

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4727043号
(P4727043)

(45) 発行日 平成23年7月20日 (2011. 7. 20)

(24) 登録日 平成23年4月22日 (2011. 4. 22)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 15/00 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 0 3
A O 1 H 5/00 (2006. 01)	A O 1 H 5/00 A
C 1 2 P 23/00 (2006. 01)	C 1 2 P 23/00

請求項の数 22 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2000-603389 (P2000-603389)	(73) 特許権者	503188346
(86) (22) 出願日	平成12年3月3日 (2000. 3. 3)		シンジェンタ パーティシペイションズ
(65) 公表番号	特表2002-537841 (P2002-537841A)		エージー
(43) 公表日	平成14年11月12日 (2002. 11. 12)		スイス国, シーエイチー 4 0 5 8 バーセル, スクワーツワルダリー 2 1 5
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/001850	(74) 代理人	100079108
(87) 国際公開番号	W02000/053768		弁理士 稲葉 良幸
(87) 国際公開日	平成12年9月14日 (2000. 9. 14)	(72) 発明者	バイヤー, ペーター
審査請求日	平成19年1月15日 (2007. 1. 15)		ドイツ国, ディー 7 9 4 2 3 ハイテン
(31) 優先権主張番号	199 09 637.6		シェイム, イン
(32) 優先日	平成11年3月5日 (1999. 3. 5)		デア エツマット 1 0
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(72) 発明者	ポトリカス, イグノ
			スイス国, シーエイチー 4 3 1 2 マグデ
			ン, イム ステ
			イグラ 5 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物の農学的価値および栄養学的価値を改善するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カロテノイドを蓄積する植物細胞の産生方法であって、前記細胞はカロテノイドを通常は含まず、

(a) 該細胞中で機能的なプロモーター、及び該プロモーターの制御下に配置された植物由来のフィトエンシンターゼ遺伝子を含み、該細胞中でフィトエンシンターゼ産生することができる発現カセット、及び

(b) 該細胞中で機能的なプロモーター、及び該プロモーターの制御下に配置された細菌由来のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子を含み、該細胞中でフィトエンデサチュラーゼを産生することができる発現カセット

を含むヌクレオチド配列を含む単離された D N A 分子で植物材料を形質転換することを含む、方法。

【請求項 2】

前記フィトエンデサチュラーゼは、Erwinia uredovora の CrtI 遺伝子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記フィトエンデサチュラーゼは、安定な色素体トランジットペプチドと融合している、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記フィトエンデサチュラーゼは、組織特異的プロモーターまたは構成的プロモーター

の制御下で発現される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記フィトエンデサチュラーゼは、構成的プロモーターの制御下で発現される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記フィトンエンシンターゼは、組織特異的プロモーターの制御下で発現される、請求項 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記フィトンエンシンターゼは、*Narcissus pseudonarcissus* に由来する、請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記 DNA は、選択マーカーを提供するポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記植物材料は、前記 DNA を含む *Agrobacterium* により形質転換される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記植物細胞は、イネ植物細胞である、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞は、胚乳細胞である、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 12】

請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる形質転換植物細胞。

【請求項 13】

イネ胚乳細胞である、請求項 12 に記載の植物細胞。

【請求項 14】

(a) カロテノイドを通常は含まない植物細胞中で機能的なプロモーター、及び該プロモーターの制御下に配置された植物由来のフィトンエンシンターゼ遺伝子を含み、該細胞中でフィトンエンシンターゼ産生することができる発現カセット、及び

(b) 該細胞中で機能的なプロモーター、及び該プロモーターの制御下に配置された細菌由来のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子を含み、該細胞中でフィトエンデサチュラーゼを産生することができる発現カセット

30

を含むヌクレオチド配列を含む単離された DNA 分子。

【請求項 15】

前記フィトエンデサチュラーゼは、*Erwinia uredovora* の CrtI 遺伝子である、請求項 14 に記載の DNA 分子。

【請求項 16】

前記フィトエンデサチュラーゼは、安定な色素体トランジットペプチドと融合している、請求項 14 または 15 に記載の DNA 分子。

【請求項 17】

前記フィトエンデサチュラーゼは、組織特異的プロモーターまたは構成的プロモーターの制御下で発現される、請求項 14～16 のいずれか 1 項に記載の DNA 分子。

40

【請求項 18】

前記フィトエンデサチュラーゼは、構成的プロモーターの制御下で発現される、請求項 17 に記載の DNA 分子。

【請求項 19】

前記フィトンエンシンターゼは、組織特異的プロモーターの制御下で発現される、請求項 14～18 のいずれか 1 項に記載の DNA 分子。

【請求項 20】

前記フィトンエンシンターゼは、*Narcissus pseudonarcissus* に由来する、請求項 19 に記載の DNA 分子。

50

【請求項 2 1】

前記 DNA は、選択マーカーを提供するポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 4 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の DNA 分子。

【請求項 2 2】

前記ヌクレオチド配列は、植物中での発現に最適化されている、請求項 1 4 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の DNA 分子。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、植物細胞、種子、組織、および全植物体を形質転換する分野に関する。さらに詳細には、本発明は、植物の農学的価値および栄養学的価値を改善するために、その植物材料に、カロテノイド生合成経路に特有の酵素の 1 または複数をコードする組換えヌクレオチド配列を挿入することに関する。

10

【0 0 0 2】

発明の背景

プロビタミン A (β-カロテン) 欠乏症は、主食またはほとんど唯一の主食として米を食べて生きている世界人口の一部において重篤な臨床症状につながる非常に重い健康上の問題である。東南アジアだけで、毎年、5 百万人の子供が眼疾患である眼球乾燥症を発症し、このうち 2 5 万人が最終的に盲目になると見積もられている (Sommer, 1988; Grant, 1991)。さらに、ビタミン A 欠乏症は死亡の決定要因ではないが、下痢、呼吸疾患、および小児期の疾患 (例えば、麻疹) などの死に到る可能性のある苦痛の罹患率増加と相関している (Grant, 1991)。UNICEF によりまとめられた統計によれば、プロビタミン栄養の改善により、1 ～ 4 歳の子供で毎年 1 0 0 万 ～ 2 0 0 万件の死亡を、学童期ではさらに 2 5 万 ～ 5 0 万件の死亡を防ぐことができた (Humphreyら, 1992)。これらの理由から、主食中のカロテノイド量を高めることが非常に望ましい。さらに、カロテノイドは、数種類のガンの予防の助けになることが知られており、ルテインおよびゼアキサンチンは網膜の黄斑変性を予防するという役割が証明されている (例えば、Brownら, 1988; Schalch, 1992 を参照のこと)。

20

【0 0 0 3】

さらに、カロテノイドは、ヒト用食品および動物用飼料ならびに医薬品の着色料として広範に使用されている。さらに、「機能性食品」に含まれる栄養補給化合物としてのカロテノイドの関心が高まっている。これは、カロテノイドの中には哺乳動物においてプロビタミン A 特性を示すもの (例えば、β-カロテン) もあるからである。

30

【0 0 0 4】

カロテノイドは、生合成前駆体イソペンテニル二リン酸から誘導される 8 個のイソプレン単位の縮合により形成される 4 0 炭素 (C₄₀) イソプレノイドである (図 1 を参照のこと)。命名法により、カロテノイドは、2 種類に分類される (すなわち、炭化水素からなるものをカロテンと呼ぶのに対して、酸化された誘導体をキサントフィルと呼ぶ)。植物におけるこれらの基本的な機能は、色素体の光合成装置における光酸化損傷から保護することである。さらに、カロテノイドは、光合成間の集光に関与し、光合成反応中心の必須成分である。カロテノイドは、植物ホルモンであるアブシジン酸の直接の前駆体である。

40

【0 0 0 5】

図 1 に模式的に示すカロテノイド生合成が調べられてきており、その経路が、細菌、菌類、および植物において明らかにされてきた (例えば、Britton, 1988 を参照のこと)。植物では、カロテノイドは色素体で形成される。

【0 0 0 6】

カロテノイド生合成経路の初期中間体は、酵素ゲラニルゲラニル二リン酸シンターゼによりイソペンテニル二リン酸 (IPP) とジメチルアリル二リン酸 (DMA PP、図 1 を参照のこと) から形成されるゲラニルゲラニル二リン酸 (GGDP) である。次の酵素段階もまた第 1 のカロテノイド特異的反応であり、酵素フィトエンシンターゼにより触媒され

50

る。この反応は、GGDP 2 分子の頭部と頭部が縮合して、最初の（まだ色のついていない）カロテン産物であるフィトエンが形成される 2 段階反応からなる（Dogbora, 1988, Chamovitzら, 1991; Lindenら, 1991; Peckerら, 1992）。フィトエンシンターゼは、可溶性／不活性と膜結合性／活性の 2 形態で存在し、色素体ガラクトリピド含有膜の表面に存在する場合、活性のためにビシナルヒドロキシ官能基を必要とする（Schledzら, 1996）。

【0007】

細菌および植物ではフィトエン形成は似ているが、フィトエン代謝は明らかに異なる。植物では、色のついたカロテンであるリコペンを産生するために、2つの遺伝子産物が連続して働く（Bayerら, 1989）。これらは、酵素フィトエンデサチュラーゼ（PDS, 例えば、Hugueneyら, 1992を参照のこと）と γ -カロテンデサチュラーゼ（ZDS, 例えば、Albrechtら, 1996を参照のこと）により表される。それぞれの遺伝子産物は2つの二重結合を導入し、それぞれ、フィトフルエンを経て γ -カロテンを、ノイロスポレンを経てリコペンを産生する。PDSは、プラストキノン（Mayerら, 1990; Schulzら, 1993; Norrisら, 1995）を利用する膜結合酸化還元鎖（Nievelsteinら, 1995）に構造的に関連していると考えられているが、一方、ZDSは、構造的に異なったやり方で作用する（Albrechtら, 1996）。植物では、経路全体がcis配置中間体を必要とすると思われる（Bartley, 1999）。対照的に、多くの細菌（例えば、Erwinia属）では、4つ全ての二重結合を形成する不飽和化順序の全てが、フィトエンをリコペンに直接変換する1つの遺伝子産物（CrtI）により達成される（例えば、Miawaraら, 1990; Armstrongら, 1990; Hundleら, 1994を参照のこと）。このタイプの細菌デサチュラーゼは、植物型フィトエンデサチュラーゼを効率的に阻害する、ある漂白除草剤（bleaching herbicide）に耐性であることが知られている。

【0008】

植物では、2つの遺伝子産物がリコペンの環化を触媒する（すなわち、 α （ ϵ ）-リコペンシクラーゼおよび β -リコペンシクラーゼが、それぞれ、 α （ ϵ ）-イオノン末端基および β -イオノン末端基を形成する）（例えば、Cunninghamら, 1993; ScolnikおよびBartley, 1995; Cunninghamら, 1996を参照のこと）。植物では、通常、2つの β -イオノン末端基を有する β -カロテンと、1つの α （ ϵ ）-イオノン末端基と1つの β -イオノン末端基を有する α -カロテンが形成される。

【0009】

植物キサントフィルの形成は、最初に、2つの遺伝子産物 α -ヒドロキシラーゼおよび β -ヒドロキシラーゼ（Masamotoら, 1998）（それぞれ、 α -カロテンおよび β -カロテンのカロテンバックボーンのC3位およびC3'位に作用する）により媒介される。結果として生じるキサントフィルは、ルテインおよびゼアキサンチンと呼ばれる。

【0010】

さらなる酸化反応は、エポキシ官能基を、ゼアキサンチンバックボーンのC5位、C6位およびC5'位、C6'位への導入を触媒するゼアキサンチンエポキシダーゼにより触媒される（Marinら, 1996）。これは、アンテラキサンチンおよびビオラキサンチンの形成につながる。この反応を、異なる遺伝子産物であるビオラキサンチンデエポキシダーゼの作用により逆転することができる（BugosおよびYamamoto, 1996）。

【0011】

ネオキサンチンの形成につながる遺伝子産物はまだ同定されていない。

【0012】

カロテノイド生合成遺伝子をコードする遺伝子およびcDNAが、細菌から植物に及ぶ様々な生物からクローニングされている。細菌およびシアノバクテリアの遺伝子として、E

10

20

30

40

50

Erwinia herbicola (出願WO91/13078, Armstrongら, 1990)、*Erwinia uredovora* (Misawら, 1990)、*R. capsulatus* (Armstrongら, 1990)、*Thermophilus* (Hoshinoら, 1993)、シアノバクテリア *Synechococcus* sp. (Genbankアクセッション番号X63873)、*Flavobacterium* sp. R1534株 (Pasamontesら, 1997) が挙げられる。公共データベースから推定できるように、高等植物におけるカロテノイド生合成経路の酵素をコードする遺伝子およびcDNAが、*Arabidopsis thaliana*、*Sinapis alba*、*Capsicum annuum*、*Narcissus pseudonarcissus*、*Lycopersicon esculentum*などを含む様々な供給源からクローニングされている。

10

【0013】

現在、高等植物形質転換体における前記クローニング遺伝子の使用と、結果として生じる効果についてはあまり何も知られていない。トマト由来フィトエンシターゼの発現は、果実のカロテノイド量に影響を及ぼすことができる (Birdら, 1991; Bramleyら, 1992; FrayおよびGrierson, 1993)。形質転換トマト植物におけるフィトエンシターゼの構成的発現は、ジベレリン生合成経路に由来する代謝産物GPPPの方向を変えるために矮性をもたらすことも報告されている (Frayら, 1995)。イネ胚乳において *Narcissus pseudonarcissus* 由来フィトエンシターゼを構成的に発現させた際には、このような問題は認められなかった (Burkhardtら, 1997)。 *Erwinia uredovora* CrtI が細菌デサチュラーゼとして植物において機能し、漂白除草剤耐性を付与することが知られている (Misawら, 1993)。

20

【0014】

長年にわたって、栄養組織または種子などの様々な植物組織あるいは細菌においてカロテノイド生合成経路を変えるか、または増強しようという試みがなされてきた。例えば、WO96/13149、WO98/06862、WO98/24300、WO96/28014、および米国特許第5,618,988号を参照のこと。これらの全てが、細胞における既存のカロテノイド生合成反応の操作に限られている。油が豊富な種子におけるカロテノイド生合成を変えることを目的とした他の出願は、形質転換により引き起こされる増加により形成される過剰なカロテノイドを調節するためのシンクを提供するので異なる。

30

【0015】

目的のカロテンおよびキサントフィルを産生するのに必要なカロテノイド生合成経路の全酵素を発現することができる形質転換体を作成するために植物材料を形質転換する方法が必要とされることは明らかである。

【0016】

発明の要約

本発明は、標的宿主植物が目的のカロテンおよび／またはキサントフィルを蓄積するのに必須であるカロテノイド生合成経路の全酵素を発現することができる形質転換体を作成するために、植物細胞、種子、組織、または全植物体を形質転換する手段および方法を提供する。本発明はまた、本発明の方法の実施に適するように設計されたDNA分子、およびこの分子を含むプラスミドまたはベクター系を提供する。さらに、本発明は、改善した栄養学的特性を示し、かつかかるDNA分子を含み、および／または本発明の方法を用いることにより作成されたトランスジェニック植物細胞、種子、組織、および全植物体を提供する。

40

【0017】

従って、本発明は、本質的にカロテノイドを含まないことが知られている植物材料 (例えば、イネ胚乳および他の多くの穀類の種子) について特に重要であるカロテノイド生合成の *de novo* 導入および発現、ならびに目的のある特定の中間体または産物の蓄積をアップレギュレートまたはダウンレギュレートするための既存のカロテノイド生合成の改

50

良を提供する。

【0018】

明細書全体を通して用いられる略語

本明細書中で挙げられる関連するカロテノイドの系統名は以下の通りである。

フィトエン：7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12'-オクタヒドロ-ψ, ψ-カロテン

フィトフルエン：7, 8, 11, 12, 7', 8'-ヘキサヒドロ-ψ, ψ-カロテン

ζ-カロテン：7, 8, 7', 8'-テトラヒドロ-ψ, ψ-カロテン

ノイロスポレン：7, 8-ジヒドロ-ψ, ψ-カロテン

リコペン：ψ, ψ-カロテン

β-カロテン：β, β-カロテン

α-カロテン：β, ε-カロテン

ゼアキササンチン：β, β-カロテン-3, 3'-ジオール

ルテイン：β, ε-カロテン-3, 3'-ジオール

アンテラキササンチン：5, 6-エポキシ-5, 6-ジヒドロ-β, β-カロテン-3, 3'-ジオール

ビオラキササンチン：5, 6, 5', 6'-ジエポキシ-5, 6, 5', 6'-テトラヒドロ-β, β-カロテン-3, 3'-ジオール

ネオキササンチン：5', 6'-エポキシ-6, 7-ジデヒドロ (didehydro) -5, 6, 5', 6'-テトラヒドロ-β, β-カロテン-3, 5, 3'-トリオール

酵素：

PSY：フィトエンシンターゼ

PDS：フィトエンデサチュラーゼ

CrtI：細菌カロテンデサチュラーゼ

ZDS：ζ (ゼータ) -カロテンデサチュラーゼ

CYC：リコペンβ-シクラーゼ

非カロテン中間体：

IPP：イソペンテニルニリン酸

DMA PP：ジメチルアリルニリン酸

GGPP：ゲラニルゲラニルニリン酸

【0019】

本明細書中で使用する用語「植物」として、一般に、真核藻類、有胚植物 (Bryophyta、Pteridophyta、ならびにSpermatophyta (例えば、GymnospermaeおよびAngiospermae) を含む) が挙げられる。Angiospermaeとして、Magnoliopsida、Rosopsida (真「双子葉植物」)、Liliopsida (「単子葉植物」) が挙げられる。代表的な、および好ましい例として、穀類種子 (例えば、イネ、コムギ、オオムギ、オートムギ、アマランス、アマ、ライコムギ、ライムギ、トウモロコシ、および他のイネ科植物)；脂肪種子 (例えば、脂肪種子Brassica種子、綿実、ダイズ、ペニバナ、ヒマワリ、コナツツ、ヤシなど)；他の食用種子または食べられる部分のある種子 (カボチャ (pumpkin)、カボチャ (squash)、ゴマ、ケシ、ブドウ、ヤエナリ、ラッカセイ、エンドウマメ、ラディッシュ、アルファルファ、ココア、コーヒー、アサ、ツリーナツツ (例えば、クルミ、アーモンド、ペカン、ヒヨコマメ) などを含む) が挙げられる。さらに、ジャガイモ、ニンジン、サツマイモ、トマト、コショウ、キャッサバ、ヤナギ、オーク、ニレ、カエデ、リンゴ、バナナ；観賞用の花 (例えば、ユリ、ラン、スゲ、バラ、キンポウゲ、ペチュニア、フロックス、スマイル、ヒマワリなど) などがある。一般に、本発明は、観賞用の種ならびに食品、繊維、木製品、なめし剤、染料、色素、ゴム、樹脂、ラテックス製品、脂肪、油、薬品、飲料などのために栽培された種に適用可能である。形質転換のために選択された標的植物は、食品用に栽培されることが好ましい (例えば、穎果、根、豆果、堅果、野菜、塊茎、果実、香辛料など)。

【0020】

発明の詳細な説明

本発明によれば、標的宿主植物が目的のカロテンおよび／またはキサントフィルを蓄積するのに必須であるカロテノイド生合成経路の全酵素を発現することができる形質転換体を作成するために、植物細胞、種子、組織、または全植物体を形質転換する手段および方法が提供される。本発明の別の態様によれば、前記方法を用いて、目的のある特定の中間体または産物の蓄積をアップレギュレートまたはダウンレギュレートするために既存のカロテノイド生合成を改良することもできる。さらに、

ー植物、菌類、または細菌に由来するフィトエンシンターゼ、

ー植物、菌類、または細菌に由来するフィトエンデサチュラーゼ、

ー植物またはシアノバクテリアに由来する ζ -カロテンデサチュラーゼ、および

ー植物、菌類、または細菌に由来するリコペンシクラーゼ、

からなる群から選択されるカロテノイド生合成経路に特有の1または複数の酵素を産生することができる1または複数の発現カセットを有するヌクレオチド配列を含む特異的DNA分子が提供される。

【0021】

好ましい実施態様によれば、前記発現カセットは、植物、菌類、または細菌のフィトエンシンターゼ、植物、菌類、または細菌のフィトエンデサチュラーゼ、植物 ζ -カロテンデサチュラーゼ、あるいは植物、菌類、または細菌のリコペンシクラーゼをコードする1または複数の遺伝子またはcDNAを含む。前記それぞれの遺伝子またはcDNAは、植物細胞、種子、組織、または全植物体においてその発現を可能にする適切な構成的、誘導性、または組織特異的プロモーターに作動可能に連結される。特に好ましい遺伝子またはcDNAは、植物フィトエンシンターゼ、細菌フィトエンデサチュラーゼ、または植物リコペンシクラーゼをコードする。フィトエンシンターゼ（植物および細菌）、Cr t I型カロテンデサチュラーゼ（細菌）、ならびにリコペンシクラーゼ（植物および細菌）の多数の、まだ増加している遺伝子が単離されており、データベースから利用することができる。これらは様々な供給源に由来し、全て本発明の方法に使用することができる。

【0022】

前記DNA分子は、適切な構成的、誘導性、または組織特異的プロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つの選択マーカー遺伝子またはcDNAをさらに含むことが好ましく、構成的プロモーターの制御下にあるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼが選択マーカーとして最も好ましい。当業者は、植物材料において機能的に活性である任意の入手可能なプロモーターを選択してもよいが、本発明による適切な発現カセットの設計では、フィトエンデサチュラーゼ、 ζ -カロテンデサチュラーゼ、またはリコペンシクラーゼをコードするそれぞれのヌクレオチド配列を、組織特異的または構成的プロモーターに作動可能に連結することが好ましいのに対して、フィトエンシンターゼをコードするヌクレオチド配列は、ジベレリン形成の妨害を避けるために組織特異的プロモーターの制御下で発現されることが好ましい。

【0023】

本発明によるDNA分子の機能要素としてのヌクレオチド配列は、前記遺伝子またはcDNAの1または複数の任意の組み合わせを含むことができることが理解されるべきである。本発明の特に好ましい実施態様では、前記ヌクレオチド配列は、フィトエンシンターゼと細菌または菌類フィトエンデサチュラーゼの両方の機能的発現カセットを含み、適切なプラスミドまたはベクター系（プラスミドA）に組み込んだ後に、単独でまたはリコペンシクラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む第2のベクター（プラスミドB）と共に、標的植物材料に導入することができる。

【0024】

本発明は、好ましくは*Agrobacterium tumefaciens*に由来する、前記DNA分子またはヌクレオチド配列の1または複数を含むプラスミドまたはベクター系をさらに提供する。

【0025】

本発明は、改善した栄養学的特性を示し、かつ前記DNA分子、プラスミドもしくはベクターの1または複数を含み、および／または本発明による方法を用いることにより作成されたトランスジェニック植物細胞、種子、組織、および全植物体をさらに提供する。

【0026】

本発明は、初期中間体であるゲラニルゲラニル二リン酸（GGPP）がカロテン生成に役立つだけでなく、いくつかの異なる生合成経路（図2）に役立つ分岐点でもあることに基
づいている。従って、この前駆体は、カロテノイド含有にかかわらず全ての植物組織（例
えば、イネ胚乳）の色素体に存在すると推定されている。従って、GGPPの供給源を使用
して、本発明の目的（すなわち、部分的もしくは全体的なカロテノイド生合成経路の導
入および／または既存のカロテノイド生合成経路の増強もしくは促進）を達成することが
できる。

10

【0027】

ある特定の標的植物細胞または組織を区別するために本明細書全体を通して用いられる用語「カロテノイドを含まない」は、本発明により形質転換されていない各植物材料が、例
えば、イネ胚乳などの貯蔵器官のように、通常、本質的にカロテノイドを含まないことが
知られていることを意味するものとする。「カロテノイドを含まない」は、ほとんど検出
不可能な量でカロテノイドを蓄積する細胞または組織が除外されることを意味しない。好
ましくは、前記用語は、0.001%w/w以下のカロテノイド量を有する植物材料を定義
するものとする。

20

【0028】

カロテノイド経路酵素を得ることができる適切な供給源の選択について、それぞれの植物
配列に相同なシアノバクテリアに由来するコード配列も本発明に従って使用することが
できることが理解されるべきである。

【0029】

本発明の好ましい実施態様では、高等植物フィトエンシンターゼが、組織特異的発現を付
与するプロモーターに作動可能に連結される。これは、細菌（CrtI型）フィトエン
デサチュラーゼと共に同じプラスミド（プラスミドA）上に一体化される。後者は、トラ
ンジットペプチドをコードするDNA配列に融合され、構成的発現を可能にするプロモ
ーターに作動可能に連結される。適切なベクター中のこの構築物で植物を形質転換すること
により、フィトエンシンターゼを制御するプロモーターにより選択された組織（例えば、
カロテノイドを含まない穀類種子）内でリコペンが形成される。驚くことに、カロテノ
イドを含まない組織（例えば、イネ胚乳）でさえも、この形質転換だけで、リコペン形成
より先に進んで、下流キサントフィル（例えば、ルテイン、ゼアキササンチン、アンテラキサ
ンチン、ピオラキササンチン、およびネオキササンチン）に向けてカロテノイド合成を開始
することができる。さらに、 α -カロテンの形成が観察される。従って、緑葉に存在するも
のに似たカロテノイド相補物が形成される。この思いがけない現象（本明細書では「オー
バーシュート」機構と呼ぶ）は、形質転換により媒介される基質供給により、あるいは形
質転換により引き起こされたカロテノイド生合成遺伝子の発現誘導により活性化されるよ
うになった、それぞれの後期遺伝子（リコペンシクラーゼ、 β -カロテンヒドロキシラー
ゼ、エポキシダーゼ）の構成的発現によるものかもしれない。「オーバーシュート」機構
が機能しない場合、リコペンシクラーゼをコードする遺伝子またはcDNAとの同時形質
転換（プラスミドB）がこの問題を克服することができ、少なくとも α -または β -カロ
テン（プロビタミンA）の形成を可能にする。「オーバーシュート」機構が機能する場合
、この同時形質転換は、フィトエンシンターゼおよびCrtI型カロテンデサチュラーゼ
により引き起こされる効果を増大することができる。従って、本発明は、プラスミドAま
たはA+Bで形質転換することにより遺伝的に与えられる点より先のカロテノイド生合成
経路を導入することを含む。

30

40

【0030】

プラスミドAはまた、カロテノイドを含む組織においてカロテノイド産生を増強すること

50

ができる。これらの形質転換は、ヒト用食品および動物用飼料の栄養学的価値を高める。形質転換においてc r t I型細菌フィトエンデサチュラーゼを使用するさらなる利点は、この酵素が葉の葉緑体でも発現され、それにより、漂白除草剤耐性を標的植物のフィトエンデサチュラーゼに付与することである。従って、本発明はまた、少なくともプラスミドAを有するトランスジェニック植物に関連する除草剤耐性を利用することを含む。

【0031】

第2のプラスミドBは、植物リコペンシクラーゼ遺伝子を有してもよい。あるいは、トランジット配列を備える細菌リコペンシクラーゼ遺伝子を使用してもよい。これは、プロモーター（好ましくは、プラスミドA中のフィトエンシターゼと同じ発現組織特異性を付与する）に作動可能に連結される。プラスミドAおよびBの同時形質転換により、根、果実、塊茎、または種子などの標的組織が、ゲラニルゲラニルニリン酸から出発してβ-カロテンを形成するカロテノイド生合成経路を実施するための全情報で補われる。この経路の後期反応が既にある場合、または誘導される場合、この同時形質転換（前記参照のこと）は、カロテノイド含有量を増加させ、β-カロテン由来キサントフィルの形成を増加させることができる。

【0032】

使用される全ての遺伝子には、色素体輸送を可能にするトランジット配列をコードするDNA配列が作動可能に備わっている。これは組換えDNA技術によりなされるか、またはトランジット配列は使用する植物DNAに存在する。そのために、形質転換により、色素体に局在する前駆体ゲラニルゲラニルニリン酸プールを利用してカロテノイドを形成することができる。この中心化合物はカロテノイドでもなく、カロテノイド生合成だけに関わる前駆体でもない（図2を参照のこと）。

【0033】

前記植物は、導入された1または複数の遺伝子を発現するはずであり、その発現についてホモであることが好ましい。一般に、遺伝子は、特定の植物の標的宿主細胞で機能的に活性であるプロモーターに作動可能に連結される。その発現は、その遺伝子に望ましい特徴が得られるようなレベルであるべきである。例えば、選択マーカー遺伝子の発現により、本発明の方法により作成された形質転換体が適切に選択されるはずである。同様に、栄養学的特性を強化するために、カロテノイドおよびキサントフィル生合成経路の1または複数の遺伝子を発現することにより、本発明による形質転換法に供されていない同じ種のものと比較して比較的高い含有量の経路中間体または産物の1または複数を得られるはずである。他方では、植物の正常な生理機能に著しく悪影響を及ぼすことを避けるために、一般に、目的の1または複数の遺伝子の過度な発現を（すなわち、その栽培が困難になる程度まで）制限することが望ましい。

【0034】

形質転換植物組織において発現するために、目的の1または複数の酵素をコードする1または複数の遺伝子を発現カセット中で使用することができる。本発明の目的を達成するために（すなわち、目的の標的植物におけるカロテノイド生合成経路を導入するか、または補うために）、植物は、目的の遺伝子に連結された転写開始領域を含む少なくとも1つの発現カセットで形質転換される。

【0035】

前記転写開始は、宿主に天然にあるか、類似するものでもよく、または宿主に対して外来するものか、異種のものでもよい。外来は、転写開始領域が、その転写開始領域を導入する野生型宿主に見出されないことを意図する。

【0036】

貯蔵タンパク質（例えば、グルテリン、パタチン、ナピン、クルシフェリン、β-コングリシニン、ファセオリンなど）に関連する転写開始領域が特に興味深い。

【0037】

転写カセットは、5' - 3' 方向の転写では、植物において転写開始領域および翻訳開始領域、目的のDNA配列、ならびに機能的な転写終結領域および翻訳終結領域を含む。終

10

20

30

40

50

結領域は、転写開始領域と共に天然にあるものでもよく、目的のDNA配列と天然にあるものでもよく、または他の供給源に由来してもよい。オクトピンシンターゼ終結領域およびノパリンシンターゼ終結領域などの便利な終結領域が、*A. tumefaciens*のTiプラスミドから入手することができる（Guérineauら，1991；Proudfoot，1991；Sanfalconら，1991；Mogenら，1990；Munroeら，1990；Ballasら，1989；Joshiら，1987もまた参照のこと）。

【0038】

本発明の目的の1または複数の遺伝子は、多くは、発現のために色素体（例えば、葉緑体）に標的化される。このように、目的の遺伝子が色素体に直接挿入されない場合、発現カセットは、目的の遺伝子を色素体に指向するためにトランジットペプチドをコードする配列をさらに含む。このようなトランジットペプチドは当該分野で周知である（例えば、Von Heijneら，1991；Clarkら，1989；Della-Cioppaら，1987；Romerら，1993；およびShahら，1986を参照のこと）。本発明で有用な任意のカロテノイド経路遺伝子が、天然または異種のトランジットペプチドを利用することができる。

10

【0039】

前記構築物はまた、目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結された任意の他の必要なレギュレーター（例えば、植物翻訳コンセンサス配列（Joshi，1987）、イントロン（LuehrsenおよびWalbot，1991）など）を含んでもよい。導入されるのに望ましい遺伝子内のイントロン配列は、転写物を安定化し、核からの効果的な移行を可能にすることにより、遺伝子の発現レベルを増加させる可能性がある。既知のこのようなイントロン配列の中には、植物ユビキチン遺伝子のイントロン（Cornejo，1993）がある。さらに、ゲノムの異なる遺伝子座に挿入された同じ構築物が、植物における発現レベルの点で異なることがあると観察されている。この効果は、少なくともある程度は染色体上での遺伝子の位置によるものであると考えられている。すなわち、個々の単離物は異なる発現レベルを有する（例えば、Hoeverら，1994を参照のこと）。発現カセットの構築に使用することができるさらなる調節DNA配列として、例えば、誘導または抑制を認識して植物組織において結合したDNA配列の転写を調節することができる配列が挙げられる。

20

30

【0040】

例えば、様々な内部因子および外部因子（例えば、植物ホルモン、熱ショック、化学物質、病原体、酸素不足、光、ストレスなど）により誘導されることが知られている、ある特定の植物遺伝子がある。

【0041】

調節することができるDNA配列のさらなるグループは、例えば、タバコのPR（感染特異的）タンパク質遺伝子に存在する化学的に動かされる配列を含み、EP-A 0 33 2 104に記載のような化学調節物質により誘導することができる。

【0042】

植物における外来遺伝子の発現のさらに別の考慮すべき事項は、トランスジェニックゲノムの安定性のレベル（すなわち、外来遺伝子が集団から分離する傾向）である。選択マーカーが目的の遺伝子または発現カセットに連結されているのであれば、トランスジェニック植物を維持するために選択を施すことができる。

40

【0043】

5'リーダー配列を発現カセット構築物に含めることが有益な場合がある。このようなリーダー配列は、翻訳を増強するように働くことができる。翻訳リーダーは当該分野で周知であり、ピコルナウイルスリーダー（例えば、EMCVリーダー（脳心筋炎5'非コード領域；Elroy-Steinら，1989））；ポティウイルスリーダー（例えば、TEVリーダー（Tobacco Etch Virus；Allisonら，1986））；およびヒト免疫グロブリン重鎖結合タンパク質（BiP，MacejakおよびS

50

arnow, 1991) ; アルファルファモザイクウイルスのコートタンパク質mRNAに由来する非翻訳リーダー (AMV RNA 4; JoblingおよびGehrke, 1987) ; タバコモザイクウイルスリーダー (TMV; Galliera, 1989) ; ならびにmaize chlorotic mottle virusリーダー (MCMV; Lommelら, 1991; Della-Cioppaら, 1987もまた参照のこと) が挙げられる。

【0044】

目的のDNA配列を発現しようとする場所に応じて、植物優先コドン (preferred codon) または葉緑体優先コドンを有する配列を合成することが望ましい場合がある。植物優先コドンは、目的の特定の植物種において最も多量に発現されるタンパク質における最高頻度のコドンから決定することができる (EP-A 0 359 472; EP-A 0 386 962; WO91/16432; Perlakら, 1991; およびMurrayら, 1989を参照のこと)。このように、ヌクレオチド配列を、任意の植物における発現のために最適化することができる。遺伝子配列の全てまたは任意の部分が最適化されてもよく、合成であってもよいことが理解される。すなわち、合成または部分的に最適化された配列も使用してよい。葉緑体に好ましい遺伝子の構築には、USPN 5, 545, 817を参照のこと。

【0045】

転写カセットの調製では、適切な方向および適宜、適切なリーディングフレームのDNA配列を用意するために、様々なDNAフラグメントを操作してもよい。このような目的で、アダプターまたはリンカーを使用してDNAフラグメントを結合してもよく、または便利な制限部位の用意、余分なDNAの除去、制限部位を除去などのために他の操作を伴ってもよい。この目的のために、挿入、欠失、または置換 (例えば、トランジションおよびトランスバージョン) が必要とされ得る場合、in vitro変異誘発、プライマー修復、制限、アニーリング、切除、連結などを用いてもよい。

【0046】

目的の遺伝子を有する発現カセットを、標準的な方法により発現ベクターに配置する。適切な発現ベクターの選択は、発現ベクターを宿主細胞に導入する方法によって決まる。代表的な発現ベクターは、発現ベクターを細菌宿主内で増殖させ、選択するための、細菌複製起源をコードする原核生物DNAエレメントおよび抗生物質耐性遺伝子; (ここでは、カロテノイド生合成経路の1または複数の特有の酵素をコードする) 外因性DNA配列を挿入するためのクローニング部位; 外因性遺伝子の転写開始を制御する原核生物DNAエレメント (例えば、プロモーター) ; ならびに転写物のプロセッシングを制御するDNAエレメント (例えば、転写終結配列/ポリアデニル化配列) を含む。これはまた、ベクターを染色体に最後に組み込ませるのに必要な配列を含んでもよい。

【0047】

好ましい実施態様では、発現ベクターはまた、例えば、プロモーターに機能的に連結された、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (van den Elzenら, 1985) などの選択マーカーをコードする遺伝子を含む。抗生物質耐性を付与し、従って、選択マーカーとして適切な遺伝子の他の例として、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼカナマイシン耐性 (Veltenら, 1984) をコードする遺伝子; Tn5に由来するカナマイシン耐性 (NPTII) 遺伝子 (Bevanら, 1983) ; Thompsonら (1987) に記載のPAT遺伝子; およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が挙げられる。本発明に適した植物発現ベクターおよび選択マーカー遺伝子の概要については、Gruberら (1993) を参照のこと。前記で概説したように、細菌crtI (この遺伝子産物は漂白除草剤耐性を付与することが知られている) を含む発現カセットから、さらなる選択マーカーを省くことも可能である。この特定の実施態様では、crtIは、構成的または組織特異的プロモーターの制御下にあることが好ましい。非常に好ましい実施態様では、crtIは、緑色の光合成が活発な組織または細胞に特異的であり、その組織または細胞において機能的に活性であるプロモ-

10

20

30

40

50

ターにより制御される。

【0048】

目的の遺伝子およびマーカー遺伝子の発現を制御するために用いられるプロモーターエレメントは、それぞれ、任意の植物に適合するプロモーターでよい。これは、植物遺伝子プロモーター（例えば、リブローサー1，5-ビスリン酸カルボキシラーゼ（RUBISCO）小サブユニットプロモーターまたは *Agrobacterium tumefaciens* の腫瘍誘導（tumor inducing）プラスミドに由来するプロモーター（例えば、ノパリンシンターゼプロモーターおよびオクトピンシンターゼプロモーター）でも、ウイルスプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）19Sおよび35Sプロモーターまたはゴマノハグサモザイクウイルス35Sプロモーター）でもよい。本発明で使用するのに適した周知の植物プロモーターの概説については、例えば、国際出願WO91/19806を参照のこと。

10

【0049】

「組織特異的」プロモーターを用いると、前記遺伝子産物の1または複数が、カロテノイドまたはキサントフィル生合成経路の産物を発現させる組織において特に多く蓄積される。発現の中には、植物の他の部分で起こるものもあってよい。周知の組織特異的プロモーターの例として、グルテリンIプロモーター（Kimら，1993；Okitaら，1989；Zhengら，1993）、塊茎特異的クラスIパタチンプロモーター（Beveraら，1986）；ジャガイモ塊茎ADPGPP遺伝子に結合するプロモーター（Mullerら，1990）；種子特異的転写を動かすダイズβ-コングリシニン（7Sタンパク質としても知られる）プロモーター（Bray，1987）；およびトウモロコシ胚乳ゼイン遺伝子に由来する種子特異的プロモーター（Pedersenら，1982）が挙げられる。本発明に使用することができるプロモーターのさらなるタイプは、植物ユビキチンプロモーターである。植物ユビキチンプロモーターは、Kayら（1987）およびEP-A 0 342 926により証明されているように当該分野で周知である。同様に、アクチンプロモーター、ヒストンプロモーター、およびチューブリンプロモーターが本発明に適している。タバコPR-1aプロモーターなどの好ましい化学物質誘導性プロモーターの例は、EP-A 0 332 104に詳述されている。プロモーターの別の好ましいカテゴリーは、傷誘導性プロモーターである。この種類の好ましいプロモーターとして、Stanfordら（1989）、Xuら（1993）、Logemannら（1989）、RohrmeierおよびLehle（1993）、Firekら（1993）、およびWarnerら（1993）により記載されるプロモーターが挙げられる。

20

30

【0050】

本発明で意図される植物細胞、種子、組織、および全植物体を、いくつかの方法のいずれでも得ることができる。当業者は、方法の選択が、形質転換の標的にされた植物のタイプ（すなわち、単子葉植物または双子葉植物）によって決まる場合があることを理解している。このような方法は、一般に、直接遺伝子導入、化学的に誘導される遺伝子導入、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション（Crosswayら，1986；Neuhäuslerら，1987）、アグロバクテリウム媒介遺伝子導入、例えば、Agraceus, Inc., Madison, Wisconsin and Dupont, Inc., Wilmington, Delawareから入手可能な装置を用いたバリスティック粒子加速（ballistic particle acceleration）（例えば、Sanfordら，米国特許第4,945,050号およびMcCabeら，1988を参照のこと）などが挙げられる。

40

【0051】

本発明の形質転換植物またはその一部を得る1つの方法は直接遺伝子導入である。直接遺伝子導入では、植物細胞を、植物またはその一部に導入しようとするヌクレオチド配列を含むDNAオリゴヌクレオチドの存在下で適切な条件下で培養するか、別の方法で増殖させる。ドナーDNA源は、一般に、所望の1または複数の遺伝子を含むプラスミドまたは他の適切なベクターである。所望の1または複数の遺伝子を含む他の適切なベクターもま

50

た意図されることを理解した上で、便宜上、本明細書中ではプラスミドについて言及する。

【0052】

プラスミドを取り込む任意の適切な植物組織を、直接遺伝子導入により処理することができる。このような植物組織として、例えば、発生の初期段階（特に減数分裂前、とりわけ減数分裂1～2週間前）の生殖構造が挙げられる。一般に、例えば、プラスミド溶液を、生殖器官または生殖器官近くで植物に直接注入することにより、減数分裂前の生殖器官をプラスミド溶液に浸す。次いで、この植物を自家受粉させるか、または同様に処理した別の植物の花粉と他家受粉させる。このプラスミド溶液は、一般に、花構造1個あたり約0.1～10ml中に約10～50μgのDNAを含むが、特定の花構造の大きさに応じて、これより多いまたは少ないものを使用してよい。溶媒は、一般に、滅菌水、食塩水、または緩衝化食塩水、あるいは従来の植物培地である。所望であれば、プラスミド溶液はまた、プラスミドの取り込みを化学的に誘導または増強するための薬剤（例えば、PEG、 Ca^{2+} など）を含んでもよい。

10

【0053】

生殖器官をプラスミドに暴露した後に、花構造を成熟するまで成長させ、種子を採取する。プラスミドマーカーに応じて、マーカー感受性培地または好ましくはマーカー耐性培地において植物を発芽または成長させることにより、マーカー遺伝子を有する形質転換植物を選択する。例えば、カナマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドで処理された植物から得られた種子は緑色のままであるのに対して、このマーカー遺伝子を有さないものはアルビノである。遺伝子からの所望のmRNA遺伝子転写とペプチド発現の存在を、従来のサザン、ノザン、およびウェスタンブロッティング技術によりさらに証明することができる。

20

【0054】

本発明を実施するのに適した別の方法では、プラスミドの取り込みを誘導するように植物プロトプラストを処理する。プロトプラスト調製は当該分野で周知であり、一般に、細胞壁を除去するのに十分な期間で植物細胞をセルラーゼおよび他の酵素で消化することを伴う。一般に、プロトプラストを、ふるい分けおよび洗浄により消化混合物から分離する。次いで、プロトプラストを、一般に $10^4 \sim 10^7$ 細胞/mlで適切な培地（例えば、培地F、CC培地など）に懸濁する。次いで、この懸濁液に、前記のプラスミド溶液と誘導物質（例えば、ポリエチレングリコール、 Ca^{2+} 、センダイウイルスなど）を添加する。あるいは、プラスミドをリボソームに封入してもよい。次いで、プラスミドおよびプロトプラストの溶液を、適切な期間（一般に、約1時間）約25℃でインキュベートする。場合によっては、約45℃まで短時間（例えば、2～5分間）加熱し、インキュベーション温度まで急速に冷却することにより、混合物に熱ショックをかけることが望ましい場合もある。次いで、処理されたプロトプラストを冷却し、例えば、マーカー遺伝子の発現および従来のブロッティング技術により、所望の1または複数の遺伝子の発現について選択する。次いで、従来どおりに、全植物体をクローンから再生する。

30

【0055】

一般に、電流を、エレクトロポレーションチャンバ内で、ポリエチレングリコール、 Ca^{2+} などの非存在下または存在下で裸のプラスミドとプロトプラストの混合物に加えることを除いて、エレクトロポレーション技術は似ている。代表的なエレクトロポレーションは、1～2000μsの持続時間で40～10,000DCボルトの1～10パルスを行い、一般に、パルス間の間隔は0.2秒である。同様の強度の交流パルスも使用することができる。さらに一般には、充電されたコンデンサを、プラスミドプロトプラスト懸濁液を含むエレクトロポレーションチャンバの全体にわたって放電させる。この処理により、生体膜の透過性が可逆的に増加し、従って、本発明によるDNAの挿入が可能になる。エレクトロポレーションされた植物プロトプラストは新しい細胞壁を再生し、分裂し、カルス組織を形成する（例えば、Riggsら、1986を参照のこと）。

40

【0056】

50

標的細胞を形質転換するのに適した別の方法は、*Agrobacterium*の使用を伴う。この方法では、所望の1または複数の遺伝子カセットを有するプラスミドを含む*Agrobacterium*を使用して、植物細胞に感染させ、プラスミドを標的細胞のゲノムに挿入する。次いで、所望の遺伝子を発現する細胞を選択し、前記のようにクローニングする。例えば、プラスミド（例えば、Riプラスミド）および*Agrobacterium*（例えば、*A. rhizogenes*または*A. tumefaciens*）により目的の遺伝子を標的組織（例えば、塊茎、根、穎果、または豆果）に導入する1つの方法は、*Escherichia coli*でのクローニングに適した小さな組換えプラスミド（これにはT-DNAフラグメントが挿入されている）を利用することである。この組換えプラスミドを、T-DNA内の1つの部位で切断する。この開口部に1本の「パッセンジャー」DNAを挿入する。パッセンジャーDNAは、植物DNAに組み込もうとする本発明の1または複数の遺伝子と選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）からなる。次いで、このプラスミドを、さらに大きなプラスミドに再クローニングし、次いで、非改変Riプラスミドを有する*Agrobacterium*株に導入する。細菌の増殖中に、そのT-DNAにインサート（すなわちパッセンジャーDNA）がある細菌をもたらす、希な二重組換えが時々起こる。このような細菌を、抗生物質を含む培地上での生存により同定および選択する。これらの細菌は、そのT-DNA（パッセンジャーDNAによって改変されている）を植物ゲノムに挿入するために使用される。*A. rhizogenes*または*A. tumefaciens*を利用するこの手順により、健康で成長可能な植物に再生することができる形質転換植物細胞が得られる（例えば、Hincheeら、1988を参照のこと）。

【0057】

別の適切なアプローチは、細胞に、形質転換用DNAでコートされたマイクロプロジェクタイトイルを打ち込むこと（Wangら、1988）、または加圧衝撃により、形質転換しようとする細胞の方向へDNA含有溶液を通して加速され、それにより加圧衝撃の結果として溶液と共に細かく分散されて霧状になるマイクロプロジェクタイトイルを打ち込むことである（EP-A 0 434 616）。

【0058】

マイクロプロジェクタイトイルボンバードメントは、植物細胞を含む細胞の効果的な形質転換技術として改善されてきた。Sanfordら（1987）では、マイクロプロジェクタイトイルボンバードメントは、核酸を*Allium cepa*（タマネギ）植物細胞の細胞質に送達するのに効果的であることが報告された。Christouら（1988）は、マイクロプロジェクタイトイルボンバードメントによるカナマイシン耐性遺伝子を用いたダイズカルの安定な形質転換を報告した。同じ著者らは約0.1%～5%の細胞での貫通を報告し、400mg/lカナマイシンまでの、形質転換カルスにおけるNPTII酵素活性および耐性の観察可能なレベルを発見した。McCabeら（1988）は、マイクロプロジェクタイトイルボンバードメントを用いた*Glycine max*（ダイズ）の安定な形質転換を報告している。McCabeらは、R₀キメラ植物からの形質転換R₁植物の再生をさらに報告している（Weissingerら、1988；Dattaら、1990（イネ）；Kleinら、1988a（トウモロコシ）；Kleinら、1988b（トウモロコシ）；Frommら、1990；およびGordon-Kammら、1990（トウモロコシ）もまた参照のこと）。

【0059】

あるいは、植物色素体を直接形質転換することができる。葉緑体の安定な形質転換が高等植物において報告されている（例えば、SVABら（1990）；SVABおよびMaliga（1993）；StaubおよびMaliga（1993）を参照のこと）。この方法は、選択マーカーを含むDNAのパーティクルガン送達と、相同組換えによるDNAの色素体ゲノムへの標的化を頼りにしている。このような方法では、色素体遺伝子プロモーターを使用するか、または選択的プロモーター配列（例えば、T7 RNAポリメラーゼにより認識される配列）からの発現のために配置された、色素体に含まれるサイレント

トランスジーンのトランス活性化により、色素体遺伝子発現を達成することができる。このサイレント色素体遺伝子は、核発現構築物からの特異的RNAポリメラーゼの発現と、トランジットペプチドの使用によるポリメラーゼの色素体への標的化により活性化される。適切な植物組織特異的プロモーターから発現される、核にコードされ、色素体に向けられる特異的RNAポリメラーゼを使用することにより、このような方法で組織特異的発現を得ることができる。このような系は、McBrideら（1994）に報告されている。

【0060】

一例として前記に示された可能な形質転換法のリストは、完全であることが要求されず、どのようなにも本発明の主題を制限することが意図されない。

10

【0061】

従って、本発明はまた、本発明による方法により形質転換されているプロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚、胚珠、接合子など、特に、全植物体からなる群から選択されるトランスジェニック植物材料を含み、発現可能な形態の本発明の組換えDNAおよび前記トランスジェニック植物材料を作成するためのプロセスを含む。

【0062】

当該分野で周知の以下の手順を用いて、ポジティブな形質転換体を植物に再生させる（例えば、McCormickら，1986を参照のこと）。次いで、これらの植物を成長させ、同じ形質転換株または異なる株と受粉させてもよく、その後で、所望の性質の存在および／または所望の性質が発現される程度、ならびに結果として得られる、同定される所望の表現型特徴を有するハイブリッドについて、子孫を評価することができる。第1の評価は、例えば、形質転換植物の細菌耐性／菌類耐性のレベルを含んでもよい。表現型特徴が安定に維持および遺伝されることを確実にするために、2世代以上を生育してもよく、次いで、所望の表現型または他の性質が実現されていることを確実にするために、種子を採集してもよい。

20

【0063】

本発明の方法により形質転換されたトランスジェニック植物（特に、トランスジェニック稔性植物）、ならびにその無性子孫および／または有性子孫（これらは、母植物の形質転換による新規なかつ望ましい性質をなお示す）が、本発明の範囲内にさらに含まれる。

【0064】

用語「子孫」は、トランスジェニック植物の「無性生殖」による子孫と「有性生殖」による子孫の両方を含むことが理解される。この定義はまた、周知のプロセス（例えば、細胞融合または変異体選択）により得ることができ、最初の形質転換植物に特有の性質をなお示す全ての変異体およびバリエーションを、形質転換植物材料の全ての交配および融合産物と共に含むことを意味する。

30

【0065】

本発明の方法により以前に形質転換されたトランスジェニック植物またはその子孫に生じ、従って、少なくとも一部分がトランスジェニック細胞からなる植物の一部（例えば、花、茎、果実、葉、根）もまた、本発明の目的である。

【0066】

以下の実施例は本発明を例示するものであり、本発明を限定しない。

40

【0067】

生物学的材料の寄託

本発明による発現カセットを有するE. coli株は、ブダペスト条約により、以下のアクセッション番号で、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Germanyに寄託されている。

株

アクセッション番号

PRiceCYC TOP10（プラスミドBカセット） DSM12714

Pbaal42 TOP10（プラスミドAカセット） DSM12713

50

【0068】

実施例

プロビタミンA (β -カロテン) およびキサントフィル生合成の、カロテノイドを含まないイネ (*Oryza sativa*) 胚乳への導入

フィトエン形成 (Burkhardtら, 1997)

放射性標識イソペンテニルニリン酸を用いた以前の生化学的研究から、イネ胚乳には、重要なカロテノイド生合成前駆体を供給する酵素的に活性なGGPPシンターゼがあることが分かっている。従って、ジャポニカ米モデル品種Taipai309を、マイクロプロジェクタイルボンバードメントにより、構成的プロモーターの制御下と、胚乳特異的プロモーターの制御下にあるラッパズイセン (*Narcissus pseudonarcissus*; Acc. No. X78814, SchledzおよびBeyer, 1996、Schledzら, 1996) 由来フィトエンシンターゼをコードするcDNAで形質転換した。トランスジェニックイネ植物では、ラッパズイセン酵素は、色のついていないカロテンであるフィトエンがイネ胚乳に*in vivo*蓄積することにより活性であることが示された。従って、カロテノイドを欠く非光合成組織において、カロテノイド生合成における第1のカロテノイド特異的酵素段階を操作することが原理的に可能であることが始めて証明された。

10

【0069】

リコペン、 β -カロテン (プロビタミンA)、およびキサントフィルに向かうカロテノイド生合成経路のイネ胚乳への導入

20

プラスミド構築

(標準的な分子生物学技術については、Sambrookら, 1989を参照のこと。構築物の模式図については、図4を参照のこと)。カロテノイド生合成酵素をコードする構造遺伝子は以下の通りであった。

Psy: *Narcissus pseudonarcissus* 由来フィトエンシンターゼ (Acc. No. X78814)。

crtI: エンドウ *Rubisco* のトランジットペプチドに融合された細菌 *Erwinia uredovora* 由来カロテンデサチュラーゼ (Misawaら, 1993)。

cyc: *Narcissus pseudonarcissus* 由来リコペンシクラーゼ (Acc. No. X98796)。

30

【0070】

pB19hpc (本文では「プラスミドA」と呼ぶ) の構築:

CaMV35Sプロモーター下流に、およびnos3'ポリアデニル化シグナル上流に、インタクトな *Erwinia uredovora* 由来フィトエンデサチュラーゼ遺伝子 (crtI) とエンドウ *Rubisco* 小サブユニットのトランジットペプチド配列 (tp) を有するDNAフラグメントがMisawaら (1993) により構築されており、これをHindIII/EcoRIで消化したpUC19に連結して、プラスミドpUCET4を得た。crtI発現カセットを、HindIII/EcoRIフラグメントとしてpUCET4から切り出し、HindIII/EcoRIで消化したpBluescriptKSに連結して、プラスミドpBaal1を得た。イネグルテリン1プロモーター (Gt1; Kimら, 1993; Okitaら, 1989; Zhengら, 1993) の制御下にある *Narcissus pseudonarcissus* 由来フィトエンシンターゼcDNA (Acc. No. X78814) とnos3'ポリアデニル化シグナルからなるpsy発現カセットを有するプラスミドpGt1PsyH (Burckhardtら, 1997) をSacIIで消化し、T4-DNAポリメラーゼを用いることにより平滑末端にした。psy発現カセットを得るために、KpnIを用いて第2の消化を行った。次いで、SacII (平滑化)/KpnIフラグメントを、XhoI (平滑化)/KpnIで消化したpBaal1に連結して、crtIおよびpsy発現カセットを有するプラスミドpBaal2を得た。

40

【0071】

50

pUC18のポリリンカー部位を、以下の順番の以下の制限部位：HindIII、I-SceI、KpnI、NotI、SmaI、Iscel、EcoRIを含むように交換した。結果として得られたプラスミドpUC18Mを、KpnIおよびNotIで消化した。crt1およびpsy発現カセットを有するDNAフラグメントを、KpnIおよびNotIを用いてpBaal2から切り出し、前記の消化されたpUC18Mに連結した。得られたプラスミドpBaal3は、2つのメガヌクレアーゼ制限部位（I-SceI）に隣接された二重発現カセットを含む。

【0072】

CaMV35Sプロモーターの制御下にあるaphIVとCaMV35Sポリアデニル化シグナルを含むハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子aphIV発現カセットを、KpnIフラグメントとしてpRise（プラスミドBの構築を参照のこと）から切り出し、KpnIで消化したpBaal3に連結した。得られたプラスミドpBaal42およびpBaal41は、psy発現カセットと同じ方向に（pBaal42）または反対の方向に（pBaal41）、ハイグロマイシン耐性カセットを含む。

【0073】

ベクターpBin19（Bevan, 1984）をEcoRIおよびHindIIIで消化し、以下の順番の以下の制限部位：HindIII、I-SceI、KpnI、NotI、SmaI、Iscel、EcoRIを含む合成オリゴヌクレオチド配列を標準的なプロトコルを用いて導入して、pBin19Mを作成した。

【0074】

crtI、psy、およびaphIVからなる発現カセットを、メガヌクレアーゼ部位I-sceIを用いてpBaal42から切り出し、I-sceIで消化した後にpBin19Mに連結した。次いで、結果として得られたプラスミドpB19hpcを形質転換に使用した。

【0075】

pZCycH（本文中では「プラスミドB」と呼ぶ）の構築：

グルテリン1プロモーターGt1を、EcoRI/BalIIを用いてpSK1（Okitaら, 1989）から切り出し、BamHI/MunIで消化したpV34（FuettereおよびPotrykus, 未発表）へ2つのI-SceIメガヌクレアーゼ部位間に連結して、プラスミドpV34Gt1を得た。CaMV35Sポリアデニル化シグナルに続いて、CaMV35Sプロモーター制御下にあるaphIVと、第2のCaMV35Sポリアデニル化シグナルを含むハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子aphIV発現カセットを、SalIおよびSacIを用いてpCIB900（Wuennら, 1996）から切り出した。得られたフラグメントのSalI部位にXhoIアダプターを連結した後に、カセットをpV34Gt1に連結して、プラスミド（pRice）を得た。Narcissus pseudonarcissus由来リコペンシクラールcyc（Acc. No. X98796）を、Ecl136IIおよびBamHIを用いてプラスミドpGEM4CYC（Bonkら, 1997）から切り出した。クレノウフラグメントで処理した後、cycをEcl136IIで消化したpRiceに連結して、pRiceCYCを得た。

【0076】

ベクターpPZP100（Hajdukiewiczら, 1994）を、EcoRIおよびHindIIIで消化し、以下の順番の以下の制限部位：HindIII、I-SceI、KpnI、NotI、SmaI、Iscel、EcoRIを含む合成オリゴヌクレオチド配列を標準的なプロトコルを用いて導入し、pPZP100Mを作成した。

【0077】

cyc aphIV二重カセットを、Iscelメガヌクレアーゼを用いてpRiceCYCから切り出し、Iscelで消化したpPZP100Mに連結して、形質転換プラスミドpZCycHを得た。

【0078】

カルス誘導および形質転換

カルス誘導：ミルクステージにあるジャポニカ米栽培品種TP309の未熟種子を、温室で生育した植物から収集し、70%エタノール(v/v)で1分間、表面滅菌し、振盪機の上で6%次亜塩素酸カルシウム(calcium hypochloride)中で1時間インキュベートし、滅菌蒸留水で3~5回洗浄した。次いで、未熟胚を、エアフロークリーンベンチ内で両眼顕微鏡下で滅菌種子から単離し、NB培地(N6塩およびB5ビタミン。30g/lマルトース、500mg/lプロリン、300mg/lカゼイン加水分解物、500mg/lグルタミン、および2mg/l 2, 4-Dを添加した。pH 5.8)上で培養した。4~5日後に子葉鞘を除去し、Agrobacteriumの接種まで、膨張した胚盤を新鮮なNB培地上で3~5日間、二次培養した。

10

【0079】

Agrobacterium媒介形質転換：1週齢の前培養未熟胚を、記載されているように(Uzeら, 1997)、Agrobacterium tumefaciens LBA4404細胞懸濁液に浸した。2つ別々のベクターpZPsCおよびpZCyCHの同時形質転換のために、アセトシリンゴン誘導の後に、等容量のLBA4404/pZCyCH(OD₆₀₀=1.0)と混合したLBA4404/pZPsC(OD₆₀₀=2.0)を接種に使用した。接種される前培養胚を、200mMアセトシリンゴンを添加したNB培地上で3日間、共培養し、再生培地(250mg/lセフォタキシムを含むNB)上で1週間、二次培養し、次いで、30mg/lハイグロマイシンおよび250mg/lセフォタキシムの存在下でNB選択培地上に4~6週間、移した。植物を、0.5mg/l NAAおよび3mg/l BAPを添加したNB培地上で、回収した耐性カルスから4週間で再生させ、発根させ、温室に移した。

20

【0080】

サザンブロッティング

トランスジーンの存在を調べるために、サザンブロットを、標準的な方法(Sambrookら(1989))に従って、シトエンシンターゼ、CrtI、およびシクラーゼから得られた相同な標識プローブを用いて行った。

【0081】

カロテノイド色素分析

R0植物からの種子(1g)の殻をとり、振盪機上でエメリー紙で8時間処理して、種皮を除去した。目視検査により、形質転換された系統は、カロテノイドの存在のために、はっきりと検出できる黄色がかった色を示した。さらに、分離パターンが検出可能であり、場合によっては、期待される3(黄色):1(白色)の比に非常に近かった。

30

【0082】

個々の系統からの種子の合計(各50個)を、マイクロディスクメンブレーター(Braun, Melsungen)を用いて微粉になるまで粉碎した。これを、完全に脱色するまでアセトンで繰り返し抽出した。混合抽出物を、窒素流下で乾燥させた。残渣をクロロホルムに溶解し、フォトダイオードアレイ検出器とC₃₀逆相カラム(YMC Europe GmbH)を備えたWaters HPLC装置を用いて定量的にHPLC分析にかけた。溶媒系A:MeOH:tertブチルメチルエーテル(1:1, v/v)B:MeOH:tertブチルメチルエーテル:H₂O(6:1.2:1.2, v/v/v)を使用した勾配(25分以内で100%B~43%B、次いで、さらに75分以内で43%B~0%B)を用いて分離を行った。これらの最終条件を、再平衡の前にさらに10分間維持した。得られた結果の例を、非形質転換対照については図3A、プラスミドAのみを有する系統については図3B、プラスミドAを有する系統については図3Cに示す。明らかに、カロテノイドは形質転換体において蓄積される。対照は、時々、微量のカロテノイドを示した。このカロテノイドは、大部分が、完全に除去することが難しい種皮に由来している可能性がある。形質転換種子において検出されたカロテノイドのうち、β-カロテン(プロビタミンA)が主な産物(60%まで)である。さらに、キサントフィル形成経路が活発になり、ルテインおよびゼアキサントフェンと若干のエポキシ化カロテノイドの形成につ

40

50

ながった。経路の後半部分が形質転換により、または形質転換に由来する産物により誘導されたと結論づけられる。あるいは、キサントフィル形成経路はイネ胚乳において構成的に発現され、キサントフィルであるゼアキササンチンおよびルテインと、その他のより少ない成分であるエポキシ化キサントフィルの形成をもたらした。

【0083】

プラスミドAのみで形質転換された系統は、基本的に同じカロテノイドパターンを示した。しかしながら、カロテノイド含有量は、前記の結論がイネ胚乳におけるリコペンシクラーゼに広げられるように、おおむね少なかった。

【0084】

とりわけ、ルテインおよびゼアキササンチンの存在は、そのプラスの効果（例えば、視覚）のため予想外の付加価値とみなされる（例えば、Brownら, 1988; Schallch, 1992を参照のこと）。

【0085】

本発明の多くの変更および変化は、前記の教示を考慮して明らかに可能である。従って、添付の特許請求の範囲内で、本発明を、詳細に説明された以外に実施できることが理解されるべきである。

【0086】

植物材料に広範に存在する前駆体ゲラニルゲラニルニリン酸

イネ以外の他の組織におけるGGPPの存在を試験するために、インキュベーション実験を、2種類のコムギ実験品種、2種類のオオムギ品種、およびCavendishバナナ果実から単離された胚乳を用いて、イネ胚乳について記載されたものと同様に行った。コムギおよびオオムギの未熟種子の殻をとり、胚乳を押しつぶし、胚を取り出した。インキュベーション実験を、 $0.5 \mu\text{Ci}$ [$1-^{14}\text{C}$] イソペンテニルニリン酸の存在下で、 100 mM Tris-HCl緩衝液 ($\text{pH} 7.4$)、 10 mM MgCl_2 、 1 mM MnCl_2 、 3 mM ATP中で、 25°C で6時間行った。個々のアッセイに、形成されたプレニルニリン酸の脱リン酸を可能にするアルカリホスファターゼを添加した。3～6時間後に、対応するプレニルアルコールを含む脂溶性材料を、クロロホルム／メタノール（2／1，v／v）抽出により単離した。この後に、前記のようにHPLC分析を行った。

【0087】

調査したコムギ品種（両方とも本質的にカロテノイドを含まない）からの胚乳では、本物の脱リン酸されたGGPP（Sinapis alba由来組換えGGPPシンターゼを使用して産生された）を用いることによりゲラニルゲラニオールであることが証明された、非常に顕著なシグナルが観察された。従って、プロビタミンA生合成の形質転換によるコムギへの導入は、イネと同じくらい実行可能であると思われる。オオムギ胚乳はカロテノイド生合成のいくらか小さなバックグラウンドを示すので、オオムギでは、より少ないが検出可能な量の対応するアルコール形態のGGPPが観察された。同様に、Cavendishバナナはカロテノイドを産生し、従って、成熟段階で際立って観察されるGGPP形成活性の存在は驚くべきことではなかった。

【0088】

CPTA誘導性カロテノイド生合成遺伝子

長く知られているリコペンシクラーゼ阻害剤CPTA（塩酸2-（4-クロロフェニルチオ（chlorophenylthio））トリエチルアミン）および関連化合物（例えば、El-Sayed Osmanら, 1984; FosketおよびRadin, 1982を参照のこと）は、リコペン蓄積に関して、プラスミドAによる形質転換を模倣する。カロテノイド生合成遺伝子のアップレギュレーションを証明しようとして、本発明者らは、ScheutおよびBaldwin（1957）により示された方法に従ってCPTAを合成し、この化合物を 1 mM 水溶液でラップズイセンに加えた。予想通り、この光合成活動をしない組織は、リコペンを蓄積することにより反応を示した。しかしながら、CPTA（阻害剤）の主な作用により説明がつかないが、カロテノイド含有量はほぼ2倍に

10

20

30

40

50

なった。従って、カロテノイド生合成酵素をコードする多量の転写物または多量の酵素の予想される誘導を証明するために、ノザンブロットおよびウェスタンブロット分析を行った。

【0089】

図5Aは、ノザンブロットの結果を示す。総RNAを、未処理（レーン1）およびCPTA処理の花から単離した。固定化されたRNAを、フィトエンシンターゼ（B）、フィトエンデサチュラーゼ（C）、 ζ -カロテンデサチュラーゼ、およびリコペンシクラーゼのプローブとの後のハイブリダイゼーションを可能にするように繰り返しストリップした。 ζ -カロテンデサチュラーゼを除く全ての特有のカロテン生成RNA（リコペンシクラーゼを含む）が豊富に増加したことは明らかである。

10

【0090】

ウェスタンブロット分析（図5Bを参照のこと）のために、総タンパク質を未処理およびCPTA処理の花から単離し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（1レーンあたり30 μ gタンパク質）の後に、ニトロセルロース膜に移した。ブロットを、フィトエンシンターゼ（A）、フィトエンデサチュラーゼ（B）、 ζ -カロテンデサチュラーゼ（C）、およびリコペンシクラーゼに対する抗体を用いて発色させた。タンパク質レベルでは、CPTA処理により酵素量が増加することは明らかである。

【0091】

前記のイネのデータにより、本発明者らは、カロテノイド（またはその誘導産物）が、一種のフィードバック機構においてカロテノイド形成を遺伝的に誘導する可能性があると結論付けている。

20

【0092】

従って、本発明は、遺伝子操作により、カロテノイド生合成経路を、カロテノイドを含まない組織に導入するための手段、または既存のカロテノイド生合成経路の生産性を増強するための手段を提供する。前記方法を使用して、種子、果実、塊茎、花、または葉の栄養学的価値、薬理的性質、または外観を改善することができる。

【0093】

主として、本発明は、多量のカロテノイドを産生することが特に問題のない場合、栄養上の必要性を改善するのに有用である。例えば、イネは、精米された形では、検出可能な色のついているカロテノイドを含まない胚乳からなる。カロテノイドは、加工中に除去される種皮に存在している。この加工は、イネ穀粒の長期貯蔵を可能にするために必要とされる。

30

【0094】

本発明は、カロテノイド生合成経路のde novo操作の第1の例を示し、カロテノイドを含まない農学上重要な作物の他の組織（例えば、他の穀類種子）、あるいは色のついた、または色のついていないカロテノイドを含まない根組織に適用可能である。これは、既存のカロテノイドを増加させるか、または改善する方法の可能性を除外しない。

【0096】

引用参考文献

Albrecht ら(1996) Eur. J. Biochem. 236, 115-120

40

Allisson ら(1986) Virology 154, 9-20

Armstrong ら(1989) Mol. Gen. Genet. 216, 254-268

Armstrong ら(1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9975-9979

Bartley ら(1999) Eur J. Biochem. 259, 396-403

Ballas ら(1989), Nucl. Acids Res. 17, 7891-7903

Bevan ら(1983) Nature 304, 184-187

Bevan (1984) Nucl. Acid Res. 3, 138-140

Bevan ら(1986) Nucl. Acids Res. 14, 4625-4638

Beyer ら(1989) Eur. J. Biochem. 184, 141-150

Bird ら(1991) Biotechnology 9, 635-639

50

- Bonk ら(1997) Eur. J. Biochem, 247, 942-950
- Bouvier ら(1989) Biochim. Biophys. Acta 1391 : 320-328
- Bouvier ら(1996) J. Biol. Chem. 271, 28861-28867
- Bramley ら(1992) Plant J. 2, 343-349
- Bray, (1987) Planta 172, 364-370
- Britton (1988) Biosynthesis of carotenoids p. 133-182, In T. W. Goodwin (ed.). Plant Pigments, 1988. Academic Press, Inc. (London)
- Brown ら(1998) Eye 12, 127-33
- Bugos and Yamamoto (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6320-6325
- Burkhardt ら(1997) Plant J. 11, 1071-1078 10
- Chamovitz ら(1991) Plant Mol. Biol. 16, 967-974
- Christou ら(1988) Plant Physiol. 87, 671-674
- Clark ら(1989), J. Biol. Chem. 264, 17544-17550
- Cornejo ら(1993) Plant Molec. Biol. 23, 567-581
- Crossway ら(1986) BioTechniques 4, 320-334
- Cunningham ら(1996) Plant Cell 8, 1613-26
- Cunningham らFEBS Lett. 238, 130-138
- Datta ら(1990) Biotechnology 8, 736-740
- Della-Cioppa ら(1987) Plant Physiol. 84 : 965-968
- Dogbo ら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 7054-7058 20
- Elroy-Stein ら(1989) PNAS USA 86, 6126-6130
- El-Sayed ら(1984) Ann. Bot. 53, 21-27
- Firek ら(1993) Plant Molec. Biol. 22, 129-142
- Fosket and Radin, (1983) Plant Sci. Lett. 30, 165-175
- Fray and Grierson (1993) Plant Mol. Biol. 22, 589-602
- Fray ら(1995) Plant J. 8, 693-701
- Fromm ら(1990) Biotechnology 8, 833-839
- Gallie ら(1989) Molecular Biology of RNA, 237-256 (1989)
- Gordon-Kamm ら(1990) Plant Cell 2, 603-618
- Grant, (1991) The State of the World's Children. Oxford University Press, Oxford 30
- Gruber ら(1993) in: Methods In Plant Molecular Biology And Biotechnology 89-119 (CRC Press).
- Guerineau ら(1991) Mol. Gen. Genet. 262, 141-144
- Hajdukiewicz ら(1994) Plant Mol. Biol. 25, 989-994
- Hinchee ら(1988) Biotechnology 6, 915-921
- Hoekemann ら. (1983) Nature 303, 179-180
- Hoever ら(1994) Transgenic Res. 3, 159-66
- Hoshino ら(1993) Appl. Environ. Microbiol. 59, 3150-3153
- Hugueney ら(1992) Eur. J. Biochem. 209, 39-407
- Humphrey ら(1992). WHO Bulletin 70 : 225-232 40
- Hundle ら(1994) Mol. Gen. Genet. 214, 374-385
- Jobling and Gehrke (1987) Nature 325, 622-625
- Joshi ら(1987) Nucl. Acids Res. 15, 9627-9639
- Kay ら(1987) Science 236, 1299
- Kim ら., (1993) Plant Cell Physiol. 34, 595-603
- Klein ら(1988a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4305-4309
- Klein ら(1988b) Plant Physiol. 91, 440-444
- Linden ら(1991) Z. Naturforsch. 46c, 1045-1051
- Logemann ら(1989) Plant Cell 1, 151-158
- Lommel ら(1991) Virology 81, 382-385 50

- Luehrsen and Walbot (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225, 81-93
- Macejak and Sarnow (1991) *Nature* 353, 90-94
- Marin, ら(1996) *EMBO J.* 15, 2331-2342
- Masamoto ら(1998) *Plant Cell Physiol* 39, 560-4
- Mayer ら(1990) *Eur. J. Biochem.* 191, 359-363
- McBride ら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7301-7305
- Mc Cabe ら(1988) *Biotechnology* 6, 923-926
- McCormick ら(1986) *Plant Cell Reports* 5, 81-84
- Misawa ら(1990), *J. Bacteriol.* 172, 6704-6712
- Misawa ら(1993) *Plant J.* 4, 833-840 10
- Mogen ら(1990) *Plant Cell* 2, 1261-1272
- Muller ら(1990) *Mol. Gen. Genet.* 224, 136-146
- Munroe ら(1990); *Gene* 91, 151-158
- Murray ら(1989) *Nucl. Acids Res.* 17, 477-498
- Neuhaus ら(1987) *Theor. Appl. Genet.* 75, 30-36
- Nievelstein ら(1995) *Eur. J. Biochem* 233, 864-872
- Norris ら(1995) *Plant Cell* 7, 2139-2149
- Okita ら(1989) *J. Biol. Chem.* 264, 12573-12581
- Pasamontes ら(1997) *Gene* 185, 35-41
- Pecker ら. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4966-4966 20
- Pedersen ら(1982) *Cell* 29, 1015-1026
- Perlak ら(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3324-3328
- Proudfoot, (1991) *Cell* 64, 671-674
- Riggs ら(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83, 5602-5606
- Rohrmeier and Lehle (1993) *Plant Molec. Biol.* 22, 783-792
- Romer ら(1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 1414-1421
- Sambrook ら(1989) *Molecular Cloning: A Lab. Manual*, 2nd, Cold Spring Lab. Press, Cold Spring Harbor
- Sanford ら(1987) *Particulate Science and Technology* 5, 27-37
- Sanford らUS-Patent 4,945,050 30
- Sanfacon ら(1991); *Genes Dev.* 5, 141-149
- Schalch W (1992) *EXS*62, 280-98
- Scheutz and Baldwin (1957) *Proc. Acad. Chenr. USA* 80, 162-164
- Schledz M. and Beyer P. (1996) *Plant Physiol.* 110, 336
- Schledz ら(1996) *Plant J.* 10, 781-792
- Schulz, ら(1993) *FEBSLett.* 318, 162-166
- Scolnik and Bartley (1995) *Plant Physiol.* 108, 1342
- Shah ら(1986). *Science* 233, 478-481
- Stanford ら(1989), *Mol. Gen. Genet.* 215, 200-208
- Staub and Maliga (1993) *EMBO J.* 12, 601-606 40
- Sommer (1988) *J. Nutr.* 119, 96-100
- Sun ら(1996) *J. Biol. Chem.* 271, 24349-52
- Svab ら(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526-8530
- Svab and Maliga, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 913-917
- Thompson ら(1987); *EMBO J.* 6, 2519-2523
- Uze ら(1997) *Plant Sci* 130, 87-95
- Van den Elzen ら(1985) *Plant Molecular Biology* 5, 299-392
- Velten ら(1984) *EMBO J.* 3, 2723-2730
- Von Heijne ら(1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, 104-126
- Wang ら(1988) *Plant Mol. Biol.* 11, 433-439 50

Warner ら(1993) Plant J. 3, 191-201
 Weissinger ら(1988) Annual Rev. Genet. 22, 421-477
 Wuenn ら(1996) Bio Technol. 14, 171-176
 Yanish-Perron ら(1985) Gene 33, 103-109
 Xu ら(1993) Plant Molec. Biol. 22, 573-588

【図面の簡単な説明】

【図 1】 植物カロテノイド生合成の一般経路を示す図である。酵素名を太字で示す。細菌 *Crt I* 型カロテンデサチュラーゼにより触媒される反応も示す。

【図 2】 中間体ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) はカロテノイド生合成に關与するだけでなく、プレニル化反応を介して異なる化合物（例えば、トコフェロール、キノン、クロロフィル）につながる、または非プレニルアクセプター分子を使用しない別の反応により異なる化合物（例えば、ジベレリン、香料、および芳香物質）につながる経路の構成要素として役立つことも示す図である。

【図 3】 形質転換されてない (図 3 A) イネ植物、および形質転換された (プラスミド A を使用, 図 3 B; プラスミド A と B を使用, 図 3 C) イネ植物に由来する精米イネ種子 (胚乳) の HPLC 分析を示す図である。カロテノイド、環状カロテン、およびキサントフィルの出現は、形質転換種子を示すトレースにおいて明らかである。

【図 4】 「プラスミド A」および「プラスミド B」に用いられる発現カセットを模式的に示す図である。LB, レフトボーダー; RB, ライトボーダー; *psy*, *Narcissus pseudonarcissus* に由来するフィトエンシンターゼ cDNA; *crt I*, *Erwinia uredovora* に由来するカロテンデサチュラーゼ遺伝子; *cyc*, *Narcissus pseudonarcissus* に由来するリコペンシクラーゼ cDNA; *aph IV*, ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ; *Gt 1*, イネグルテリン 1 プロモーター; 35S, CaMV 35S プロモーター; *nos*, ノパリンシンターゼターミネーター; *Npt II*, カナマイシン耐性遺伝子。

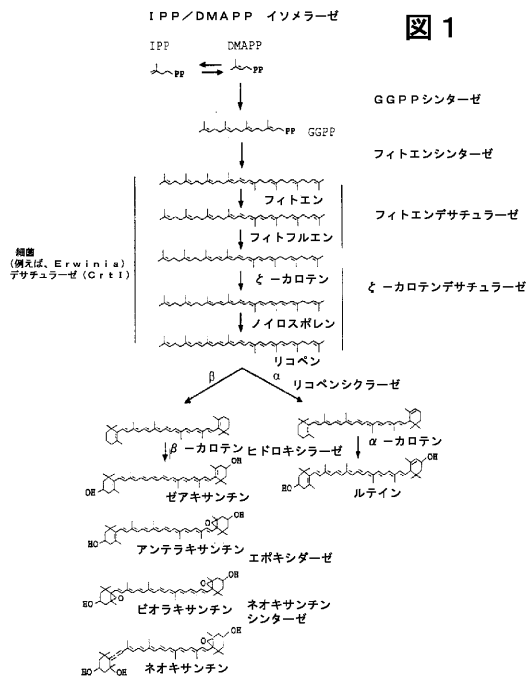
【図 5】 A, 未処理 (レーン 1) および CPTA 処理 (レーン 2) ラップズイセン花に由来する RNA を用いたノザンブロット。B, フィトエンシンターゼ; B, フィトエンデサチュラーゼ; C, ζ-カロテンデサチュラーゼ; E, リコペンシクラーゼの標識プローブを用いたハイブリダイゼーションを可能にするように、固定化 RNA を繰り返しストリップした。B, 未処理 (レーン 1) および処理 (レーン 2) のラップズイセン花に由来するタンパク質抽出物を用いたウェスタンブロット。ブロットを、A, フィトエンシンターゼ; B, フィトエンデサチュラーゼ; C, ζ-カロテンデサチュラーゼ; D, リコペンシクラーゼに対する抗体を用いてプローブした。

10

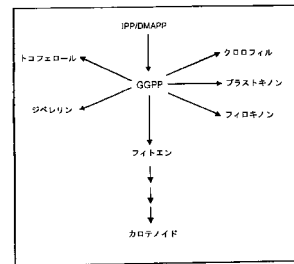
20

30

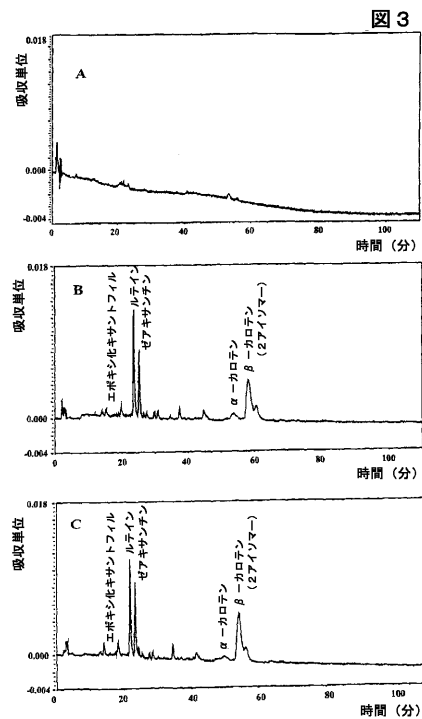
【図 1】



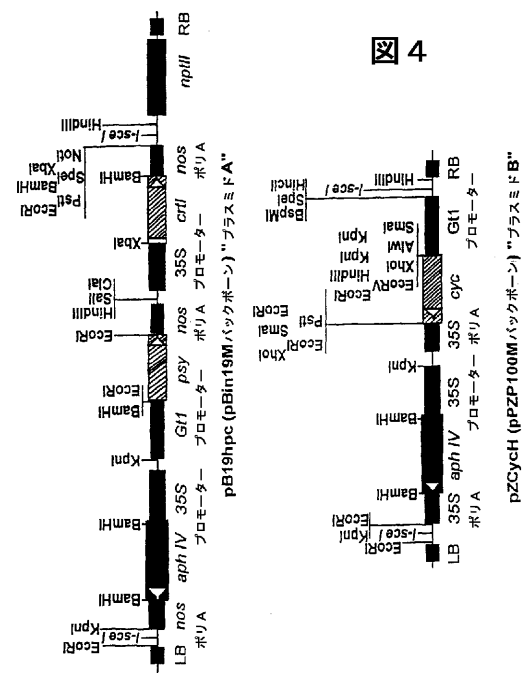
【図 2】



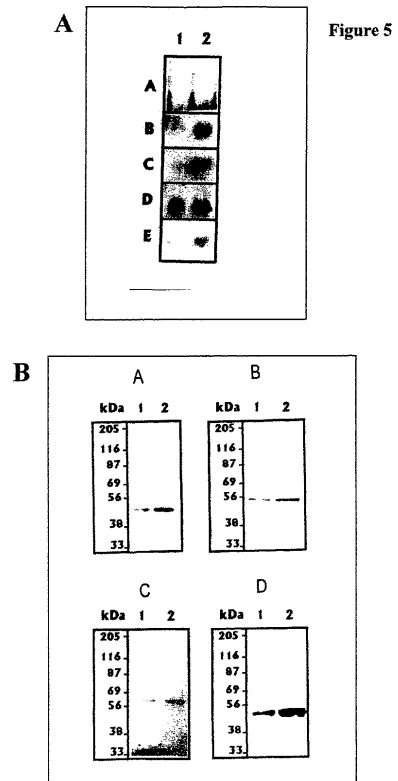
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

審査官 中村 正展

- (56)参考文献 国際公開第99/007867 (WO, A1)
Plant J., 1997年, vol. 11, 1071-1078
GenBank Accession X78814, 1997年 4月13日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?780274:OLD02:117195>
J. Bacteriol., 1990年, vol. 172, 6704-6712
Eur. J. Biochem., 1999年 1月, vol. 259, 396-403
Plant J., 1993年, vol. 4, 833-840
GenBank Accession X78815, 1997年 4月13日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?780270:OLD02:117194>
GenBank Accession AJ224683, 1998年 7月21日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?2924362:OLD02:256778>
J. Biol. Chem., 1994年, vol. 269, 12060-12066
Mol. Cell. Biol., 1990年, vol. 10, 5064-5070
GenBank Accession X98976, 1996年12月20日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?1419692:OLD02:101780>

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12N 5/00- 5/28
A01H 5/00
C12P 23/00
PubMed
CA/MEDLINE/BIOSIS(STN)
WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)