷ２t)を代わりに挿入する。最後に、リンカー(ＰｓｔＩ－ＢamＨＩ－ＳｍａＩ－ＳacＩ－ＳaII－ＳphＩ)を促進された３５ＳプロモーターおよびｃａＭＶターミネーターの間に位置するＰｓｔＩ部位に挿入する。本プラスミドをｐＥＰＬと呼ぶ(図２参照)。
p(ＥＰＬ－マンノース)を、完全促進３５Ｓプロモーター、大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼおよびＣａＭＶターミネーターコード領域を含むフラグメントを単離するためにHindIIIで消化した。単離フラグメントをバイナリーベクターｐＢＫＬ４のHindIII部位にクローン化する(図４)。得られるプラスミドをp(ＢＫＬ－マンノース)と名付ける。ｐＢＫＬ４中のHindIII部位をカナマイシン耐性遺伝子およびβ－グルクロニダーゼ(ＧＵＳ)遺伝子の間に位置させる(図３)。マンノースキメラ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子(ＮＰＴII)およびＧＵＳ遺伝子は、各々プロモーターおよびターミネーターを有する。図４は、プラスミドｐＢＬＫ４のＧＵＳおよびＮＰＴII遺伝子の間に挿入されたキメラホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子を含むp(ＢＫＬ－マンノース)構築物を示す。

構築物p(ＢＫＬ－マンノース)を大腸菌から単離し、脱腕(dearmed)ヘルパープラスミドｐＡＬ４４０４(ヘーケマら、Nature３０３、１７９～１８０頁(１９８３)；オームスら、Plasmid７、１５～２９頁(１９８２))から成るアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)株ＬＢＡ４４０４内に、凍結融解法(ホルスターら、Mol.Gen.Genet１６３、１８１～１８７(１９７８))により形質転換する。

ホスホマンノースイソメラーゼをコードする構造遺伝子(マンＡ)の配列は、マイルスおよびゲストらにより公開されている(Gene３２、４１～４８(１９８４))。

無菌保存培養

ソラナム・ツベロサム(Solanum tuberosum)「サツルナ(Saturna)」「ビンチェ(Bintje)」または「ディアネラ(Dianella)」の新芽培養を、２μＭチオ硫酸銀を添加したＬＳ基質(下記参照)上に温度は２５℃で、培養を１６時間明／８時間暗のサイクルに付してリンスマイアーおよびスコーグ(Physiol.Plant.、１８：１００～１２７(１９６５))に記載のように維持する。保存培養を２０～４０日後副次培養する。葉は新芽から除去し、それぞれ１個の節を有するように節セグメント(約０．８cm)に切断した。

ジャガイモ組織の接種

共培養皿はＬＳ基質(シュークロース３０ｇ／ｌ)、寒天(８ｇ／ｌ)、２，４－ジクロロフェノキシ酢酸(２．０mg／ｌ)およびトランス－ゼアチン(０．５mg／ｌ)を含む。

約４０日令新芽培養由来の新芽(高さ約５～６cm)を節間セグメント(約０．８cm)に切断する。ジャガイモ細胞内に包含することを意図した遺伝子を含むバイナリーベクターを含むように形質転換されたアグロバクテリウム・ツメファシエンス含有液体ＬＳ－基質(ＬＳ－培地)内にセグメントを置く。このような遺伝子は、例えばβ－グルクロニダーゼ(ＧＵＳ)、抗生物質カナマイシンに対する耐性を提供するＮＰＴII遺伝子をコードするものおよび／またはマンノース代謝に関与するタンパク質、例えばマンノース－６－リン酸イソメラーゼ、マンノースエピメラーゼ、ホスホマンノースムターゼ等(下記参照)をコードする遺伝子を含む。アグロバクターは、好適な抗生物質(アグロバクター株の耐性遺伝子に対応)を含むＹＭＢ－基質(リン酸水素二カリウム(三水和物)(０．６６ｇ／ｌ)；硫酸マグネシウム(七水和物)(０．２０ｇ／ｌ)；塩化ナトリウム(０．１０ｇ／ｌ)；マンニトール(１０．０ｇ／ｌ)；および酵母抽出物０．４０ｇ／ｌ)中で一晩培養し、６６０nmの光学密度(ＯＤ－６６０)を約０．８にする。懸濁液を次いで遠心し、ＯＤ－６６０のを０．５にするために細胞をＬＳ－培地に再懸濁する。

上記の節間セグメントを、次いで再懸濁アグロバクターの懸濁液中で３０分インキュベーションし、次いで滅菌濾紙にブロットすることにより、セグメントから過剰の細菌を除去する。

新芽セグメントおよびアグロバクターの共培養

新芽セグメントを細菌と７２時間、白薄葉紙で覆ったペトリ皿中のＬＳ－基質(上記で定義の通り)中の濾紙上で共培養する。本基質を以後「共培養基質」と呼ぶ。基質およびセグメントを滅菌濾紙で覆い、ペトリ皿を２５℃に置き、１６時間明／８時間暗のサイクルに付す。

洗浄方法

共培養４８時間後、新芽セグメントを８００mg／ｌカルベニシリン添加ＬＳ－培地に移す。このように移したセグメントを、次いで穏やかに振り、付着アグロバクターを除去または破壊する。

形質転換組織の選択

このように洗浄したセグメントを、次いでトランス－ゼアチンの濃度が１mg／ｌである以外上記と同様であるＬＳ－基質に移し、基質にジベレリン酸(０．１mg／ｌ)およびカルベニシリン(８００mg／ｌ)および所望により硫酸カナマイシン(５０mg／ｌ)および／またはマンノース(０～２０ｇ／ｌ)および／またはシュークロース(０～２０ｇ／ｌ)を添加する。本基質を以後「選択／再生基質」と呼ぶ。

本セグメントを新鮮基質上で２週間間隔でまたは下記のように副次培養する。２～４週間内に新芽がセグメントから発生し、新しい新芽の形成を約３～４ヵ月続ける。

再生新芽の発根

再生新芽をカルベニシリン(５００mg／ｌ)を加えたＬＳ－基質から成る発根基質に移す。

再生新芽の土壌への植え変え

新規発根再生新芽(植物)(高さ約２～３cm)を発根基質から土壌に植え変え、１６時間明／８時間暗サイクルおよび２００～４００μＥ／sqm／秒の成育室に置く。植物が十分確立された場合、それらを温室に移し、そこでそれらを塊茎が発育し、植物の上部が老境を示すまで成育させる。

形質転換体の遺伝的同定の確認

再生新芽のトランスジェニック遺伝子型を：

(ａ)ラッドケら(Theor.Appl.Genet.７５，６８５～６９４(１９８８))記載のＮＰＴII測定を行う；または

(ｂ)ホダルら(Plant.Sci.８７，１１５～１２２(１９９２))に従った共挿入β－グルクロニダーゼ遺伝子による酵素発現におけるＧＵＳ測定を行う；または

(ｃ)マンノース代謝に関与する酵素、例えばホスホマンノースイソメラーゼをコードする挿入遺伝子のｍＲＮＡの発現を測定するまたは酵素の活性を測定する:ことにより確認する。

実施例１

再生植物を、新芽セグメントを細菌と共培養せず、その上で重要な洗浄工程を省く以外、上記のように産生する。実験開始４０日目まで再生新芽の数を測定する。表１は、アグロバクターで形質転換していないジャガイモ茎セグメント由来の新芽再生のマンノースによる阻害を示す。表１から、マンノースが有効にそのような新芽の再生を阻害し、シュークロースがそのような再生を促進することを見ることができる。一般にマンノースは、ほとんどの植物種において炭水化物源として使用されない。マンノースを植物に加えた場合、代謝され、マンノース－６－リン酸が蓄積される。マンノース－６－リン酸は、マンノース－６－リン酸イソメラーゼによりフルクトース－６－リン酸に変換され、その変換される量はイソメラーゼの活性に依存する。このようなフルクトース－６－リン酸は植物により利用されるが、実際高濃度のマンノースは植物にとって(代替炭水化物源が利用可能であってもなくても)有毒である。したがって、表１から見られるように、新芽形成は、シュークロースの利用能に拘わりなく、シュークロースが高濃度で存在している場合でさえ、マンノース濃度が５～１０ｇ／ｌの場合完全に阻害される。

表１マンノースによる非形質転換ジャガイモ茎セグメント由来の新芽再生阻害

ｼｭｰｸﾛｰｽ濃度(g/l)	ﾏﾝﾉｰｽ濃度(g/l)	再生新芽／外植体(%)
0	0	0
0	5	0
0	１０	0
0	２０	0
１０	0	５０
１０	5	3
１０	１０	0
１０	２０	0
２０	0	５３
２０	5	0
２０	１０	0
２０	２０	0

実施例２

再生植物を上記のように産生する。新芽セグメントと共インキュベーションするアグロバクターを、細菌がＧＵＳおよびマンノース－６－リン酸イソメラーゼコード遺伝子を含むベクターを有するように上記のようにして得られた構築物p(ＢＫＬ－マンノース)で形質転換する。

トランスジェニック(ＧＵＳ＋)新芽を、マンノースの新芽に対する毒性を減少させる薬剤(メチル－３－Ｏ－グルコース)の存在下でマンノース代謝能力を基本にして選択する。ＧＵＳ＋新芽を約５ｇ／ｌの濃度のマンノースの存在下での成育の能力を基本にして選択する。

新芽セグメントの形質転換に使用したアグロバクターがマンノース－６－リン酸イソメラーゼコード遺伝子を欠く以外p(ＢＫＬ－マンノース)と同様のベクターを有するものである対照実験をまた行った。再生形質転換新芽を５ｇ／ｌマンノースおよび２０ｇ／ｌシュークロース存在下で成育させた場合、ＧＵＳ＋形質転換体は得られなかった。

実施例３

新芽セグメントの形質転換に使用するアグロバクターがマンノース－６－リン酸イソメラーゼコード遺伝子を欠く以外p(ＢＫＬ－マンノース)と同様のベクターを有するものである更なる実験を行う。このようなベクターは、形質転換された細胞にカナマイシン耐性を与えるＮＰＴIIコード遺伝子を含む。したがって、ＧＵＳ＋形質転換体は、５０mg／ｌの濃度で存在するカナマイシンに対するそれらの耐性を基本にして選択する。この後者の選択において、選択された細胞の実施例２より低い割合がＧＵＳ＋である。

実施例４

アグロバクターをp(ＢＫＬ－マンノース)で形質転換し、ＧＵＳ＋形質転換体を、そのカナマイシン(５０mg／ml)上での成育の能力を基本にして選択する以外、実施例３を繰り返す。この場合、選択された新芽の実施例３より低い割合がＧＵＳ＋である。

実施例５

アグロバクターの接種および共培養工程を除く以外ＰＣＴ／９２／００２５２の実施例１３に記載のような標準葉ディスク法をタバコで行う。ベンジルアデニン(１mg／ｌ)をサイトキニンとして使用し、炭水化物含量を下記のようにする。各々の葉ディスクからの再生新芽の数を２１日後に記録する。

表２は、Ｄ－キシロースが、シュークロースが存在する場合、新芽再生を阻害しないこと、加えてＤ－キシロースは炭水化物源として使用されないことを示す。Ｄ－キシルロースは新芽再生の間の良好な炭水化物源である。

表２タバコ葉ディスクからの新芽再生の間、炭水化物源として作用するＤ－キシロースおよびＤ－キシルロースの能力の試験

キシロース g／l	シュークロース g／l	キシルロース g／l	各々の葉ディスクの再生新芽の数
0	0	0	0
１０	0	0	0
１０	１０	0	4.3
0	１０	0	2.3
0	0	１０	4.1
0	１０	１０	１１.７

キシロースはキシロースイソメラーゼによりキシルロースに変換できる。したがって、機能的キシロースイソメラーゼ遺伝子および好適なプロモーターおよびターミネーターの制御下にある更なる構造遺伝子を、植物、その部分またはそれらの細胞に挿入し、形質転換

植物、その部分またはそれらの細胞を、炭水化物源としてのキシロース代謝の能力を基本にして選択する。

実施例６

外植体は、選択／再生基質にカナマイシンおよびカルベニシリンを添加しない以外、上記の「形質転換組織の選択」に記載のように産生して処理し、植物を形質転換しない。したがって、副次培養は、下記に示唆する量でキシロースを添加する選択／再生基質へ、共培養基質から外植体を移された場合のみである。再生新芽の数は１２週間後に記録する。

表３ジャガイモ茎セグメントからの新芽再生の間、炭水化物源として作用するＤ－キシロースの能力の試験

キシロース g／l	シュークロース g／l	各々の茎セグメントの再生新芽の数
0	0	0
5	0	0
１０	0	0
２０	0	0
0	１０	6
5	１０	3
１０	１０	0
２０	１０	0

表３は、Ｄ－キシロースが(Ｄ－マンノースと比較して)、シュークロースが存在する場合、新芽再生の弱い阻害剤であり、更にＤ－キシロースはキシロース代謝酵素またはタンパク質の点では非形質転換である植物において炭水化物源として作用しないことを示す。更に、Ｄ－キシルロース(５ｇ／１)を、シュークロース非存在下で基質に加え、９週間後外植体当たり２．２新芽の再生が可能であった。

実施例７

選択／再生基質にメチル－３－Ｏ－グルコース(ＭＯＧ)を表４で示唆する濃度で加える以外、実施例５を繰り返す。生存外植体の割合を８週間後に記録する。

表４は、ＭＯＧによる共処理は、感受性植物組織におけるマンノースの毒性効果を阻害することを示す。炭水化物源として作用する化合物にとって最適の濃度でマンノースは毒性であるため、ＭＯＧの添加は、マンノースの形での最適炭水化物源を基質に添加することを可能にする。これは、他の炭水化物源非存在下での陽性選択剤としてのマンノースの利用を可能にする。

表４メチル－Ｏ－グルコース(ＭＯＧ)の共処理によるマンノース毒性の阻害

マンノース(g/l)	0	5	１０	0	5	１０
ｼｭｰｸﾛｰｽ(g/l)	0	0	0	１０	１０	１０
ＭＯＧ(g/l)						
0	７１	4	0	１００	1	4
5	１３	５４	0	１００	１００	5
１０	４７	８２	9	１００	１００	４１
２０	５０	９８	８８	１００	１００	１００

実施例８

再生／選択基質がマンノース(１５ｇ／ｌ)および下記表５に示唆する濃度のメチル－３－Ｏ－グルコースを含み、シュークロースを含まない以外、実施例７を繰り返す。形質転換植物材料はマンノース－６－リン酸イソメラーゼ遺伝子についてトランスジェニックである。２１日後、選択した新芽を回収する。全ての回収した新芽で、共挿入β－グルクロニダーゼ遺伝子の発現を測定し、外植体当たりのトランスジェニックβ－グルクロニダーゼ発現(ＧＵＳ＋)新芽の全数(２回の収穫で)を、選択新芽の全数中のβ－グルクロニダーゼ発現(ＧＵＳ＋)新芽の関数として計算する(表５)。

表５は、マンノースがメチル－３－Ｏ－グルコースと共に添加された場合、トランスジェニック新芽の選択は、他の炭水化物源非存在下で、マンノースの高い濃度でさえ可能であることを示す。

表５シュークロース非含有マンノース含有基質上におけるトランスジェニックの選択におけるメチル－３－Ｏ－グルコースの効果

マンノース(ｇ／ｌ)	１５	１５	１５	１５	１５
ＭＯＧ(ｇ／ｌ)	０	２.５	５.０	１０	１５
GUS＋新芽／外植体	０	０.２	１.０	０.５	０.６
GUS+新芽/選択新芽(%)	０	５７	８１	８９	５３

実施例９

ＭＯＧをフロリジンに変える以外、実施例８を繰り返す。表６は、マンノースをフロリジンと共に加えた場合、１００％トランスジェニック新芽の選択が、他の炭水化物シュークロース非存在下で高濃度のマンノースで可能であることを示す。炭水化物輸送阻害剤の添加により、いかに交差摂食およびエスケーパーの産生を最小にできるかという例である。

表６

０.５ｇ／ｌフロリジン				
g/lﾏﾝﾉｰｽ	ＧＵＳ＋新芽／選択新芽		ＧＵＳ＋新芽／外植体	
	＋ｼｭｰｸﾛｰｽ	－ｼｭｰｸﾛｰｽ	＋ｼｭｰｸﾛｰｽ	－ｼｭｰｸﾛｰｽ
５.０	９４.０％	１００.０％	１.２	０.０８
７.５	８８.０％	７８.５％	０.５	０.５
１０.０	１００.０％	９５％	０.５	０.５
１２.５	１００％	－	０.０３	０.０
１５.０	１００％	－	０.０３	０.０

実施例１０

表７は、マンノース以外の化合が、とりわけ大腸菌由来のマンノース－６－リン酸イソメラーゼ遺伝子を含むトランスジェニック植物において選択薬剤として使用し得ることを示唆する。

表７マンノースに加えて化合物により選択された外植体当たりの再生新芽の数

外植体当たりの再生新芽の数		
化合物	遺伝子型	
	野生型	M-6-P-イソメラーゼ
Ｄ－マンノース	0	1.1
Ｄ－マンノースアミン	0	0.8
Ｄ－マンノース－６－リン酸	0	0.7

実施例１１

葉柄を含む子葉を外植体として使用しているＰＣＴ特許出願場番号ＰＣＴ／ＤＫ９２／００１０８に記載のいわゆるコットーペット(cot-pet)法により、サトウダイコンを形質転換する。苗木は、４～７週間１２℃で、１６時間昼／８時間夜の体制で発芽および成育させた種子由来である。子葉は、節の下２～３mmを切断し、離し(tawn apart)、暗い中または明るい中で、キシロース存在下または非存在下に培養する。表８は、光の存在下ではサトウダイコンはキシロースを炭水化物源として使用するが、暗い中では使用しないことを示し、とりわけキシロースイソメラーゼ遺伝子に対してトランスジェニックであるサトウダイコンのキシロース基本陽性選択は、暗い中で行うべきであることを示唆する。

表８

光有りまたは無しでシュークロースと組み合わせたＤ－キシロースのサトウダイコンにおける作用の試験				
3週間後(明)の結果				
D-キシロース（ｇ／ｌ）	シュークロース（ｇ／ｌ）	新芽を伴う外植体(%)	重量(湿)（ｇ）	緑(%)
0	10	98	7.41	100
0	0	13	0.64	60
10	0	90	1.53	90
10	10	97	5.47	100
2週間暗および1週間明の後の結果				
D-キシロース（ｇ／ｌ）	シュークロース（ｇ／ｌ）	新芽を伴う外植体(%)	重量(湿)（ｇ）	緑(%)
0	10	50	1.38	97
0	0	0	0.36	47
10	0	13	0.37	77
10	10	80	0.89	97

実施例１２

とりわけマンノース－６－リン酸イソメラーゼ遺伝子についトランスジェニックな外植体を産生し、選択／再生基質に、表９に示唆するようにマンノースおよびシュークロースを添加する。再生新芽の数を１１週間後に記録する。表９は、メチル－３－Ｏ－グルコース含有基質上での再生新芽の数を、マンノースおよびメチル－３－Ｏ－グルコース非存在下の基質上の新芽再生の数に対するパーセントとして示す。

表９

メチル－３－Ｏ－グルコース（ｇ／ｌ）					
マンノース	シュークロース	野生型		マンノース-6-ホスホイソメラーゼ	
ｇ／ｌ	ｇ／ｌ	２．５	５．０	２．５	５．０
０	０	０	０	０	０
５	０	０	０	７	０
１０	０	０	０	６４	２８
２０	０	０	０	１０７	１２８
０	１０	５３	１７	０	０
５	１０	６	４１	６４	６４
１０	１０	０	０	８６	３６
２０	１０	０	０	２００	８６

シュークロース(１０ｇ／ｌ)含有、マンノース非含有およびメチル－３－Ｏ－グルコース非含有基質上での新芽の再生：

形質転換組織：１．４新芽／外植体

野生型組織：１．７新芽／外植体

本発明が、上記の実施例に限定されないことは認められよう。例えば、マンノースまたはキシロース代謝、もしくはマンノースまたはキシロース誘導体もしくはマンノースまたはキシロース前駆体の代謝に関与する酵素をコードする遺伝子の特異的発現組織は、上記酵素のモジュレーターの基質にそれらを暴露することによりこのような組織の成育制御の調節に使用し得る。更に、マンノースまたはキシロース(それらの誘導体または前駆体を含む)は、このようなキシローウまたはマンノースまたはそれらの前駆体又は誘導体の代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含むように形質転換された選択的優勢穀物に対して選択的除草剤として使用し得る。

本発明の方法の使用は：

ｉ)例えばホスホマンノースイソメラーゼコード遺伝子の挿入により、全般にまたはある組織／細胞型においてフルクトース－６－リン酸またはそれらの誘導体の濃度が減少した真核生物；

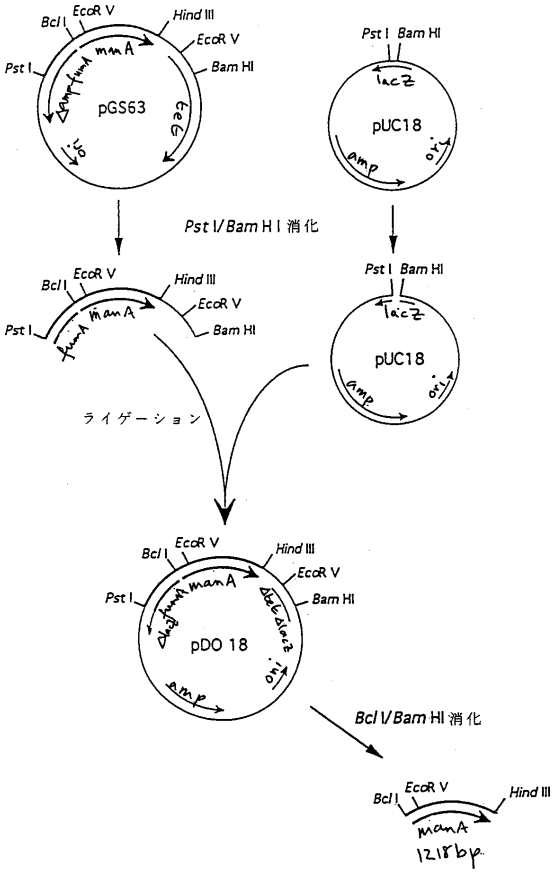
ii)例えばホスホマンノースイソメラーゼコード遺伝子の挿入により、全般にまたはある組織／細胞型においてマンノース－６－リン酸またはそれらの誘導体の濃度が増加した真核生物；

iii)細胞内にホスホマンノースイソメラーゼコード遺伝子を挿入したことにより、全体またはある細胞型のホスホマンノースイソメラーゼ活性が増加した、真核生物：

を産生することもまた認められよう。

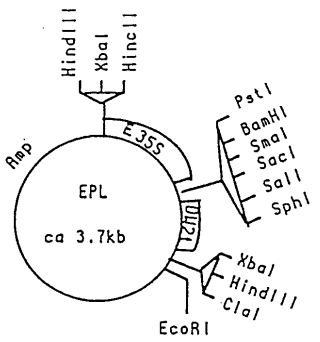
【図１】

Fig 1



【図２】

Fig 2

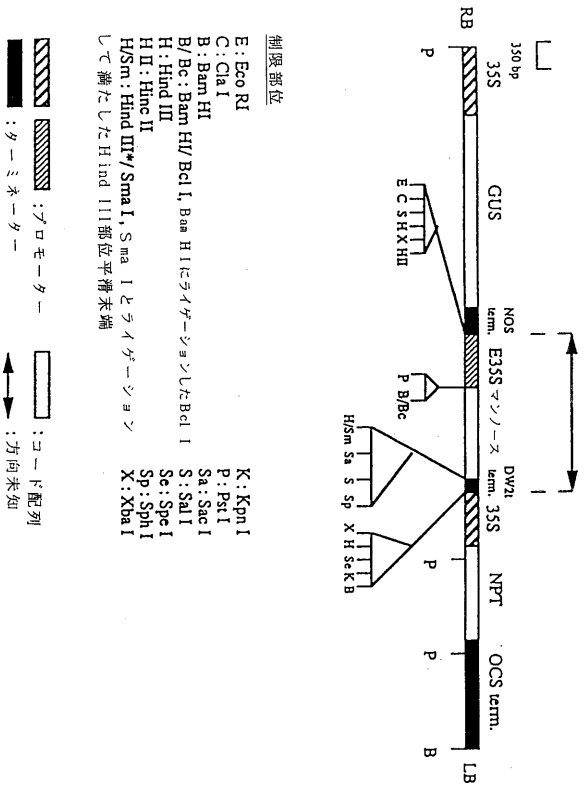


プラスミドEPL

ＤＷ２ｔ：ｐＤＷ２プラスミドから単離されたＣａＭＶターミネーター
ＰｓｔーＫｐｎＩフラグメント

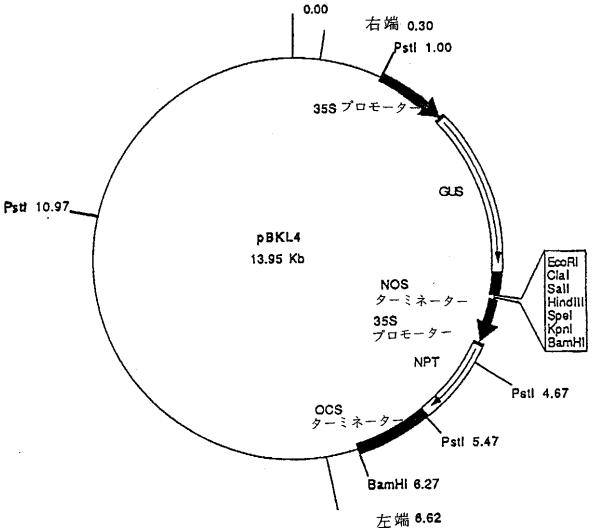
【図３】

Fig 3



【図４】

Fig 4



フロントページの続き

(74)代理人 100116311
弁理士 元山 忠行
(74)代理人 100122301
弁理士 冨田 憲史
(72)発明者 ボイセン、キアステン
デンマーク国デーコー－３４５０アレレズ、ヴィーゼフ－スヴァイ１３番
(72)発明者 ドナルドソン、イアイン
イギリス国オーエックス１４ １ワイイー、オックスフォードシャー、アビンドン、スペンラブ・クローズ１３番
(72)発明者 ハルルップ、アンナ
デンマーク国デーコー－２８６０ソボー、ゴアキス・アレー１８番
(72)発明者 イェアスボー、モーテン
デンマーク国デーコー－４８００ニーケビング・ファルステア、フォーレマーケン２１番
(72)発明者 クレイベアウ、イェッテ・ディーナ
デンマーク国デーコー－４０００ロスキレ、ドマーヴェンゲット１６デー番、１ヴェー
(72)発明者 ニールセン、ヨーン
デンマーク国デーコー－２３００コペンハーゲン・コー、コンゲディブスアレー１番、３ホー
(72)発明者 オケルス、フィン・ティーゲ
デンマーク国デーコー－４０００ロスキレ、コンゲマーケン１１番
(72)発明者 ペーターセン、ステーン・グルアイアー
デンマーク国デーコー－２６１０ロズオウア、レーセンブローヴァイ３２アー番

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 米国特許第０４８５７４６７（ＵＳ，Ａ）
欧州特許出願公開第００３０３７８０（ＥＰ，Ａ１）
国際公開第９３／０５１６３（WO，Ａ１）
Nature(1989), Vol.342, p.837-838
Plant Molecular Biology(1992), Vol.18, p.363-375
J.Biol.Chem.(1990), Vol.265, p.19082-19090
J.Bacteriol.(1991), Vol.173, p.6849-6858

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
C12N 5/10
A01H 5/00