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

特許第4118330号
(P4118330)

(45)発行日　平成20年7月16日(2008.7.16)　(24)登録日　平成20年5月2日(2008.5.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
A01H 5/00	(2006.01)	A01H	5/00	A
C07K 14/415	(2006.01)	C07K	14/415	
C07K 16/16	(2006.01)	C07K	16/16	
C08B 30/00	(2006.01)	C08B	30/00	

請求項の数 76　(全 57 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平9-511479
(86)(22)出願日　平成8年9月19日(1996.9.19)
(65)公表番号　特表平11-512286
(43)公表日　平成11年10月26日(1999.10.26)
(86)国際出願番号　PCT/EP1996/004109
(87)国際公開番号　WO1997/011188
(87)国際公開日　平成9年3月27日(1997.3.27)
審査請求日　平成12年10月19日(2000.10.19)
(31)優先権主張番号　195 34 759.5
(32)優先日　平成7年9月19日(1995.9.19)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号　195 47 733.2
(32)優先日　平成7年12月20日(1995.12.20)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

微生物の受託番号　DSM 10225

(73)特許権者
バイエル　バイオサイエンス　ゲーエムベーハー
ドイツ国　ポツダム　ヘルマンスウェルデル　２０アー
(74)代理人
弁理士　清水　初志
(72)発明者　コスマン　イエンス
ドイツ国　ゴルム　ゴルマー　フィッチェン　９
(72)発明者　ローベルス　ルース
ドイツ国　ベルリン　ルドウィグスフェルデル　ストラッセ　１８

審査官　斎藤　真由美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】修飾澱粉を合成する植物、その産生プロセスおよび修飾澱粉

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

以下の（a）～（e）からなる群より選択される、澱粉顆粒結合型ならびに可溶型として植物細胞内に存在する蛋白質をコードする核酸分子：

（a）配列番号：２に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする核酸分子、

（b）配列番号：１に示すヌクレオチド配列のコード領域を含む核酸分子、

（c）植物において発現された場合に澱粉のリン酸化を増加させる、及び／または大腸菌において発現された場合にグリコーゲンのリン酸化を増加させる蛋白質をコードする、（a）または（b）に記載の核酸分子と厳密な条件下でハイブリダイズする核酸分子、

（d）（a）、（b）または（c）に記載の核酸分子の配列と比較して、その配列が遺伝子コードにより縮重している、核酸分子、

（e）植物において発現された場合に澱粉のリン酸化を増加させる、及び／または大腸菌において発現された場合にグリコーゲンのリン酸化を増加させる蛋白質をコードする、１若しくは複数の核酸が欠失、置換、挿入または組換えられた（b）に記載の核酸分子、

（f）（a）から（d）のいずれかに記載の核酸分子の対立遺伝子変異体、および

（g）植物において発現された場合に澱粉のリン酸化を増加させる、及び／または大腸菌において発現された場合にグリコーゲンのリン酸化を増加させる蛋白質をコードする、配列番号：１に示すヌクレオチド配列のコード領域に対して少なくとも80％の配列同一性を有する核酸分子。

【請求項２】

（g）における配列相同性が90％以上である、請求項１記載の核酸分子。
【請求項３】
請求項１記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項４】
核酸分子が原核細胞および真核細胞における転写を確実にする調節要素と結合している、請求項３記載のベクター。
【請求項５】
請求項１記載の核酸分子または請求項３もしくは４記載のベクターによって遺伝的に修飾された、宿主細胞。
【請求項６】
植物細胞における転写を確実にするDNA調節要素とセンス方向で結合している、請求項１記載の核酸分子で形質転換されたトランスジェニック植物細胞。
【請求項７】
請求項６記載のトランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項８】
請求項６記載の植物細胞または請求項７記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項９】
野生型植物由来の澱粉と比較してリン酸含量が増加している、請求項８記載の澱粉。
【請求項１０】
請求項５記載の宿主細胞を、蛋白質を発現可能な条件下で培養し、該蛋白質を細胞および／または培養培地から単離することを含む、澱粉顆粒結合型ならびに可溶型として植物細胞内に存在する蛋白質の産生方法。
【請求項１１】
請求項１記載の核酸分子によってコードされる、または請求項１０記載の方法によって得られる蛋白質。
【請求項１２】
請求項１１記載の蛋白質を特異的に認識する抗体。
【請求項１３】
請求項１記載の核酸分子と特異的にハイブリダイズする、長さが少なくとも20ヌクレオチドの核酸分子。
【請求項１４】
請求項１記載のDNA分子の転写物と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA分子。
【請求項１５】
植物細胞における発現時に、共抑制効果によって、請求項１記載の核酸分子の発現を減少させるRNAをコードするDNA分子。
【請求項１６】
請求項１４～１５のいずれか一項に記載のDNA分子を含むベクター。
【請求項１７】
DNA分子が、植物細胞における転写を確実にするDNA調節要素と結合している、請求項１６記載のベクター。
【請求項１８】
請求項１４～１５のいずれか一項に記載のDNA分子または請求項１６もしくは１７記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項１９】
以下の（a）または（b）を含む、請求項１１記載の蛋白質の発現が減少しているトランスジェニック植物細胞：
（a）細胞内での請求項１記載の核酸分子の発現を阻害するアンチセンスRNAをコードするDNA分子、または
（b）細胞内での請求項１記載の核酸分子の発現を阻害するセンスRNAをコードするDNA分子。

【請求項２０】
澱粉生合成または修飾に関与する少なくともさらに一つの酵素の活性が非形質転換植物と比較して減少している、請求項１９記載のトランスジェニック植物細胞。
【請求項２１】
分枝酵素の活性が減少している、請求項２０記載のトランスジェニック植物細胞。
【請求項２２】
澱粉顆粒結合型澱粉シンターゼアイソタイプI（GBSS I）の活性が減少している、請求項２１記載のトランスジェニック植物細胞。
【請求項２３】
請求項１９記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項２４】
請求項１９記載の植物細胞または請求項２３記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項２５】
野生型の植物由来の澱粉と比較して減少したリン酸含量を有する、請求項２４記載の澱粉。
【請求項２６】
請求項２０記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項２７】
請求項２０記載の植物細胞または請求項２６記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項２８】
請求項２１記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項２９】
請求項２１記載の植物細胞または請求項２８記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項３０】
野生型の植物由来の澱粉と比較して減少したリン酸含量を有する、請求項２９記載の澱粉。
【請求項３１】
野生型の植物由来の澱粉と比較して増加したアミロース含量を有する、請求項２９または３０記載の澱粉。
【請求項３２】
請求項２２記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項３３】
請求項２２記載の植物細胞または請求項３２記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項３４】
野生型の植物由来の澱粉と比較して減少したリン酸含量を有する、請求項３３載の澱粉。
【請求項３５】
野生型の植物由来の澱粉と比較して増加したアミロペクチン含量を有する、請求項３３または３４記載の澱粉。
【請求項３６】
ジャガイモ澱粉である、請求項２４、２５、２７、２９～３１、及び３３～３５のいずれか一項記載の澱粉。
【請求項３７】
請求項１４～１５のいずれか一項に記載のDNA分子の転写によって得られるRNA分子。
【請求項３８】
細胞における請求項１１記載の蛋白質の量が野生型の細胞と比較して増加していることを特徴とする修飾澱粉を合成するトランスジェニック植物細胞の作製方法。
【請求項３９】
内因性の形で細胞において合成される請求項１１記載の蛋白質の量が細胞内で減少していることを特徴とする修飾澱粉を合成するトランスジェニック植物細胞の作製方法。
【請求項４０】

細胞内における請求項１１記載の蛋白質の量の減少がアンチセンス効果によって引き起こされることを特徴とする、請求項３９記載の方法。
【請求項４１】
細胞内における請求項１１記載の蛋白質の量の減少が共抑制効果によって引き起こされることを特徴とする、請求項３９記載の方法。
【請求項４２】
澱粉生合成および／または修飾に関与する少なくともさらに一つの酵素の酵素活性が減少している、請求項３９～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
酵素が分枝酵素である、請求項４２記載の方法。
【請求項４４】
酵素が澱粉顆粒結合型澱粉シンターゼのアイソタイプI（GBSS I）である、請求項４３記載の方法。
【請求項４５】
請求項３９～４４のいずれか一項に記載の方法によって得られる、減少した請求項１１記載の蛋白質量を有する、植物細胞。
【請求項４６】
請求項４５記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項４７】
請求項４５記載の植物細胞または請求項４６記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項４８】
減少したリン酸含量を有する、請求項４７記載の澱粉。
【請求項４９】
請求項４２記載の方法によって得られる、減少した請求項１１記載の蛋白質量、並びに、澱粉の生合成及び／または修飾に関与するさらに別の少なくとも１つの酵素の酵素活性を有する、トランスジェニック植物細胞。
【請求項５０】
請求項４９記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項５１】
請求項４９記載の植物細胞または請求項５０記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項５２】
請求項４３記載の方法によって得られる、減少した請求項１１記載の蛋白質量、及び、分枝酵素の酵素活性を有する、トランスジェニック植物細胞。
【請求項５３】
請求項５２記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項５４】
請求項５２記載の植物細胞または請求項５３記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項５５】
野生型の植物由来の澱粉と比較して減少したリン酸含量を有する、請求項５４記載の澱粉。
【請求項５６】
野生型の植物由来の澱粉と比較して増加したアミロース含量を有する、請求項５４または５５記載の澱粉。
【請求項５７】
請求項４４記載の方法によって得られる、減少した請求項１１記載の蛋白質量、及び、澱粉顆粒結合型澱粉シンターゼのアイソタイプI（GBSS I）の酵素活性を有する、トランスジェニック植物細胞。
【請求項５８】
請求項５７記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項５９】

請求項５７記載の植物細胞または請求項５８記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項６０】
野生型の植物由来の澱粉と比較して減少したリン酸含量を有する、請求項５９記載の澱粉。
【請求項６１】
増加したアミロペクチン含量を有する、請求項５９または６０記載の澱粉。
【請求項６２】
ジャガイモ由来であることを特徴とする、請求項４７、４８、５１、５４～５６、及び５９～６１のいずれか一項に記載の澱粉。
【請求項６３】
請求項３８記載の方法によって得られ、増加した請求項１１記載の蛋白質量を有する、トランスジェニック植物細胞。
【請求項６４】
請求項６３記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
【請求項６５】
請求項６３記載の植物細胞または請求項６４記載の植物体から得られる澱粉。
【請求項６６】
増加したリン酸含量を有する、請求項６５記載の澱粉。
【請求項６７】
請求項６記載の植物細胞を含む請求項７記載の植物体の繁殖材料。
【請求項６８】
請求項１９～２２、４５、４９、５２、５７及び６３のいずれか一項に記載の植物細胞を含む、請求項２３、２６、２８、３２、４６、５０、５３、５８及び６４のいずれか一項に記載の植物体の繁殖材料。
【請求項６９】
ジャガイモ植物である、請求項２３、２６、２８、３２、４６、５０、５３、５８及び６４のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物体。
【請求項７０】
低温甘味化の減少を示す塊茎を含む、請求項６９記載のジャガイモ植物体。
【請求項７１】
請求項６９または７０記載のジャガイモ植物体の塊茎。
【請求項７２】
野生型植物の塊茎と比較して低温甘味化の減少を示す、請求項７１記載の塊茎。
【請求項７３】
米、トウモロコシ、小麦、大麦、オート麦、ライ麦またはキャッサバ植物である、請求項２３、２６、２８、３２、４６、５０、５３、５８及び６４のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物体。
【請求項７４】
揚げた食品の製造における請求項７１または７２記載の塊茎の使用。
【請求項７５】
揚げた食品がフライドポテトである、請求項７４記載の使用。
【請求項７６】
揚げた食品がポテトチップスである、請求項７４記載の使用。
【発明の詳細な説明】
本発明は、粘度特性が修飾され、リン酸含量が修飾された修飾澱粉を合成するトランスジェニック植物細胞および植物を産生する方法および組換えDNA分子と共に、澱粉顆粒結合型蛋白質をコードする核酸分子に関する。本発明はまた、これらの方法の結果得られる植物細胞および植物、ならびにトランスジェニック植物細胞および植物から得られる澱粉にも関する。
植物における最も重要な貯蔵物質の一つである多糖類澱粉は、食品領域で用いられるのみ

ならず、工業製品の製造において再生材料として重要な役割を果たしている。この原材料を可能な限り多くの領域で利用できるようにするため、これらの物質を加工産業の多様な需要に適合させると共に、非常に多様な物質を得ることが必要である。
澱粉は化学的に均一な基本成分、すなわちグルコースで構成されているが、これは均一な原料を表していない。むしろ、澱粉は、その重合の程度およびグルコース鎖の分枝の発生が互いに異なる様々なタイプの分子の複雑な混合物である。特に、α-1,4-グリコシド分枝グルコース分子で構成される基本的に分枝していないポリマーであるアミロース澱粉と、逆により多く分枝しているかまたはより分枝していないグルコース鎖の混合物であるアミロペクチン澱粉とは異なる。分枝はα-1,6-グリコシド相互結合の出現に起因する。
主に、分枝の程度、アミロース／アミロペクチン比、平均的な鎖の長さ、およびリン酸基の存在によって決定される澱粉の分子構造は、それぞれ、澱粉またはその水溶液の重要な機能特性に重要である。重要な機能特性とは、例えば、澱粉の溶解性、老化傾向、薄膜形成能力、粘度、色の安定性、ペースト化特性すなわち結合および接着特性、ならびに低温耐性である。澱粉粒子径もまた、様々な用途にとって重要となりうる。アミロース含量の高い澱粉の産生は特に重要である。さらに、植物細胞に含まれる修飾澱粉は、特定の条件下で、植物細胞の行動を都合良く変化させる可能性がある。例えば、さらなる加工の前に、例えば澱粉抽出によって、種子および塊茎のような澱粉含有器官の貯蔵中の澱粉の分解を減少させることは可能であると考えられる。その上この澱粉を含む植物細胞および植物器官を、例えばジャガイモからのポップコーンもしくはコーンフレークスの生産またはジャガイモからのフライドポテト、ポテトチップスもしくはジャガイモ粉末の生産のようなさらなる加工により適するようにする修飾澱粉の生産にはいくつかの関心が寄せられている。澱粉の「低温甘味化」の減少、すなわち低温で長期保存の際の還元糖（特にブドウ糖）の放出を減少させるように、澱粉を改善することに特に関心が集まっている。特に、ジャガイモは、保存中の澱粉の分解を最小限にするために、しばしば４～８℃の温度で保存される。その結果、放出された還元糖、特にブドウ糖は、フライドポテトおよびポテトチップスの生産時に望ましからぬ褐変反応（いわゆるマイラール反応）を引き起こす。
植物から単離された澱粉はしばしば、化学修飾によって特定の工業目的に適応されるが、これは一般的に時間および費用が非常にかかる。したがって、その特性が産業の要件をすでに満たしている特性の澱粉を合成する植物体を作製する可能性を探ることが望ましい。そうした植物体を作製する従来の方法は、古典的な品種改良法および変異株の産生である。したがって、例えば、改変された粘度を有する澱粉を合成するトウモロコシから変異体が作製され（米国特許明細書第5,331,108号）、トウモロコシ変種（ロウ質のトウモロコシ）がほぼ100％アミロペクチンからなる澱粉を作り出すことによって確立された（アカスカ（Akasuka）およびネルソン（Nelson）,J.Biol.Chem.241（1966）,2280～2285）。さらに、アミロース含量の高い（トウモロコシでは70％、またはエンドウでは50％まで）澱粉を合成するジャガイモおよびエンドウの変異株が記述されている。これらの変異株はこれまで、分子レベルでの特徴付けがなされておらず、したがって、他の澱粉貯蔵植物ではこれに相当する変異株の産生は考慮されていない。
または、改変された特性を有する澱粉を合成する植物体は、DNA組換え技術によって作成してもよい。さまざまな事例において、これらの植物体において合成される澱粉を改変する目的で、例えば、ジャガイモ植物を組換え修飾したケースが記載されている（例えば、国際公開公報第92/11376号；国際公開公報第92/14827号）。しかし、DNA組換え技術を利用するためには、その遺伝子産物が澱粉合成、澱粉修飾または澱粉分解に影響を及ぼすDNA配列が必要である。
したがって、本発明の基礎となる問題は、植物において天然に合成される澱粉とは物理学的および／または化学的特性が異なる澱粉、特にアミロース含量の高い澱粉を合成するように植物を変化させ、したがって一般的および／または特殊な利用により適する核酸分子および方法を提供することである。
この問題は、請求の範囲に記述される態様を提供することにより解決される。
したがって、本発明は配列番号：２に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする

核酸分子に関する。そのような蛋白質は、植物細胞のプラスチド中に、遊離している、すなわち可溶型として存在すると共に澱粉顆粒に結合して存在する。大腸菌の発現の際に、そのような蛋白質の酵素活性により、細胞内に合成されるグリコーゲンのリン酸化が増加する。これらの蛋白質の分子量は、これをSDSゲル電気泳動によって評価する場合、140～160kDの範囲内にある。

本発明はさらに、配列番号：１に示されるヌクレオチド配列、特に配列番号：１に示されるコード領域を有する配列を含む核酸分子に関する。

細胞のプラスチド中で部分的に顆粒に結合しているジャガイモ由来の蛋白質をコードし、本発明の上記核酸分子またはその相補鎖とハイブリダイズする核酸分子もまた、本発明の主題である。この意味において、「ハイブリダイゼーション」という用語は従来のハイブリダイズ条件下、好ましくは例えばサムブルック（Sambrook）らの、分子クローニング、実験マニュアル（Molecular Cloning,A Laboratory Manual）第２版（1989）Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NYに記述されたように、好ましくは厳密な条件下でのハイブリダイゼーションを示す。本発明の核酸分子とハイブリダイズするこれらの核酸分子は主として、そのような核酸分子を含むいかなる所望の有機物（すなわち、原核生物または真核生物、特に細菌、真菌、藻類、植物または動物の有機物）に由来してもよい。それらは、好ましくは単子葉植物または双子葉植物、特に有用な植物に由来し、澱粉貯蔵植物由来であることが特に好ましい。

本発明に係る分子とハイブリダイズする核酸分子は、例えば多様な生物のゲノムまたはcDNAライブラリから単離してもよい。

それによって、そのような核酸分子の同定および単離は、本発明に係る分子もしくはこれらの分子の一部、または場合により、例えば標準的な方法（例えば、サムブルック（Sambrook）ら（1989）、分子クローニング、実験マニュアル（Molecular Cloning,A Laboratory Manual）第２版Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY）に従うハイブリダイゼーションにより、これらの分子の逆相補鎖を用いることによって行ってもよい。

ハイブリダイゼーションのプローブとして、例えば配列番号：１に示すヌクレオチド配列またはその一部を、正確にまたは基本的に含む核酸分子を用いてもよい。ハイブリダイゼーションプローブとして用いるDNA断片はまた、従来のDNA合成法によって産生され、その配列が本発明の核酸分子の配列と基本的に同一である合成DNA断片であってもよい。本発明に係る核酸配列とハイブリダイズさせる遺伝子を同定および単離後、配列を決定し、この配列によってコードされる蛋白質の特性を分析しなければならない。

さらに本発明は、上記分子の配列と比較して、その配列が遺伝子コードにより縮重され、植物細胞のプラスチド中で部分的に顆粒に結合する蛋白質をコードする核酸分子に関する。

上記蛋白質をコードする上記核酸分子の断片、誘導体、および対立遺伝子変異体もまた、本発明の主題である。それによって、断片は、上記蛋白質をコードするには十分な長さの核酸分子の一部として記述される。この意味において、「誘導体」という用語は、これらの分子の配列が上記核酸分子の配列とは１つ以上の位置において異なり、これらの分子配列と高度の相同性を示すことを意味する。ここで、相同性とは少なくとも40％の配列同一性を意味し、特に少なくとも60％の配列同一性、好ましくは80％以上の配列同一性、およびより一層好ましくは90％以上の配列同一性を意味する。上記核酸分子と比較して生じる逸脱は、欠失、置換、挿入または組換えによって引き起こされてもよい。

さらに相同性は、各核酸分子またはそれらがコードする蛋白質間に機能的および／または構造的等価性が存在することを意味する。上記核酸分子と相同で、これらの分子の誘導体を表す核酸分子は、一般にこれらの核酸分子の変異体であり、同じ生物学的機能を発揮する修飾となる。これらの変異体は天然に起こる変異体、例えば、それによってこれらの変異が天然に起こる可能性があり、またはそれらが故意に導入される可能性がある異なる生物由来の配列または変異体であってもよい。その上、変異体は合成して産生された配列であってもよい。

対立遺伝子変異体は、合成して作製された変異体またはDNA組換え技術によって作製された変異体と共に天然に起こるものであってもよい。
本発明に係る核酸分子の様々な変異体によってコードされる蛋白質は、特定の共通の特徴を示す。酵素活性、分子量、免疫学的反応性、コンフォーメーション等は、ゲル電気泳動における移動度、クロマトグラフィー特徴、沈降係数、可溶性、分光的特性、安定性、至適pH、至適温度等のような物理学的特性と共に、これらの特徴に属してもよい。
本発明の核酸分子は、主として記述の蛋白質を発現するいかなる生物に由来するものでもよい。それらは好ましくは、植物、特に澱粉合成または澱粉貯蔵植物に由来する。穀物（大麦、ライ麦、オート麦、小麦等）、トウモロコシ、米、エンドウ、キャッサバ、ジャガイモ等は特に好ましい。それらはまた、当業者に既知の合成法によって産生することができる。
本発明の核酸分子は、RNA分子と共にcDNAまたはゲノムDNAのようなDNA分子であってもよい。
さらに、本発明は、ベクター、特に本発明の上記核酸分子を含むプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、および遺伝子操作に一般的なその他のベクターに関する。
好ましい態様において、ベクターに含まれる核酸分子は原核生物および真核生物細胞において翻訳可能なRNAの転写および合成を確実にする調節要素に結合している。
さらなる態様において、本発明は、宿主細胞、特に、本発明の上記核酸分子または本発明のベクターによって、形質転換されたおよび／または組換え操作された原核細胞または真核細胞と共に、そのような細胞に由来し、本発明の核酸分子または本発明のベクターを含む細胞に関する。これは、好ましくは細菌細胞または植物細胞である。
本発明の核酸分子によってコードされる蛋白質は、澱粉合成または修飾に影響を及ぼし、植物細胞における蛋白質量の変化により、植物の澱粉代謝の変化、特に物理化学的特性が修飾された澱粉の合成が起こることが今や判明した。
本発明の核酸分子を提供することによって、その構造および物理化学的特性が野生型植物で合成される澱粉とは異なる修飾澱粉を合成するDNA組換え技術によって植物を作製することが可能である。この目的のため、本発明の核酸分子は、植物細胞において転写および翻訳を確実にする調節要素に結合し、植物細胞中に導入される。
したがって、本発明はまた、それによって植物細胞において転写を確実にする調節要素に結合している本発明の核酸分子を含むトランスジェニック植物細胞に関する。調節要素は、好ましくは核酸分子に関して異種である。
当業者に既知の方法によって、トランスジェニック植物細胞は、完全な植物体に再生させることが可能である。本発明のトランスジェニック植物細胞の再生によって得られる植物体もまた、本発明の主題である。本発明のさらなる主題は、上記トランスジェニック植物細胞を含む植物である。トランスジェニック植物は原則としていかなる所望の種の植物、すなわち双子葉植物ならびに単子葉植物であってもよい。これらは、好ましくは有用植物であり、特に穀類（ライ麦、大麦、オート麦、小麦等）、米、トウモロコシ、エンドウ、キャッサバ、およびジャガイモのような澱粉貯蔵植物であることが好ましい。
本発明の核酸分子の発現または付加的発現のため、本発明のトランスジェニック植物細胞および植物は、野生型植物、すなわち非形質転換植物の澱粉と比較して、特にこの澱粉の水溶液の粘度および／またはリン酸含量が修飾されている澱粉を合成する。後者は一般にトランスジェニック植物細胞または植物の澱粉では増加しており、これにより澱粉の物理学的特性が変化する。
したがって、本発明のトランスジェニック植物細胞および植物から得られる澱粉もまた、本発明の主題である。
本発明のさらなる主題は、その中で蛋白質の発現を可能にするような条件下で本発明の宿主細胞を培養し、その蛋白質を培養細胞および／または培養培地から単離する、可溶性型と共に顆粒結合型として植物細胞に存在する蛋白質の産生法である。
さらに、本発明は、上記方法によって得られる蛋白質と共に、本発明の核酸分子によって

コードされる蛋白質に関する。これらは、好ましくは、核遺伝子によってコードされる蛋白質で、プラスチド中に位置する蛋白質である。プラスチドの中で、これらの酵素は遊離型と共に顆粒結合型として存在する。SDSゲル電気泳動では、ソラナム・ツベロッサム（Solanum tuberosum）由来の各蛋白質は分子量140～160kDを示し、大腸菌の発現の際に、細胞内で合成されるグリコーゲンのリン酸化の増加が起こる。

本発明のさらなる主題は、本発明の蛋白質を特異的に認識する抗体である。これらはポリクローナル抗体と共にモノクローナル抗体であってもよい。

さらに本発明は、本発明の核酸分子と特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの長さを示す核酸分子に関する。この意味において、特異的にハイブリダイズするとは、従来のハイブリダイゼーション条件下で、好ましくは厳密な条件下で、他の蛋白質をコードする配列とのクロスハイブリダイゼーションが有意に起こらないことを意味する。そのような核酸分子は、好ましくは長さが少なくとも20ヌクレオチドであり、より好ましくは少なくとも50ヌクレオチドであり、最も好ましくは少なくとも100ヌクレオチドである。そのような分子は例えば、PCRプライマーとして、ハイブリダイゼーションプローブとして、またはアンチセンスRNAをコードするDNA分子として用いることができる。

さらに、細胞内の、本発明に係る核酸分子によってコードされる蛋白質の量を減少させることによって、植物細胞において合成される澱粉の特性に影響を及ぼすことが可能であることが判明した。この減少は例えば、本発明の核酸分子のアンチセンス発現、適当なリボザイムの発現、または共抑制によって得てもよい。

したがって、本発明のDNA分子の転写物に相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA分子もまた、これらのアンチセンス分子と共に本発明の主題である。ここで、相補的とは、コードされたRNAが100％相補的でなければならないことを意味しない。植物細胞での発現時に本発明の蛋白質の発現を阻害するのに十分高い相補性であれば、低い程度の相補性で十分である。転写されたRNAは、本発明の核酸分子の転写物に対して、好ましくは少なくとも90％、最も好ましくは少なくとも95％の相補性を有する。植物細胞において転写の間にアンチセンス効果を引き起こすためには、該DNA分子が少なくとも15bpの長さであり、好ましくは100bp以上の長さであり、最も好ましくは500bp以上の長さであるが、通常5000bpより短く、好ましくは2500bpより短い。

本発明はさらに、植物細胞における発現の間、共抑制効果により植物細胞において上記蛋白質をコードする本発明の核酸分子の発現を減少させるRNAの合成に至るDNA分子に関する。対応するDNA配列の産生と共に共抑制の原理は例えば、国際公開公報第90/12084号に正確に記述されている。そのようなDNA分子は、好ましくは本発明の核酸分子の転写物と高い相同性を示すRNAをコードする。しかし、コードするRNAが蛋白質に翻訳可能であることは必ずしも必要ではない。

さらなる態様において、本発明はこれらのコードされたRNA分子と共に、本発明のDNA分子の転写物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNA分子をコードするDNA分子に関する。

リボザイムは、RNA分子および特異的標的配列を開裂することが可能な触媒活性のあるRNA分子である。組換えDNA技法を用いて、リボザイムの特異性を変化させることが可能である。リボザイムには多様なクラスがある。特定の遺伝子の転写物の特異的開裂を目的とする実際の応用では、好ましくは、典型的な異なる２つのグループのリボザイムが用いられる。第一のグループはグループIイントロンリボザイムタイプに属するリボザイムから成る。第二のグループは、特徴的な構造特性としていわゆる「ハンマーヘッド」モチーフを示すリボザイムから成る。標的RNA分子の特異的認識は、このモチーフに隣接する配裂を変化させることによって修飾してもよい。標的分子における配列との塩基対合によって、これらの配列から、触媒反応が起こり、したがって標的分子の開裂が起こる位置が決定される。効率的な開裂に対する配列要件は極めて低いため、事実上それぞれの所望のRNA分子に対して特異的なリボザイムを開発することが原則的には可能である。

本発明のDNA分子の転写物を特異的に開裂するリボザイムをコードするDNA分子を作製するために、例えば、リボザイムの触媒ドメインをコードするDNA配列を標的酵素の配列と相

同なDNA配列の両側に結合させる。触媒ドメインをコードする配列は例えば、SCMoウイルスのサテライトDNAの触媒ドメイン（デービーズら（Davies）、Virology 177（1990）、216～224）であってもよく、TobRウイルスのサテライトDNAの触媒ドメイン（スタイネッケら（Steinecke）、EMBO J.11（1992）、1525～1530；ハセロフ＆ゲルラック（Haseloff and Gerlach）、Nature334（1988）、585～591）であってもよい。触媒ドメインに隣接するDNA配列は、好ましくは本発明の上記DNA分子に由来する。

さらなる態様において、本発明は上記DNA分子を含むベクター、特に記述のDNA分子が植物細胞において転写を確実にする調節要素に結合しているベクターに関する。

さらに、本発明は記述のDNA分子またはベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、細菌細胞のような原核細胞であっても、または真核細胞であってもよい。真核生物宿主細胞は、好ましくは植物細胞である。

さらに、本発明は、それによってDNA分子が植物細胞において転写を確実にするDNAエレメントに結合する、アンチセンスRNAをコードする上記のDNA分子、リボザイムまたは共抑制効果を起こすRNAを含むトランスジェニック植物細胞に関する。これらのトランスジェニック植物細胞は、周知の技法に従って完全な植物体に再生させてもよい。このように、本発明はまた、記述のトランスジェニック植物細胞を含む植物と共に、記述のトランスジェニック植物細胞からの再生を通じて得てもよい植物に関する。トランスジェニック植物そのものは、いかなる所望の植物種の植物であってもよく、好ましくは有用植物、特に上記に示したような澱粉貯蔵植物であってもよい。

トランスジェニック植物細胞におけるアンチセンスDNA、リボザイムまたは共抑制RNAをコードする記述のDNA分子の発現により、細胞内に内因性の形で存在する本発明のDNA分子によってコードされる蛋白質量は減少する。驚くべきことに、この減少は、植物細胞または植物部分の低温での貯蔵における還元糖の放出と共に、植物細胞において合成される澱粉の物理化学的特性、特にこの澱粉の水溶液の粘度特性、リン酸含量に劇的な変化をもたらす。トランスジェニック植物細胞において合成される澱粉の特性は以下に明白に記述する。

したがって、記述のトランスジェニック植物細胞および植物から得られる澱粉もまた、本発明の主題である。

さらに、本発明は、リボザイム活性を有するRNA分子、および例えば転写によって得られる共抑制効果を引き起こすRNA分子と共に、記述のDNA分子によってコードされるアンチセンスRNA分子に関する。

本発明のさらなる主題は、非形質転換細胞と比較して修飾された澱粉を合成するトランスジェニック植物細胞の作製方法である。この方法では、細胞内に内因性の形で存在する本発明のDNA分子によってコードされる蛋白質量は、植物細胞において減少している。

好ましい態様において、この減少はアンチセンス効果によって行われる。この目的のため、本発明のDNA分子またはその一部を、植物細胞において転写を確実にするプロモーター、およびおそらく転写物のポリアデニル化と共に転写を確実に終結させる終止シグナルとアンチセンス方向で結合させる。植物細胞において効果的なアンチセンス効果を確実に得るために、合成されたアンチセンスRNAは最少でも15ヌクレオチドの長さを示さなければならず、好ましくは少なくとも100ヌクレオチドであり、最も好ましくは500ヌクレオチド以上である。さらに、アンチセンスRNAをコードするDNA配列は、形質転換すべき植物種に関して同種でなければならない。しかし、細胞内に内因性の形で存在するDNA配列と高度の相同性を示すDNA配列を用いてもよく、好ましくは90％以上の相同性、最も好ましくは95％以上の相同性を有する。

さらなる態様において、本発明のDNA分子によってコードされる蛋白質の量の減少はリボザイム効果によって行われる。リボザイムの基本的効果は、そのようなRNA分子をコードするDNA分子の構築と共に、既に先に記述されている。トランスジェニック細胞においてリボザイム活性を有するRNAを発現するためには、リボザイムをコードする上記のDNA分子を、植物細胞において転写を確実にするDNAエレメント、特にプロモーターおよび終止シグナルに結合させる。植物細胞において合成されるリボザイムにより、植物細胞に内因性

の形で存在する本発明のDNA分子の転写物が開裂される。
本発明の核酸分子によってコードされる蛋白質の量を減少させるためのさらなる可能性は、共抑制である。したがって、本発明の方法によって得られる植物細胞がさらに主題である。これらの植物細胞は、本発明のDNA分子によってコードされる蛋白質量が減少しており、野生型の細胞と比較して修飾された澱粉を合成するという点を特徴とする。
さらに、本発明は、本発明の記述の細胞を含む植物と共に、記述の植物細胞の再生によって得られる植物に関する。
記述の植物細胞および植物から得られる澱粉もまた、本発明の主題である。この澱粉は、その物理および／または化学的特性が非形質転換細胞または植物から得られる澱粉と異なる。野生型植物の澱粉と比較すると、この澱粉はリン酸含量の減少を示す。その上、この澱粉の水溶液は修飾された粘度特性を示す。
好ましい態様において、記述の澱粉のリン酸含量は、野生型植物由来の澱粉と比較して少なくとも50％減少し、より好ましくは少なくとも75％、特に好ましい態様においては80％以上減少している。
この澱粉の水溶液の修飾粘度はその最も有利な特徴である。
粘度を決定するよく確立された試験はいわゆるブラベンダー試験である。この試験は、例えばビスコグラフEとして知られる器具を用いることによって実施される。この装置は、数ある中でブラベンダーfOHGデュースブルグ（ドイツ）が製造および販売している。
試験は基本的に、澱粉顆粒の水和および膨張が起こる時間を評価するために、まず水の存在下で澱粉を加熱する工程を含む。ゼラチン化またはペースト化とも呼ばれるこのプロセスは、水素結合の分解に基づき、澱粉懸濁液における粘度の測定可能な増加に関与している。ゼラチン化後にさらに加熱すると澱粉粒子が完全に溶解し、粘度が減少するが、ゼラチン化後急速に冷却すると典型的に粘度の増加が起こる（図３参照）。ブラベンダー試験の結果は、時間に対する粘度を示すグラフで、ここでまず溶液をゼラチン化温度以上に加熱し、次に冷却する。
ブラベンダーグラフの解析は一般に、ペースト化温度、加熱時の最大粘度、冷却時の粘度の増加と共に、冷却後の粘度の測定を目的とする。これらのパラメータは、澱粉の品質および様々な目的への利用の可能性に関する重要な特徴である。
例えば、細胞内の本発明の蛋白質量がアンチセンス効果によって減少しているジャガイモ植物から単離される澱粉は、野生型植物から単離される澱粉の特徴とは大きく異なる特徴を示した。これらと比較すると、この澱粉のみが冷却時の粘度のより大きな増加と共に、加熱時の粘度の小さな増加、低い最大粘度を示す（図３、４および５参照）。
好ましい態様において、本発明は、その水溶液が図４または５に描写するような特徴的な粘度特性を示す澱粉に関する。特に、ブラベンダー粘度計を用いて粘度を決定するために実施例８aで述べた条件下では、修飾澱粉は野生型植物と比較して、溶液の加熱時の粘度の増加はごく僅かであるという特徴を示す。これにより、高濃縮接着剤の産生に澱粉を用いる機会が提供される。
その上、最大粘度に達した後、修飾澱粉の場合では粘度の減少はごく僅かである。一方、冷却時には粘度は非常に増加する；このように、修飾澱粉の粘度は野生型植物の澱粉の粘度より高い。
トランスジェニック植物細胞における本発明の蛋白質量を減少させることによって、さらに、この澱粉を含む植物部分を低温、特に４～８℃で保存する場合、非形質転換細胞の澱粉の場合より還元糖の放出がより少ない、という効果を有する澱粉を産生することが可能である。この特性は例えば、低温保存の際の還元糖の放出が少なく、したがって低温甘味化が減少したジャガイモを提供するのに特に有利である。そのようなジャガイモは、望ましからぬ褐変反応（マイラール反応）を回避できるため、または使用中少なくとも非常に減少するため、フライドポテト、ポテトチップス、または同類製品の製造に特に適している。
本発明の特に好ましい態様において、本発明の蛋白質の合成が形質転換植物細胞において減少しているばかりでなく、少なくとも１つのさらなる酵素の合成も澱粉合成および／ま

たは修飾に関与している。この意味において、例えば、澱粉顆粒結合型澱粉シンターゼまたは分枝酵素が好ましい。驚くべきことに、分枝酵素の合成と共に、本発明の蛋白質の合成がアンチセンス効果のために減少しているジャガイモ植物は、その特性が野生型植物の澱粉の特性とは大きく異なる澱粉を合成することが判明した。

野生型澱粉と比較すると、この修飾澱粉の水溶液は加熱または冷却時に粘度の増加をほとんど示さない（図６参照）。

さらに、澱粉粒子を加熱前後に顕微鏡分析すると、野生型植物と比較して、そのように修飾された植物の澱粉顆粒は開裂していないが、その構造は依然として基本的に不変であることが明らかに示される。したがって、これは加熱工程に耐性な澱粉である。この澱粉のアミロース含量を実施例に記述の方法によって測定する場合、この澱粉について測定されるアミロース含量は50％以上であり、好ましくは60％以上であり、最も好ましくは70％以上である。この植物から単離された澱粉の水溶液は、好ましくは図６に描写した特徴的な粘度特性を示す。

本発明のそのようなアミロース含量の高い澱粉は、野生型植物と比較して様々な利用に多くの利点を提供する。このように、アミロース含量の高い澱粉は、ホイルおよびフィルムでの使用に高い可能性を有する。アミロース含量の高い澱粉に基づいて産生されるホイルおよびフィルムは、包装産業の広い領域に用いられる可能性があり、生物分解性という本質的な利点を有する。古典的な、石油化学的に産生されたポリマーによって基本的にカバーされるこの利用法とは別に、アミロースはさらに、ヘリックスを形成するというアミロースの特性によって生じる独自の応用分野を有する。アミロースによって形成されるヘリックスは、内部が疎水性で、外部が親水性である。このため、アミロースは低分子または高分子物質の複合体形成および分子カプセル化に用いてもよい。従って実施例としては以下のものがある：

－　酸化、揮発、熱分解または水性環境への移行から保護するためのビタミンおよび物質の分子カプセル化；

－　可溶性を増加させるための芳香性物質の分子カプセル化；

－　安定化および制御放出のための化学肥料／殺虫剤の分子カプセル化；

－　用量調節の安定化および遅延製剤の調節放出のための医用物質の分子カプセル化。

アミロースのもう一つの重要な特性は、これがキラル分子であるという事実である。キラル性のため、これは好ましくは、エナンチオマーを分離するために例えば、カラム上に固定化した後に用いる。

さらに、驚くべきことに、細胞内の本発明の蛋白質量がアンチセンス効果のために減少しているジャガイモ植物から単離される澱粉は、澱粉顆粒結合型澱粉シンターゼアイソタイプI（GBSS I）の酵素活性を示す蛋白質の減少と共に、野生型植物から単離される澱粉の特徴とは大きく異なる特徴を示すことが判明した。野生型植物の澱粉と比較すると、この澱粉の水溶液は、加熱時に粘度のごくわずかな増加、低い最大粘度ならびに冷却時に粘度の増加がほとんどないことを示す（図７参照）。この澱粉のアミロース／アミロペクチン比を求めると、この澱粉はほとんどアミロースが測定できないという特徴を有する。この澱粉のアミロース含量は、好ましくは５％未満であり、最も好ましくは２％未満である。さらに、本発明の澱粉は、組換えDNA技法だけでGBSS I遺伝子を阻害することによってトランスジェニックジャガイモ植物において産生される既知の澱粉とは異なる。このように、この澱粉は加熱時に粘度の強い増加を示す。本発明の澱粉の水溶液は、好ましくは図７に示した特徴的な粘度特性を示す。特に、実施例13に記述するラピッドビスコアナライザー（Rapid Visco Analyser）によって粘度を測定する条件下では、修飾澱粉は野生型澱粉と比較しても、ロウ質澱粉と比較しても加熱時の粘度の増加はごく僅かであるという特徴を有する。このことから、高濃縮接着剤の作製のために本発明の澱粉を利用する機会が提供される。修飾澱粉はさらに、冷却時の粘度の増加がほとんどないことと共に、最大粘度に達した後の粘度の減少がごく僅かであるという特性を有する。

植物細胞における分枝酵素活性を減少させる可能性については既に、例えば、国際公開公報第92/14827号および国際公開公報第95/26407号に記述されている。澱粉顆粒結合型澱粉

シンターゼのアイソタイプI（GBSS I）活性の減少は、当業者に既知の方法を用いることによって、例えば、アンチセンス効果によって実施してもよい。ジャガイモ由来のGBSS Iをコードする DNA配列は例えば、ヘゲルスベルグ（Hegersberg）（ケルン大学学位論文（1988））、ビッサーら（Visser）（Plant Sci.64（1989）、185～192）またはファンデルレイら（van der Leiy）（Mol.Gen.Genet.228（1991）、240～248）からも既知である。
本発明の方法は、原則としていかなる植物種に対して用いてもよい。単子葉植物および双子葉植物は、特に有用な植物で好ましくは穀類（ライ麦、大麦、オート麦、小麦等）、米、トウモロコシ、エンドウ、キャッサバ、およびジャガイモのような澱粉貯蔵植物が関心対象である。
本発明の枠組みにおいて、「植物細胞において転写を確実にするDNA調節要素」という用語は、植物細胞において転写を開始または終結させるDNA領域である。転写開始を確実にするDNA領域は特にプロモーターである。
植物における本発明の多様な上記DNA分子の発現のためには、植物細胞において機能するいかなるプロモーターを用いてもよい。プロモーターは使用する植物種に関して同種または異種であってもよい。例えば、全ての植物組織において構成的な発現を確実にするカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター（オーデルら（Odell）、Nature313（1985）、810～812）および国際公開公報第94/01571号に記述されたプロモーター構築物を利用してもよい。しかし、外因性因子によって決定される時点でのみ（国際公開公報第93/07279号のように）、または植物の特定の組織（例えば、ストックハウスら（Stockhaus）、EMBO J.8（1989）、2245～2251参照）において、その後の配列を発現させるプロモーターを利用してもよい。好ましくは、形質転換すべき植物の澱粉貯蔵部分において活性なプロモーターを用いる。ジャガイモ（potato）の場合、これらの部分は種いも、ジャガイモ（potatoes）の場合は塊茎である。ジャガイモを形質転換させる場合には、塊茎特異的B33-プロモーター（ロチャソサら（Rocha-Sosa）、EMBO J.8（1989）、23～29）を特に用いてもよいがこれに限定しない。
プロモーターは別として、転写を開始させるDNA領域はまた、いわゆるエンハンサー要素のような、転写を確実にさらに増加させるDNA配列を含んでいてもよい。さらに、「DNA調節要素」という用語はまた、転写を正確に終結させ、転写物を安定化させると考えられているポリAテールを転写物に付加する役割を果たす終止シグナルを含んでいてもよい。そのような要素は文献に記載されており、自由に交換可能である。そのような終止配列の例は、ノパリン・シンターゼ遺伝子（NOS遺伝子）もしくはアグロバクテリア由来のオクトピン・シンターゼ遺伝子（ジーレン（Gielen）ら,EMBO J.8（1989）,23～29）のポリアデニル化シグナルを含む3’-非翻訳領域、または大豆由来の保存蛋白の遺伝子の3’-非翻訳領域、並びにリブロース-1,5-ビスフォスフェートカルボキシラーゼの小さいサブユニットの遺伝子（ssRUBISCO）である。
本発明のDNA分子の植物細胞への導入は、好ましくはプラスミドを用いて行う。植物ゲノムへのDNAの安定的な組み込みを確実にするプラスミドが好ましい。
本発明の実施例において、バイナリベクターpBinAR（ホフゲン＆ウィルミッツァー（Höfgen and Wilmitzer）、Plant Sci.66（1990）、221～230）を利用する。このベクターはバイナリベクターpBin19（ビーバン（Bevan）,Nucl.Acids.Res.12（1984）、8711～8721）の誘導体で、これは市販されている（クロンテック・ラボラトリーズ、インク、USA）。
しかし、発現カセットに導入することができ、植物ゲノムへの発現カセットの組み込みを確実にするその他の植物形質転換ベクターを利用してもよい。
高等植物において異物遺伝子の導入を調製するためには、大腸菌に対する複製シグナルおよび形質転換した菌細胞の選択に対するマーカー遺伝子を含む大量のクローニングベクターが自由に使える。そのようなベクターの実施例は、pBR322、pUCシリーズ、M13mpシリーズ、pACYC184等である。所望の配列を適当な制限部位でベクターに組み込んでもよい。得られたプラスミドは、大腸菌細胞の形質転換に用いる。形質転換大腸菌細胞を適当な培地で培養し、その後回収して溶解する。プラスミドは定法によって回収する。得られたプラ

スミドDNAの特徴付けのための分析法として、一般に制限分析および配列分析が用いられる。各操作後、プラスミドDNAを開裂し、得られたDNA断片を他のDNA配列と結合させてもよい。

DNAを植物宿主細胞に導入するためには、幅広い技術が自由に使える。これらの技法は、さらなる可能性もあるが、形質転換媒体としてアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）またはアグロバクテリウム・リゾゲンス（Agrobacterium rhizogenes）を用いたT-DNAによる植物細胞の形質転換、プロトプラストの融合、DNAのインジェクションおよび電気穿孔、バイオリスティック法によるDNAの導入を含む。

DNAの植物細胞へのインジェクションおよび電気穿孔の場合、用いるプラスミドに特殊な要件はない。pUC誘導体のような単純なプラスミドを用いてもよい。しかし、そのように形質転換した細胞から完全な植物体を再生させる場合には、選択的なマーカー遺伝子が存在しなければならない。

所望の遺伝子を植物細胞に導入する方法によっては、さらなるDNA配列が必要となることがある。Ti-またはRi-プラスミドを、例えば植物細胞の形質転換のために用いる場合、Ti-またはRi-プラスミドのT-DNAの少なくとも右境界、しかしよりしばしば左右境界を、隣接領域として導入すべき異物遺伝子に結合しなければならない。

アグロバクテリウムを形質転換に用いる場合、導入すべき遺伝子は特殊なプラスミド、すなわち中間ベクターまたはバイナリベクターのいずれかにクローニングしなければならない。T-DNA内の配列と相同な配列のため、中間ベクターは同種組換えによるアグロバクテリウムのTi-またはRi-プラスミドに組み込んでもよい。これはまた、T-DNAのトランスファーに必要なvir-領域を含む。中間ベクターはアグロバクテリウム中では複製できない。ヘルパープラスミドによって、中間ベクターはアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）にトランスファーしてもよい（接合）。バイナリベクターは、アグロバクテリウムにおけると共に大腸菌において複製してもよい。それらは、左右T-DNA境界領域によって枠組みされるリンカーまたはポリリンカーと共に、選択的マーカー遺伝子を含む。それらは、アグロバクテリウムに直接形質転換してもよい（ホルスターズら（Holsters）、Mol.Gen.Genet.163（1978）、181～187）。アグロバクテリウムの形質転換に用いるプラスミドはさらに、形質転換バクテリアの選択が許されるNPT II遺伝子のような選択的マーカー遺伝子を含む。宿主細胞として作用するアグロバクテリウムは、vir-領域を有するプラスミドを含まなければならない。vir-領域は植物細胞へのT-DNAのトランスファーに必要である。別のT-DNAが存在してもよい。そのような方法で形質転換されたアグロバクテリウムは、植物細胞の形質転換に用いられる。

植物細胞の形質転換にT-DNAを用いることは、十分に研究され、欧州特許第120516号；ホーケマ「バイナリ植物ベクターシステム（Binary Plant Vector System）」Offsetdrukkerij Kanters B.V.,Alblasserdam（1985）、５章；フレイリーら（Fraley）、Crit.Rev.Plant Sci.,4、１～46およびアンら（An）、EMBO J.4（1985）、277～287に十分に記述されている。pBIN19（クロンテック・ラボラトリーズ、インク、USA）のようないくつかのバイナリシステムは、既に市販されているかも知れない。

DNAを植物細胞にトランスファーするためには、植物抽出物をアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）またはアグロバクテリウム・リゾゲンス（Agrobacterium rhizogenes）と共に適切に共培養してもよい。感染した植物材料（例えば、葉片、茎の一部、根、プロトプラスト、または懸濁培養植物細胞）から、形質転換細胞の選択のために抗生物質またはバイオザイドを含んでもよい適当な培地中で完全な植物体を再生させてもよい。そのようにして得られた植物は次に、導入されたDNAが存在するか否かを調べる。

導入DNAが植物細胞のゲノムに組み込まれると、通常それはその場に安定して存在し続け、最初に形質転換された細胞の子孫内にも留まる。通常、これは、バイオザイドまたはカナマイシン、G418、ブレオマイシン、ヒグロマイシン、またはフォスフィノトリシン等のような抗生物質に対する耐性を形質転換された植物細胞に付与する選択的マーカーを含む。したがって、マーカーの個別選択により、導入DNAを欠如する細胞からの形質転換細胞

の選択が可能となるはずである。
形質転換細胞は通常の方法で細胞内で増殖する（マコーミックら（McCormick）、Plant Cell Reports 5（1986）、81～84も参照）。得られた植物は通常の方法で培養し、同じ形質転換された遺伝子の遺伝物または別の遺伝子の遺伝物を有する植物と交配することができる。得られたハイブリッド個体は対応する表現型特性を有する。表現型特徴が安定的に維持されているか否か、およびそれがトランスファーされているか否かを確認するためには、２代以上増殖させなければならない。さらに、対応する表現型またはその他の特性が残っていることを確認するために種子を採取しなければならない。
その特性のため、本発明の植物細胞または植物から得られた澱粉は、本明細書に既に記載の特殊な目的に適しているのみならず、多様な工業的利用にも適している。
基本的に、澱粉は大きく２つの分野に分類できる。一方の分野には、澱粉の加水分解産物およびいわゆる天然の澱粉が含まれる。加水分解産物には本質的に、酵素または化学処理によって得られるグルコースおよびグルカンの成分が含まれる。それらは、発酵および化学修飾などのさらなるプロセスに用いることができる。これに関連して、加水分解プロセスが単純かつ安価に実施できることは重要であるかもしれない。現在、これはアミログルコシダーゼを用いて実質的に酵素的に実施される。用いる酵素のアプローチを制限する澱粉構造の変化、例えば、顆粒表面の増加、より少ない分枝または立体構造による消化性の改善により、加水分解に要する酵素量を減少させることによってコストが軽減されることが考えられる。
そのポリマー構造のために用いられるいわゆる天然澱粉の用途は、さらに２つの領域に分類される：
（a）食品における利用
澱粉は、様々な食品に対する典型的な添加剤であって、本質的に水性添加剤を結合する目的を果たし、および／または粘度の増加もしくはゲル形成の増加を引き起こす。重要な特徴的特性は、流動および収着作用、膨張およびペースト化温度、粘度および濃化作用、澱粉の可溶性、透明性およびペースト構造、熱、離断および酸抵抗性、老化傾向、薄膜形成能力、凍結／融解抵抗性、消化性ならびに例えば無機または有機イオンなどとの複合体形成能である。
（b）食品以外における利用
その他の主な適応分野は、様々な生産プロセスにおける補助剤、または技術的製品の添加剤としての澱粉の利用である。補助剤としての澱粉の利用に関する主な適応分野は、第一に、紙および厚紙産業である。この分野では、澱粉は主に保持力（固体の引き留め）のため、固化物質として整粒充填剤および細粒のため、ならびに脱水のために用いられる。さらに、堅さ、硬度、音、握り、つや、なめらかさ、離断強度ならびに表面に関する澱粉の有利な特性が利用されている。
製紙過程では、４つの適応分野、すなわち表面、コーティング、重量および吹き付けを区別することができる。
表面処理に関する澱粉の必要条件は、本質的に、高度の輝き、相応な粘度、高度の粘度安定性、良好な薄膜形成ならびにほこりの低発生である。固体内容物のコーティングに用いる場合には、相応する粘度、高度の結合能力ならびに高度の色素親和性が重要な役割を果たす。塊体に対する添加剤としては、急速、均一、無駄のない拡散、高い機械的安定性および紙パルプにおける完全な保持性が重要である。澱粉を吹き付けに用いる場合には、相応な固体含量、高い粘度ならびに高い結合能力も重要である。
主な適用分野は例えば、接着産業であり、ここでは適用分野は４つの領域に分割される：純粋な澱粉糊としての利用、特殊化学物質を用いて調製した澱粉糊における利用、合成樹脂およびポリマー分散物に対する添加剤としての澱粉の利用ならびに合成接着剤の拡張剤としての澱粉の利用である。澱粉に基づく接着剤全体の90％が、段ボール紙、紙袋および紙バッグ、紙およびアルミニウムの合成材料、箱、ならびに封筒、切手等の水糊の産生に利用される。
澱粉の補助剤および添加剤として考えられるもう一つの利用可能性は、紡績および紡績ケ

ア製品の産生においてである。紡績産業において、以下の４つの適用分野に分類することができる：整粒剤、すなわち、なめらかにし、織り上げの際の着用抵抗性の増加と共に、織り上げの際に働く張力に対する保護のためのぎざぎざ作用（burring behaviour）を強化するための補助剤として、漂白、染色等の、主として品質を劣化させる前処置後の織物改善剤として、色素拡散防止のための染料ペースト産生における濃縮剤としての、および織り糸の整経剤のための添加剤としてとしての澱粉の利用。

さらに、澱粉は、建築材料における添加剤として利用してもよい。一つの例は、石膏ボードの産生であり、薄い石膏と混合させた澱粉を水と共にペースト状にし、石膏ボードの表面に拡散させ、厚紙をボードに結合させる。もう一つの適用領域は、これを石膏および鉱物繊維と混合することである。予め混合させたコンクリートにおいて、澱粉を整粒プロセスの減速のために用いてもよい。

さらに、澱粉は、人工的な地盤シフトにおいて水に対する地盤粒子の一時的な保護のために用いられる地盤安定化手段の産生に有用である。先端技術の知識に従って、澱粉およびポリマー乳化剤を含む配合製品は、これまで用いられていた製品と同じ腐食減少および表皮形成減少効果を有すると見なすことができる；しかし、それらはかなり安価である。

もう一つの適用分野は、植物保護剤におけるこれらの調製物の特殊な特性の修飾における澱粉の利用である。例えば澱粉は、植物保護剤および肥料の湿化の改善に、活性成分の一定量放出に、液体、揮発性および／または臭いがある活性成分の、微小結晶の安定で変形可能な物質への転化に、相容れない組成の混合に、および分散低下による効果持続の延長に用いられる。

澱粉はまた、薬物、医薬品および化粧品産業の分野で用いてもよい。製薬産業において、澱粉を錠剤の結合剤として、またはカプセル中の結合剤の希釈に用いてもよい。さらに、澱粉は、飲み込む際に水を吸収し、短時間で活性成分を放出するにつれ膨張するため、錠剤の崩壊剤としても適している。品質的理由から、医薬品の流化剤および粉剤がさらに適応分野となる。化粧品分野において、澱粉は例えば、香水およびサリチル酸などの粉末添加剤の担体として用いてもよい。澱粉の比較的広範な適応分野は歯磨きである。

石炭および練炭における添加剤としての澱粉の利用もまた考えられる。澱粉を加えることによって、石炭を定量的に塊にし、および／または高品質の練炭にすることができ、このように練炭の未成熟崩壊を防ぐことができる。バーベキュー用木炭は付加澱粉を４～６％、熱発生石炭を0.1～0.5％含有する。さらに、澱粉は、これを石炭および練炭に加えると、毒性物質の放出をかなり減少させることができるため、結合剤として適している。

さらに、澱粉は鉱石および石炭スラリーの加工において凝集剤として用いてもよい。

もう一つの適用分野は、鋳造において物質を加工するための添加剤としての利用である。様々な鋳造プロセスにおいて、結合剤と混合した砂から産生された中心核が必要とされる。今日では、最も一般的に用いられている結合剤は、たいていの場合、膨張する澱粉である修飾澱粉と混合したベントナイトである。

澱粉を加える目的は、結合力の改善と共に、流体抵抗の増加である。加えて、膨張澱粉は、冷水における分散性、再水和性、砂との良好な混和性、および水の高い結合能力などの、生産プロセスに対して予めさらに必要な条件を満たす可能性がある。

ゴム産業では、澱粉を技術的および視覚的品質の改善のために用いてもよい。この理由は、表面のつや、握り、および外観の改善である。この目的のために、低温加硫前に、ゴム物質の粘着性のゴム引き表面上に澱粉を拡散させる。ゴムの印刷可能性を改善するために用いてもよい。

修飾澱粉のもう一つの適用分野は、皮革代用品の産生である。

プラスチック市場において、以下の適用分野が明らかである：澱粉由来製品の加工プロセスへの組み込み（澱粉は単なる充填剤で、合成ポリマーと澱粉との間の直接結合はない）、または澱粉に由来する製品のポリマー産生への組み込み（澱粉とポリマーは安定な結合を形成する）。

澱粉を純粋な充填剤として用いても、タルカムのような他の物質に匹敵することは不可能である。この状況は、特殊な澱粉特性が有効になる場合、および最終製品の特性プロフィ

ールがこのように明らかに変化する場合には異なる。一つの例は、ポリエチレンなどの熱可塑性材料の加工における澱粉製品の利用である。これによって、澱粉と合成樹脂は、「マスターバッチ」を形成するために、共発現によって１：１の比で配合し、ここから様々な製品が顆粒化ポリエチレンを用いた一般的技法によって産生される。ポリエチレン薄膜への澱粉の組み込みは、水性染料による印刷可能性の改善と共に、中空体における物質透過性の増加、水蒸気透過性の改善、抗静電気防止作用の改善、抗ブロック作用の改善を引き起こす。

もう一つの可能性は、ポリウレタンフォームにおける澱粉の利用である。加工技術の最適化によるばかりでなく澱粉誘導体の適合により、合成ポリマーと澱粉の水酸基との反応を特異的に調節することが可能である。結果は、澱粉の利用によって以下の特性プロフィールを有するポリウレタン薄膜である；熱膨張係数の減少、収縮作用の減少、圧／張力作用の改善、水許容性の変化を伴わない水蒸気透過性の増加、可燃性およびひび割れの減少、可燃性部分の落下なし、ハロゲン化物なし、および加齢の減少。現在なお存在する不利な点は、圧および衝突強度の減少である。

薄膜の製品開発が唯一の選択肢ではない。ポット、プレート、およびボウルなどの固形プラスチック製品は、50％以上の澱粉含量を用いて産生することができる。さらに、澱粉／ポリマー混合物はそれらがはるかに容易に生体崩壊するという長所を付与する。

さらに、それらの水との強い結合能力により、澱粉接合ポリマーは最も重要となった。これらは、澱粉の骨格を有し、ラジカル連鎖メカニズムの原理に従って合成モノマーの側面格子を接合した製品である。今日利用できる澱粉接合ポリマーの特徴は、結合の改善、および高い粘度での澱粉1g当たり1000gまでの水の保持能力である。これらの超吸収剤は、農業分野、例えば種子ペレットと共に、主として衛生分野、例えば、紙おむつやシートなどの製品で用いられている。

組換えDNA技術によって修飾した新しい澱粉の使用に関して決定的なことは、一方では、構造、水分含量、蛋白含量、脂質含量、繊維含量、灰／リン酸含量、アミロース／アミロペクチン比、相対モル重量配分、分枝程度、顆粒径、および結晶と共に形状、ならびに一方では以下の特徴となる特性：流体および吸収作用、ペースト化温度、粘度、濃化能力、可溶性、ペースト構造、透明度、熱、離断および酸抵抗性、老化傾向、ゲル形成能力、凍結／融解抵抗性、複合体形成能力、ヨウ素結合、薄膜形成、接着力、酵素安定性、消化性および反応性である。最も顕著な特徴は粘度である。

その上、本発明の植物細胞から得られた修飾澱粉を、上記の特定の応用分野に対する品質のさらなる改善が成されるよう、さらに化学修飾を施してもよい。これらの化学修飾は主として当業者には既知である。これらは特に以下によって修飾される：

－　酸処理
－　酸化および
－　エステル化（リン酸、硝酸、硫酸、キサントゲン酸、酢酸およびクエン酸澱粉の形成につながる。その他の有機酸をエステル化に用いてもよい）。
－　澱粉エーテルの形成（澱粉アルキルエーテル、O-アリルエーテル、ヒドロキシアルキルエーテル、O-カルボキシメチルエーテル、N-含有澱粉エーテル、S-含有澱粉エーテル）
－　分枝澱粉の形成
－　澱粉接合ポリマーの形成。

本発明はまた、この繁殖材料が本発明の植物細胞を含む、種子、果実、挿し木、塊茎、または根茎のような本発明の植物の繁殖材料にも関する。

寄託物

本発明の枠組みにおいて産生されたおよび／または用いられたプラスミドは、特許手続きの目的のための微生物保管の国際承認に関するブダペスト条約の規定に従って、国際的に認められた保管官庁である、ドイツ連邦共和国のブランズウィックにある「ドイツ微生物収集所（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen）（DSM）」に寄託されている（寄託番号；寄託日）。

プラスミドpBinAR Hyg　（DSM9505）　（10／20／94）

プラスミドp33-anti-BE （DSM6146） （08／20／90）
プラスミドpRL2 （DSM10225） （09／04／95）

使用培地および溶液

溶出緩衝液：25mM トリス pH8.3
250mM グリシン
透析緩衝液：50mM トリス塩酸 pH7.0
50mM NaCl
２mM EDTA
14.7mM β-メルカプトエタノール
0.5mM PMSF
蛋白質緩衝液：50mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.2
10mM EDTA
0.5mM PMSF
14.7mM β-メルカプトエタノール
ルゴール液：12g KI
６g I_2
ddH_2Oを加えて全量を1.8Lとする
20×SSC 175.3g 塩化ナトリウム
88.2g クエン酸ナトリウム
超純水で1000mlとする
10N水酸化ナトリウムでpH7.0に調整
10×MEN 200mM MOPS
50mM 酢酸ナトリウム
10mM EDTA
pH7.0
NSEB緩衝液 0.25M リン酸ナトリウム緩衝液pH7.2
7% SDS
1mM EDTA
1% BSA（重量／体積）

図面の説明

図１はプラスミドp35S-anti-RLを示す。
プラスミドの構造：
A＝断片A：CaMV 35Sプロモーター、ヌクレオチド6909～7437
（フランクら（Franck）、Cell 21（1980）、285～294）
B＝断片B：pRL1からの長さ約1949bpのAsp718断片
プロモーターに対する方向：アンチセンス
矢印はオープンリーディングフレームの方向性を示す。
C＝断片C：Ti-プラスミドpTiACH5 T-DNAのT-DNAのヌクレオチド11748～11939
（ギーレンら（Gielen）、EMBO J.3（1984）、835～846）
図２はプラスミドpB33-anti-RLを示す。
プラスミドの構造：
A＝断片A：ソラナム・ツベロッサム（Solanum tuberosum）由来のパタチン遺伝子B33のB3
3プロモーター（ロチャソサら（Rocha-Sosa）、EMBO J.8（1989）、23～29）
B＝断片B：pRL1からの長さ約1949bpのAsp718断片
プロモーターに対する方向：アンチセンス
矢印はオープンリーディングフレームの方向性を示す。
C＝断片C：Ti-プラスミドpTiACH5 T-DNAのT-DNAのヌクレオチド11748～11939
（ギーレンら（Gielen）、EMBO J.3（1984）、835～846）
図３は、ビスコグラフE型ブラベンダー粘度計で記録した、品種
Désirée

の非形質転換ジャガイモ植物（実施例８も参照）から単離された澱粉水溶液のブラベンダー曲線を示す。
ここで：Drehm. トルク
[BE] ブラベンダー単位
Temp. 温度
A ペースト化開始
B 最大粘度
C 96℃期間の開始
D 冷却期間の開始
E 冷却期間の終了
F 最終50℃期間の終了 を意味する。
青線は粘度を示し、赤線は温度を表す。
図４は、ビスコグラフE型ブラベンダー粘度計で記録した、プラスミドp35S-anti-RLで形質転換されたジャガイモ植物から単離された澱粉水溶液のブラベンダー曲線を示す（実施例８も参照）。略語の意味に関しては図３参照。
図５は、ビスコグラフE型ブラベンダー粘度計で記録した、プラスミドpB33-anti-RLで形質転換されたジャガイモ（実施例８も参照）から単離された澱粉水溶液のブラベンダー曲線を示す。略語の意味に関しては図３参照。
図６は、ラピッドビスコアナライザーで記録された、ジャガイモ植物（実施例12も参照）から単離された澱粉水溶液の曲線を示す。赤線は温度を表し；青線１、２、３および４は以下の澱粉溶液の粘度を示す：
線１：野生型植物から単離された澱粉、
線２：分枝酵素のみが阻害されている植物から単離された澱粉（特許出願国際公開公報第92/14827号の実施例１参照）、
線３：本発明の蛋白質濃度のみが減少している植物から単離された澱粉（実施例６参照）、
線４：p35SH-anti-BEプラスミドと共にプラスミドp35S-anti-RLで形質転換した植物から単離された澱粉（実施例12参照）。
図７は、ラピッドビスコアナライザーで記録された、ジャガイモ植物（実施例13も参照）から単離された澱粉水溶液の曲線を示す。赤線は温度を表し；青線１、２、３および４は以下の澱粉溶液の粘度を示す：
線１：野生型植物から単離された澱粉、
線２：プラスミドpB33-anti-GBSS Iで唯一形質転換された植物から単離された澱粉（いわゆるロウ質ジャガイモ）、
線３：プラスミドp33S-anti-RLで形質転換された植物から単離された澱粉（実施例６参照）、
線４：プラスミドpB33-anti-GBSS Iと共にプラスミドpB33-anti-RLで形質転換した植物から単離された澱粉（実施例13参照）。
図８は、R1酵素をコードするジャガイモ由来の完全長のcDNAを含むpRL2プラスミドを示す。
実施例により本発明を説明する。
１．クローニング
大腸菌におけるクローニングに関しては、ベクターpBluescriptSKを用いた。
植物の形質転換のために、遺伝子構築物をバイナリーベクターpBinAR
(HöfgenおよびWillmitzer, Plamt Sci. 66(1990), 221～230)
およびB33-Hygにクローニングした。
２.細菌の菌株
Bluescriptベクターならびにp BinARおよびB33-Hyg構築物については、大腸菌菌株DH5α（Bethesda Research Laboratories,Gaithersburgh,USA）を使用した。
ジャガイモ植物体の形質転換は、アグロバクテリウム・ツメファシェンス（Agrobacteriu

m tumefaciens）C58C1 pGV2260株（Debleareら、Nucl.Acids Res.13（1985）,4777：4788）を用いて行った。

３.アグロバクテリウム・ツメファシェンス（Agrobacterium tumefaciens）の形質転換

DNAのトランスファーはホフゲン
(Höfgen)
およびウィルミッツァー（Willmitzer）の方法（Nucleic Acids Res.16（1988）,9877）を用いて直接形質転換により行った。形質転換されたアグロバクテリアのプラスミドDNAはバーンボイム（Birnboim）およびドリー（Doly）の方法（Nucleic Acids Res.7（1979）,1513-1523）を用いて単離し、適当な制限酵素消化により切断し、電気泳動により解析した。

４.ジャガイモの形質転換

メスで傷をつけた、無菌培養ジャガイモ培養物（ソラナム・ツベロサム・L（Solanum tuberosum L）品種名Desiree）の小型の葉10枚を、2％ショ糖を含むMS培地（Murashige&Skoog,Physiol.Plant.15（1962）,473～497）10mlで処理した。培地には、選択下で終夜培養したアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）50μlが含まれていた。３～５分緩やかに振とうさせた後、暗所でさらに２日間培養した。その後、葉を1.6％グルコース、5mg/lナフチル酢酸、0.2mg/lベンジルアミノプリン、250mg/lクラフォラン、50mg/lカナマイシンもしくは1mg/lハイグロマイシンBおよび0.80％バクトアガー（Bacto Agar）を含むMS培地に置いてカルスを誘導した。25℃および3000ルクスで１週間培養後、葉を1.6％グルコース、1.4mg/lゼアチンリブロース、20mg/lナフチル酢酸、20mg/lジベレリン酸、250mg/lクラフォラン、50mg/lカナマイシンもしくは3mg/lハイグロマイシンBおよび0.80％バクトアガーを含むMS培地に置き、苗条を誘導した。

５.DNA断片の放射性標識化

DNA断片の放射性標識化は、ベーリンガー社（Boehringer）（ドイツ）のDNAランダムプライマーラベリングキットを用い、製造者による指示に従って行った。

６.ノーザンブロット解析

RNAは標準的なプロトコルに従って葉組織から抽出した。50μgのRNAをアガロースゲル上で分離した（1.5％アガロース、1×MEN緩衝液、16.6％ホルムアルデヒド）。泳動後、ゲルを簡単に水洗した。RNAは、20×SSCを用い、ブロッティング法によりハイボンドNタイプのナイロンメンブレン（アマシャム、英国）に転写した。つぎにメンブレンを減圧下で80℃2時間、乾熱処理した。メンブレンをNSEB緩衝液中で68℃で2時間プレハイブリダイゼーションし、つづいて放射性標識したプローブの存在下、NSEB緩衝液中で68℃で１晩ハイブリダイゼーションした。

７.植物の維持管理

ジャガイモ植物体を温室中、以下の条件で保持した：

明期　22℃、2500ルクスで16時間

暗期　15℃、8時間

空中湿度　60％。

８.ジャガイモ植物から得られた澱粉におけるアミロース／アミロペクチン比の決定。

澱粉は定法に従ってジャガイモ植物体から単離し、アミロース／アミロペクチン比は、ホーベンカンプ-ハーメリンクら（Hovenkamp-Hermelink）（Potato Research 31（1988）241～246）の記載の方法に従って測定した。

９.ブドウ糖、果糖、および蔗糖の定量

ブドウ糖、果糖および／または蔗糖含量を測定するためには、ジャガイモ塊茎の小片（直径約10mm）を液体窒素中で凍結させ、その後10mM HEPES pH7.5；80％（vol./vol.）エタノール0.5mLで80℃で30分抽出する。可溶性成分を含む上清を採取し、容量を求める。上清は可溶性糖の量を決定するために用いる。可溶性ブドウ糖、果糖、および蔗糖の定量は以下の組成物を含む反応混合液中で行う：

100.0mM　イミダゾール／塩酸、pH6.9

1.5mM　$MgCl_2$

0.5mM $NADP^+$
1.3mM ATP
10～50μL 試料
1.0U 酵母由来のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ
反応混合液を室温で５分インキュベートする。次に、糖の定量は、以下のものを連続的に加えた後、標準的な測光法によって340nmでの吸光度を測定することによって、実施する：
酵母由来のヘキソキナーゼ1.0単位（ブドウ糖の定量用）
酵母由来のフォスフォグルコイソメラーゼ1.0単位（果糖の定量用）
酵母由来のインベルターゼ1.0単位（蔗糖の定量用）。

実施例１

ジャガイモ澱粉からの澱粉顆粒結合型蛋白質の単離

ジャガイモ澱粉からの澱粉顆粒結合型蛋白質の単離は、「モデル422電気溶出器」（バイオラッド・ラボラトリーズインク、USA）と類似の構成であるが、容量がかなり大きい（約200ml）溶出器での電気溶出によって実施した。乾燥澱粉25gを溶出緩衝液に溶解した（最終容量80ml）。この澱粉は、ジャガイモ由来の澱粉顆粒結合型澱粉シンターゼI（GBSS I）をコードするDNA配列のアンチセンス発現のため、ほとんどアミロースを含まない澱粉を産生するジャガイモに由来した。懸濁液を水浴中で70～80℃に加熱した。次に、尿素72.07gを加え（最終濃度８M）、溶出緩衝液で全量を180mlとした。絶えず攪拌すると澱粉は溶解し、ペースト状の粘稠度が得られた。溶出器具によって蛋白質を溶液から一晩電気溶出した（100V；50～60mA）。溶出蛋白質は注意深く器具から除去した。懸濁粒子を短時間遠心して除去した。上清を４℃で１時間、透析緩衝液に対して透析し、これを２～３回行った。その後、蛋白質溶液の容量を測定した。硫酸アンモニウム（最終濃度90％）を加えることによって蛋白質を沈殿させ、これは０℃で絶えず攪拌しながら行った。沈殿した蛋白質を遠心によってペレットにし、蛋白質緩衝液に再懸濁した。

実施例２

澱粉顆粒結合型蛋白質をコードするcDNA配列の同定および単離

実施例１によって単離した蛋白質を用いて、澱粉顆粒結合型蛋白質を特異的に認識するウサギ由来のポリクローナル抗体を産生した。
そのような抗体によって、次に定法を用いて、澱粉顆粒結合型蛋白質をコードする配列に関してcDNA発現ライブラリをスクリーニングした。
発現ライブラリは以下のように作製した：
ポリ（A^+）-mRNAを「ペロリナ」品種のジャガイモ塊茎から単離した。ポリ（A^+）-mRNAから開始して、cDNAは、Xho I-オリゴd（t）$_{18}$プライマーを用いて、ガブラー＆ホフマン法（Gubler and Hoffmann）（Gene25（1983）、263～269）に従って産生した。EcoR I-リンカーを加えた後このcDNAをXho Iで切断し、EcoR IおよびXho Iで切断したラムダZAP IIベクター（ストラタジーン）に指向方向にライゲーションした。そのように構築されたcDNAライブラリの約500,000プラークを、澱粉顆粒結合型蛋白質に対するポリクローナル抗体によって認識される配列に関してスクリーニングした。
ファージプラークを分析するため、これらを10mM IPTG溶液で30～60分予めインキュベートして、その後濾紙上で乾燥させたニトロセルロースフィルターにトランスファーした。トランスファーは37℃で３時間行った。次にフィルターをブロック試薬と共に室温で30分インキュベートし、TBST緩衝液中で５～10分洗浄した。フィルターを、澱粉顆粒結合型蛋白質に対するポリクローナル抗体の適当な希釈液と共に室温で１時間、または４℃で16時間振とうした。ポリクローナル抗体によって認識される蛋白質を発現するプラークの同定は、製造元の指示に従って、「ウサギ抗体のブロッティング検出キットRPN23」（アマシャム、UK）によって実施した。
ポリクローナル抗体によって認識される蛋白質を発現しているcDNAライブラリのファージクローンは、定法を用いることによってさらに精製した。
インビトロ切除法によって、対応するcDNAインサートと共に二本鎖pBluescriptプラスミ

ドを含む陽性ファージクローンから大腸菌クローンを得た。インサートのサイズおよび制限パターンをチェックした後、適当なクローン、pRL1をさらに分析した。

実施例３

プラスミドpRL1のcDNAインサートの配列分析

実施例２によって得られた大腸菌クローンからプラスミドpRL1を単離し、そのcDNAインサートの配列の一部を、ジデスオキシヌクレオチド法（サンガーら（Sanger）、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74（1977）、5463～5467）を用いた標準的技法によって決定した。インサートの長さは約2450bpである。それに由来するアミノ酸配列と共にヌクレオチド配列の一部を、配列番号：３および配列番号：４に示す。

配列分析および既知のDNA配列との配列比較により、配列番号：３に示す配列は新規で、これまでに知られているDNA配列との有意な相同性を示さないことが示された。その上、配列分析は、cDNAインサートが、５’-末端でのコード領域の一部が欠失している部分的cDNAに過ぎないことを示した。

実施例４

ソラナム・ツベロッッサム（Solanum tuberosum）由来の澱粉顆粒結合型蛋白質をコードする完全なcDNAの同定および単離

プラスミドpRL1の部分的cDNAインサートに対応する完全なcDNAを単離するために、さらなるcDNAライブラリを作製した。これは、以下のように構築されたジャガイモ由来の保護細胞特異的cDNAライブラリであった。

まず、温室に保たれた６週令のジャガイモ植物の葉約60枚を採取することによって、本質的にヘドリッチら（Hedrich）の方法（Plant Physiol.89（1989）、148）に従って、「Désirée」種のジャガイモ植物の葉から表皮断片を産生した。中心葉脈を葉から除去した。次に葉を大きい「ワーリングブレンダー」（容量１L）を用いて最高レベルで冷蒸留水中で各15秒間４回破砕した。懸濁液をメッシュサイズ220μmのナイロンメッシュ（ナイボルト、チューリッヒ、スイス）に通して、冷蒸留水で数回洗浄した。懸濁液そのものを220μmナイロンメッシュで濾過し、冷蒸留水で十分に洗浄した。残査（表皮断片）は、より小さい「ワーリングブレンダー」（容量250ml）を用いてより低いレベルで蒸留水および氷で４回各15秒間破砕した。懸濁液を220μmナイロンメッシュで濾過し、冷蒸留水で十分に洗浄した。顕微鏡下で表皮断片（残査）の葉肉細胞の混入を調べた。混入が認められれば、小さい「ワーリングブレンダー」で破砕工程を繰り返した。

表皮断片の保護細胞の破壊は、冷却モルタル中の液体窒素中で約２時間微粉にすることによって実施した。保護細胞の破壊を調べるため、定期的に試料を採取して顕微鏡で調べた。２時間後、または十分量の保護細胞が破壊されれば、得られた粉末を反応チューブ（容量50ml）に加え、１容量のGTC緩衝液中に再懸濁した（チャーギンら（Chirgwin）、Biochem.18（1979）、5294～5299）。懸濁液を遠心して上清をミラクロス（カルビオケム、ラホヤ、カリフォルニア）で濾過した。濾液をグリシンら（Glisin）（Biochemistry 13（1974）、2633～2637）およびモルネックスら（Momex）（J.Clin.Inves.77（1986）、1952～1961）において記述のように16時間超遠心した。遠心後、RNA沈殿物をGTC緩衝液250μLに溶解した。RNAは、１M酢酸0.05容量およびエタノール0.7容量を加えて沈殿させた。RNAを遠心によって沈殿させ、沈殿物を３M酢酸ナトリウム（pH4.8）および70％エタノールで洗浄した。RNAを手早く乾燥させ、DEPC処置水に溶解した。

ポリA^+-RNAは、定法に従って単離RNAから単離した。ポリ（A^+）-mRNAから開始して、Xho I-オリゴd（t）$_{18}$プライマーを用いて、cDNAをガブラー＆ホフマン法（Gubler and Hoffmann）（Gene25（1983）、263～269）に従って産生した。EcoR Iリンカーを加えた後このcDNAをXho Iで切断し、EcoR IおよびXho Iで切断したラムダZAP IIベクター（ストラタジーンGmbH、ハイデルベルク、ドイツ）に指向方向にライゲーションした。ファージヘッドでのパッケージングは、製造元の指示に従って、ギガパックIIゴールドキット（ストラタジーンGmbH、ハイデルベルク、ドイツ）を用いて実施した。

そのようなcDNAライブラリから、pRL1プラスミドのcDNAインサートとハイブリダイズする

ファージクローンを定法によって単離精製した。インビボ切除法を用いて、対応するcDNAインサートと共に二本鎖pBuescriptプラスミドを含む陽性ファージクローンから大腸菌クローンを得た。インサートのサイズおよび制限パターンをチェックした後、適当なクローンの制限マッピングおよび配列分析を行った。適当なクローンから、ジャガイモ由来の澱粉顆粒結合型蛋白質をコードする完全なcDNAを含むプラスミドpRL2（DSM10225）を単離した。

実施例５

pRL2プラスミドのcDNAインサートの配列分析

pRL2プラスミドのcDNAインサートのヌクレオチド配列は実施例３に記述のように決定した。インサートの長さは4856bpである。ヌクレオチド配列と共にそれに由来するアミノ酸配列を、配列番号：１および／または配列番号：２に示す。以降、対応する遺伝子をRL-遺伝子と呼ぶ。

実施例６

プラスミドp35S-anti-RLの構築およびジャガイモ植物のゲノムへのプラスミドの導入

制限エンドヌクレアーゼAsp718によって、長さが約1800bpのDNA断片をpRL1から単離した。これは配列番号：３に示すDNA配列に対応し、オープンリーディングフレームの一部を含む。この断片をAsp718で切断したバイナリベクターpBinARにライゲーションした（ホフゲン＆ウィルミッツァー
(Höfgen and Willmitzer)、
Plant Sci.66（1990）、221～230）。これはバイナリベクターpBin19の誘導体である（ビーバン（Bevan）、Nucl.Acids.Res.12（1984）、8711～9821）。pBinARは以下のように構築する：

カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター（フランクら（Franck）、Cell 21（1980）、285～294）のヌクレオチド6909～7437を含む長さ529bpの断片を、EcoR I／Kpn I断片としてプラスミドpDH51（ピエトルザックら（Pietrzak）、Nucl.Acids.Res.14、5857～5868）から単離し、pBin19ポリリンカーのEcoR IとKpn I部位の間にライゲーションした。これにより、プラスミドpBin19-Aが得られた。

制限エンドヌクレアーゼPvu IIおよびHind IIIによって、長さ192bpの断片をTi-プラスミドpTiACH5（ギーレンら（Gielen）、EMBO J.3、835～846）のT-DNAの遺伝子３のポリアデニル化シグナルを含むプラスミドpAGV40（ヘレラ-エストレラら（Herrera-Estrella）、Nature303、209～213）から単離した（ヌクレオチド11749～11939）。Sph Iリンカーを Pvu I部位に加えた後、断片をpBin19-AのSph IとHind III部位の間にライゲーションした。これによりプラスミドpBinARが得られた。

制限および配列分析によって、pRL1からのcDNAインサートのコード領域の一部が35Sプロモーターとアンチセンス方向に結合するようにDNA断片がベクターにインサートされている組み替えベクターを同定した。得られたプラスミドp35S-anti-RLを図１に示す。

cDNA断片をインサートすることによって、断片A、B、およびCを含む発現カセットを産生する：

断片A（529bp）は、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35Sプロモーターを含む。

断片BはCaMVのヌクレオチド6909～7437を含む（フランクら（Franck）、Cell 21（1980）、285～294）。

隣接領域は別として、断片Bはプラスミドp RL1からのcDNAインサートの蛋白質コード領域の一部を含む。これは上記のようにpRL1のAsp718断片として単離され、35Sプロモーターにアンチセンス方向に融合した（ギーレンら（Gielen）、EMBO J.3（1984）、835～846）。

プラスミドp35S-アンチ-RLのサイズは約12.8kbである。プラスミドは、上記のように、アグロバクテリウム媒介形質転換によってジャガイモ植物にトランスファーされた。形質転換細胞から完全な植物体を再生させた。形質転換植物は、温室条件下で栽培した。cDNAに相補的な転写物の消失に関するノザンブロット分析において総RNAの分析によって、植物の遺伝子修飾の成否を評価した。この目的のため、定法に従って総RNAを形質転換植物の

葉から単離し、その後アガロースゲル上で電気泳動的に分離した。次に、これをナイロン膜にトランスファーし、配列番号：１に示す配列またはその一部を有する放射性標識プローブとハイブリダイズさせた。ノザンブロット分析では、形質転換植物の約５～10％において、配列番号：１の特異的転写物を示すバンドが消失していた。植物は澱粉の性質の分析に用いた。

実施例７

プラスミドpB33-anti-RLの構築およびジャガイモ植物のゲノムへのプラスミドの導入

制限エンドヌクレアーゼAsp718によって、cDNAインサートのオープンリーディングフレームの一部を含む長さ約1800bpのDNA断片をプラスミドpRL1から単離し、Asp718で切断したベクターp33-Hygにライゲーションした。このベクターは以下のように構築された：

制限エンドヌクレアーゼEcoR IおよびAsp718によって、35Sプロモーターを pBinAR Hygベクター（DSM9505）から除去した。B33プロモーターを含む約1526bpの長さの断片を、EcoR IおよびAsp718によってプラスミドp33-anti-BE（DSM6146）から単離し、EcoR IおよびAsp718で切断したpBinAR Hygベクター（DSM9505）にインサートした。

cDNA断片をp33-HygプラスミドのAsp718部位にインサートすることによって、以下の断片A、BおよびCを含む発現カセットを産生する（図４）：

断片Aはジャガイモ（Solanum tuberosum）由来のB33プロモーターを含む（欧州特許第377 5 092号；ロチャソサら（Rocha-Sosa）、EMBO J.8（1989）、23～29）。

隣接領域は別として、断片BはpRL1プラスミドのcDNAインサートの蛋白質コード領域の一部を含む。これは、上記のようにpRL1からのAsp718断片として単離され、B33-HygにおいてB33プロモーターにアンチセンス方向に融合した。

断片C（192bp）は、Ti-プラスミドpTiACH5（ギーレンら（Gielen）、EMBO J.3（1984）、835～846）のT-DNAの遺伝子３のポリアデニル化シグナルを含む。

プラスミドp33-anti-RLのサイズは約12.8kbである。上記のように、アグロバクテリウム媒介形質転換によってプラスミドをジャガイモ植物にトランスファーした。形質転換細胞から完全な植物体を再生させた。形質転換細胞は温室条件下で栽培した。cDNAに相補的な転写物の消失に関するノザンブロット分析において総RNAの分析によって、植物の遺伝子修飾の成否を評価した。この目的のため、定法に従って総RNAを形質転換植物の塊茎から単離し、その後アガロースゲル上で電気泳動的に分離した。次に、これをナイロン膜にトランスファーし、配列番号：１に示す配列またはその一部を有する放射性標識プローブとハイブリダイズさせた。ノザンブロット分析では、形質転換植物の約５～10％において、本発明のcDNAとハイブリダイズする転写物を示すバンドが消失していた。これらの植物から、実施例８に記述のように塊茎から澱粉を単離し、分析した。

実施例８

形質転換ジャガイモ植物の分析

実施例６および実施例７によって形質転換したジャガイモ植物は、合成された澱粉の特性に関して調べた。プラスミドp35S-anti-RLまたはプラスミドpB33-anti-RLによって形質転換し、ノザンブロット分析では、本発明のDNA配列とハイブリダイズする転写物を示すバンドを示さなかったジャガイモ植物の様々な株について分析を行った。

a）澱粉水溶液の粘度の決定

形質転換したジャガイモ植物において合成された澱粉水溶液の粘度を測定するため、定法を用いてプラスミドp35S-anti-RLまたはプラスミドpB33-anti-RLによって形質転換した植物の塊茎から澱粉を単離した。澱粉30gをそれぞれ水450mlに溶解し、Eビスコグラフ（ブラベンダーOHGデュースブルグ（ドイツ））での分析に用いた。装置は製造元の指示に従って使用した。澱粉水溶液の粘度を求めるためには、まず澱粉懸濁液を３℃／分の速度で50℃から96℃に加熱した。その後、温度を96℃で30分維持した。次に溶液を96℃から50℃に３℃／分の速度で冷却した。全工程の間、粘度を測定した。そのような測定の代表的な結果を、図３、４および５に時間に対する粘度を示すグラフの形で示す。図３は、ジャガイモ品種デジレ
(Désirée)

の野生型植物から単離された澱粉のブラベンダーグラフを示す。図４および５は、プラスミドp35S-anti-RLまたはプラスミドpB33-anti-RLによって形質転換したジャガイモ植物から単離した澱粉の典型的なブラベンダー曲線を示す。
野生型植物の特徴的な値は以下の通りである：

表１

値	時間 [分：秒]	トルク [BE]	温度 [℃]
A	6 : 30	60.5 ± 17.7	69.9 ± 0.57
B	11 : 30	1838.0 ± 161.2	86.0-± 2.1
C	15 : 15	1412.0 ± 18.4	96.0
D	45 : 15	526.0 ± 17.0	96.0
E	60 : 30	812.0 ± 8.5	50.0
F	70 : 45	853.0 ± 5.7	50.0

値は異なる２回の測定から得られた値の平均値である。

表１および以下の表２および３において、略語は以下を表す：
A：ペースト化開始
B：最大粘度
C：96℃期間の開始
D：冷却期間の開始
E：冷却期間の終了
F：最終50℃期間の終了
プラスミドp35S-anti-RLで形質転換した植物（株P2）に関しては、特徴的な値は以下の通りである：

表２

値	時間 [分：秒]	トルク [BE]	温度 [℃]
A	6 : 00	50.0	69.0
B	14 : 00	820.0	93.0
C	15 : 15	815.0	96.0
D	45 : 15	680.0	96.0
E	60 : 30	1150.0	50.0
F	70 : 45	1200.0	50.0

プラスミドpB33-anti-RLで形質転換した植物（株P3）に関しては、特徴的な値は以下の通りである：

表３

値	時間 [分：秒]	トルク [BE]	温度 [℃]
A	7:0	31.0	71.0
B	12:45	671.0	88.3
C	15:15	662.0	96.0
D	45:15	607.0	96.0
E	60:30	1063.0	50.0
F	70:45	1021.0	50.0

図３、４および５は、形質転換植物から得られた澱粉が、特に加熱時の粘度の増加は非常に僅かに過ぎないという点において野生型植物の澱粉とは異なることを明白に示している。このように、加熱時に形質転換植物由来の修飾澱粉の最大粘度は野生型澱粉の場合の50％以上低い。

一方、冷却時には、形質転換植物から単離した澱粉の粘度は野生型植物の場合より増加する。

b）澱粉のリン酸含量の測定

澱粉のリン酸含量は、グルコース残基のC-6-位に結合したリン酸量を測定することによって決定した。この目的のため、まず、澱粉を酸加水分解によって分解し、次にグルコース-6-リン酸含量を、以下に記述するような酵素試験によって測定した。

澱粉100mgを0.7N HCl500μLと共に100℃で４時間インキュベートした。酸加水分解後、反応液10μLをイミダゾール緩衝液（100mMイミダゾール、５mM $MgCl_2$、pH6.9、0.4mMNAD^+）600μLに加えた。反応混合液中のグルコース-6-リン酸含量は、酵素グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼによる変換によって測定した。この目的のため、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ１U（ロイコノストック・メセンテロイデス由来（ベーリンガー・マンハイム））を反応混合液に加え、産生されたNADHを340nmでの吸収の測定によって求めた。

プラスミドp35S-anti-RLで形質転換したトランスジェニックジャガイモ植物の２つの株（P1（35S-anti-RL）；P2（35S-anti-RL））と共に、品種デジレ
(Désirée)
の非形質転換ジャガイモ植物の澱粉１mg中のグルコース-6-リン酸含量を以下の表に示す。

表４

植物	nmolグルコース-6-リン酸／mg澱粉	%
野生型	12.89 ± 1.34	100
P1 (35S-anti-RL)	2.25 ± 0.41	17.4
P2 (35S-anti-RL)	1.25 ± 0	9.7

以下の表は、非形質転換植物
(ジャガイモ品種デジレ (Désirée))
由来の澱粉と比較して、プラスミドpB33-anti-RLで形質転換したジャガイモ植物における澱粉１mg当たりのグルコース-6-リン酸含量を示す。

表５

植物	nmolグルコース-6-リン酸／mg澱粉	%
野生型	9.80 ± 0.68	100
7	4.50 ± 0.73	45.9
37	2.64 ± 0.99	26.9
45	1.14 ± 0.44	11.6
31	1.25 ± 0.49	12.8

植物７、37、45および31は、プラスミドpB33-anti-RLで形質転換した独立形質転換株を表す。植物37は、ブラベンダーグラフを図５にプロットする株P3を表す。

この値は、トランスジェニックジャガイモ植物由来の修飾澱粉のリン酸含量が、野生型植物の澱粉と比較して少なくとも50％少ないことを示している。

c）４℃で保存後の塊茎のブドウ糖、果糖、および蔗糖含量の測定

野生型植物の塊茎と共に、アンチセンス構築物p35S-anti-RLで形質転換した様々なトランスジェニック株からの植物の塊茎を４℃で保存またはそれぞれ、20℃の暗所で２ヶ月間保存した。その後、ブドウ糖、果糖、および蔗糖量を上記のように測定した。２つのトランスジェニック株に関して、得られた代表的な値は以下の通りであった：

表６

	ブドウ糖		果糖		蔗糖	
	20℃	4℃	20℃	4℃	20℃	4℃
野生型品種Désirée	0.84	55.4	0.62	52.8	8.5	13.1
トランスジェニック株15	1.12	6.7	0.75	7.8	7.5	10.1
トランスジェニック株11	1.00	6.4	0.75	7.5	6.9	6.9

表中の数値はμmolヘキソースまたは蔗糖/g新鮮重量で表す。

表６の値から、塊茎における還完糖の蓄積は、４℃で保存したトランスジェニック植物では、野生型植物よりかなり低い。

概して、トランスジェニックジャガイモ植物から単離した修飾澱粉は、トウモロコシの野生型植物由来の澱粉に類似している。しかし、比較すると、その味は淡く、したがって食品領域での多様な利用により適しているという長所を有する。

実施例９

大腸菌におけるpRL2プラスミドのcDNAインサートの発現

（a）細菌細胞の形質転換

プラスミドpRL2のcDNAインサートを発現させるために、大腸菌株DH5α細胞をまず、pACACプラスミドで形質転換する。このプラスミドは、lac Zプロモーターの調節下で、大腸菌由来のADP-グルコース-ピロフォスフォリラーゼ（AGPアーゼ）をコードするDNA断片を含む。この断片は、サイズ約1.7kbのDraI/HaeII断片としてベクターpEcA-15から単離され（ミューラー-レーバー

(Müler-Röber)

（1992）学位論文、FUベルリン参照）、その粘着末端を塞いだ後これをHindIIIで直線にしたpACAC184ベクターにクローニングした。AGPアーゼの発現は、形質転換した大腸菌細胞においてグリコーゲン合成の増加を引き起こすことである。そのように形質転換した細胞は以降、大腸菌-K1-細胞と呼ぶ。

プラスミドpRL2のcDNAによってコードされる蛋白質の酵素活性を測定するため、大腸菌-K1-細胞をpRL2プラスミドで形質転換した。pRL2プラスミドと共にpACACプラスミドを含む形質転換大腸菌細胞は以降、大腸菌-K2-細胞と呼ぶ。プラスミドDNAの細菌細胞へのトランスファーは、ハナハン法（Hanahan）（J.Mol.Biol.166（1983）、557～580）に従って実施した。形質転換した大腸菌細胞を、以下の組成からなる寒天培養皿上に播種した。

YT培地は以下を含む：

1.5%　バクトアガー

50mM　リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2

１%　ブドウ糖

10μg/ml　クロラムフェニコール（大腸菌K1細胞の場合）

または

10μg/ml　クロラムフェニコール　および

10μg/ml　アンピシリン（大腸菌K2細胞の場合）。

プラスミドpRL2＋pACACで形質転換したDH5α系の大腸菌細胞（大腸菌-K2-細胞）および同様に－対照として－pACACプラスミドのみで形質転換した大腸菌細胞（大腸菌-K1-細胞）を寒天皿上で培養した。以下に記述するように、様々な培養から形成されたグリコーゲンのリン酸化の程度（ブドウ糖分子のC-6位）を調べた。

（b）細菌グリコーゲンの単離

細菌グリコーゲンを単離するため、形質転換後増殖する細菌コロニーを、各皿のYT培地５

mlを含む各６枚の寒天皿（Φ135mm）に浮遊させた。細菌懸濁液を4500×gで５分遠心した。細菌沈殿物をYT培地10mlに再懸濁した。細菌の破壊は、破壊培地（0.2N NaOH；１％SDS）２容量を加え、室温で５分インキュベートすることによって実施した。無水EtOH３容量を加え、４℃で30分インキュベートし、その後8000×gで15分遠心することによって、グリコーゲンを沈殿させた。次に沈殿物を70％EtOH 100mlで洗浄し、再度遠心工程（8000×gで10分）によって沈殿させた。洗浄技法は４回繰り返した。

（c）総グリコーゲン含量の測定

単離および沈殿したグリコーゲンはまず、酸加水分解（沈殿物を0.7N HCl２mLに溶解し；100℃で４時間インキュベートする）によってブドウ糖単分子に分解した。溶液のブドウ糖含量は、製造元（ベーリンガー・マンハイム）の指示に従って、澱粉試験の酵素反応と波長340nmでの測光計（コントロン）の組み合わせによって測定した。

反応緩衝液は以下を含む：

100mM　MOPS、pH7.5
10mM　$MgCl_2$
２mM　EDTA
0.25mM　NADP
１mM　ATP
１U/ml　グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ
２U/ml　ヘキソキナーゼ

測定は、10μLブドウ糖溶液で25℃で実施した。

（d）グルコース-6-リン酸含量の測定

C-6位でリン酸化されたブドウ糖分子の程度を決定するため、様々な細菌培養のブドウ糖の等量を用いた。グリコーゲンに等容量の0.7N KOHを加えて、酸加水分解（上記のように）によってグリコーゲンをそのブドウ糖分子へと分解し、溶液を中和した。

反応緩衝液は以下を含む：

100mM　MOPS、pH7.5
10mM　$MgCl_2$
２　EDTA
0.25mM　NADP
２U／ml　グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ

測定は、ブドウ糖溶液100～150μLで25℃で実施した。

（e）細菌グリコーゲンをリン酸化する酵素活性の同定

細菌細胞において合成されたグリコーゲンのリン酸含量の測定結果は、pACAC＋pRL2プラスミドで形質転換した大腸菌細胞のグリコーゲンは、対照（pACYCプラスミドで形質転換した大腸菌細胞）反応と比較して、ブドウ糖のC-6位でのリン酸化の290±25％増加を示す（以下の表参照）。

大腸菌細胞	グルコース-6-リン酸：グリコーゲン中のブドウ糖
大腸菌-K1	１：（4600±1150）
大腸菌-K2	１：（1570±390）

本明細書に示すリン酸化の程度は、６個の独立した形質転換およびグリコーゲン単離から始めて少なくとも６回測定の平均値である。

実施例10

プラスミドp35S-anti-RLとプラスミドp35SH-anti-BEのジャガイモ植物のゲノムへの同時組み込み

プラスミドp35S-anti-RLは実施例６に記述のように構築した。プラスミドp35SH-anti-BEは、出願国際公開公報第95/07355号、実施例３に記述したように構築した。いずれのプラスミドも、上記のようにアグロバクテリウム媒介形質転換によってジャガイモ植物に連続的にトランスファーした。この目的のため、プラスミドp35SH-anti-BEをまず、ジャガイモ植物に形質転換した。完全な植物体を再生させて、分枝酵素遺伝子発現が減少した植物を選択した。その後、分枝酵素の発現の減少を既に示しているトランスジェニック植物に

、プラスミドp35S-anti-RLを形質転換した。形質転換細胞から、トランスジェニック植物を再度再生し、形質転換植物を温室条件下で栽培した。分枝酵素cDNAまたはRL cDNAに対して相補的な転写物の消失を調べるRNAブロット分析において、総RNAを分析することにより、RL遺伝子の発現の高度減少と共に分枝酵素遺伝子の発現の高度減少に関する植物の遺伝子修飾の成否を評価した。この目的のため、記述の方法に従って総RNAを形質転換植物の葉から単離し、次にゲル電気泳動によって分離して、膜にトランスファーし、配列番号：１に示す配列またはその一部を示す放射性標識プローブとハイブリダイズさせ、次に分枝酵素cDNAの配列（国際公開公報第92/14827号、実施例１）またはその一部を示す放射性標識プローブとハイブリダイズさせた。RNAブロット分析では、形質転換植物の約５～10％において、分枝酵素cDNAの特異的転写物を示すバンド（国際公開公報第92/14827号参照）と共に、配列番号：１に示す配列の特異的転写物を示すバンドが消失していた。R4植物と命名されるこれらの植物を用いて、塊茎に含まれる澱粉の品質を分析した。

実施例11

プラスミドpB33-anti-RLとプラスミドpB33-anti-GBSS Iのジャガイモ植物のゲノムへの同時組み込み

プラスミドpB33-anti-RLは実施例７に記述のように構築した。プラスミドpB33-anti-GBSS Iは以下のように構築した：

ジャガイモ（Solanum tuberosum）のヌクレオチド-1512～+14（ロシャソサら（Rocha-Sosa）、EMBO J.8（1989）、23～29）を含むパラチンクラスI遺伝子B33のプロモーター領域のDraI／DRaI断片を、pUC19プラスミドのSmaI部位にライゲーションした。得られたプラスミドから、プロモーター断片をEcoRI／HindIII断片としてpBin19プラスミド（ビーバン（Bevan）、Nucleic Acids Research 12（1984）、8711～8721）のポリリンカー領域にライゲーションした。続いてジャガイモ（Solanum tuberosum）のGBSS I遺伝子の３’EcoRI断片（ヘルゲルスベルク（Hergersberg）、学位論文（1988）、ケルン大学）を得られたプラスミドのEcoRI部位にライゲーションした。

両プラスミドを、実施例10に記述のように、アグロバクテリウム媒介形質転換によってジャガイモ植物に連続的にトランスファーした。形質転換細胞から、完全な植物体を再生させ、形質転換植物を温室条件下で栽培した。２つのcDNAに相補的な転写物の消失を調べるRNAブロット分析において、完全なRNAの分析によって、植物の遺伝子修飾の成否を評価した。この目的のため、定法によって形質転換植物の塊茎から総RNAを単離し、その後ゲル電気泳動によってアガロースゲル上で分離し、膜にトランスファーして、配列番号：１に示す配列またはその一部を示す放射性標識プローブとハイブリダイズさせた。その後、同じ膜を、GBSS I遺伝子またはこの配列の一部（ヘルゲルスベルク（Hergersberg）、学位論文（1988）、ケルン大学）を有する放射性標識プローブとハイブリダイズさせた。RNAブロット分析では、形質転換植物の約５～10％において、本発明のcDNAまたはGBSS I cDNAとハイブリダイズする転写物を示すバンドが消失していた。R3植物と命名されたこれらの植物の塊茎から、澱粉を単離して分析した。

実施例12

R4植物の澱粉分析

実施例10に従って形質転換したジャガイモ植物の合成澱粉の特性を調べた。プラスミドp35S-anti-RLおよびp35SH-anti-Eで形質転換し、本発明のDNA配列またはRNAブロット分析において分枝cDNAの配列とハイブリダイズする転写物を示すバンドをもはや示さない、または極微量の形で存在するジャガイモ植物の様々な株について、分析を行った。

a）澱粉水溶液の粘度の測定

形質転換ジャガイモ植物において合成された澱粉の水溶液の粘度を測定するために、プラスミドp35S-anti-RLおよびプラスミドp35SH-anti-BEで形質転換した植物の塊茎から定法を用いて単離した。澱粉２gをそれぞれ水25mlに溶解し、これを用いてラピッドビスコアナライザー（ニューポートサイエンティフィックPty Ltd、投資支援グループ、ワリーウッド、NSW2102、オーストラリア）による分析を行った。機器は製造元の指示に従って使用した。澱粉水溶液の粘度を測定するため、澱粉懸濁液をまず、12℃／分の速度で50℃か

ら95℃に加熱した。次に温度を95℃で2.5分維持した。その後溶液を12℃／分の速度で95℃から50℃に冷却した。全ての工程において粘度を測定した。そのような測定の代表的な結果を、粘度を時間に対して示したグラフの形で表す。図６は、品種デジレ
(Désirée)
のジャガイモの野生型植物から単離した澱粉に対する典型的なRVAグラフを示す。線２および３はそれぞれ、プラスミドp35SH-anti-BEおよびプラスミドp35S-anti-RLで形質転換した植物の塊茎から単離した澱粉に関する典型的なRVAグラフを示す。線４は、プラスミドp35SH-anti-BEとプラスミドp35S-anti-RLで同時形質転換した植物の塊茎から単離した澱粉の典型的なRVAグラフを示す。線４は、粘度の温度依存的増加はないという特徴を有する。

b）アミロース／アミロペクチン比の決定

形質転換ジャガイモ植物の塊茎から単離した澱粉のアミロース対アミロペクチンの比を調べた。植物株R4-1（図６の線４に示す）は、70％以上のアミロース含量を示した。植物株R4-3では、アミロース含量の測定値は27％であったが、デジレ
(Désirée)
品種の野生型澱粉におけるアミロース含量は19～22％の範囲であった。

実施例13

R3植物の澱粉分析

実施例11によって形質転換したジャガイモ植物の、合成された澱粉の特性にを調べた。プラスミドpB33-anti-RLおよびpB33-anti-GBSS Iで形質転換し、RNAブロット分析において、本発明のDNA配列またはGBSS I cDNAの配列とハイブリダイズする転写物を示すバンドをもはや示さない、またはごく微量存在するに過ぎないジャガイモ植物の様々な株について分析を行った。

a）澱粉水溶液の粘度の測定。

形質転換ジャガイモ植物において合成された澱粉水溶液の粘度を測定するため、定法を用いてプラスミドpB33-anti-RLとプラスミドpB33-anti-GBSS Iによって、同時形質転換したジャガイモの塊茎から、澱粉を単離した。粘度は、実施例12（a）に記述の方法に従ってラピッドビスコアナライザーによって測定した。結果を図７に示す。線１では、図７は、デジレ
(Désirée)
ジャガイモ品種の野生型植物から単離した澱粉に関する典型的なRVAグラフを示す。線２および３はそれぞれ、pB33-anti-GBSS IおよびプラスミドP35S-anti-RLによって形質転換したジャガイモ植物から単離した澱粉に関する典型的なRVAグラフを示す。線４は、pB33-anti-GBSS IとプラスミドpB33-anti-RLによって同時形質転換したジャガイモ植物から単離した澱粉の典型的なRVAグラフを示す。このグラフの特徴は、RVA処置後に得られる糊が数日間室温でインキュベートしてもほとんど老化現象を示さないという点である。

b）アミロース／アミロペクチン比の測定

形質転換ジャガイモ植物の塊茎から単離された澱粉のアミロース対アミロペクチンの比を調べた。植物株R3-5（図７の線４に示す）は、アミロース含量４％未満を示した。植物株R3-6では、アミロース含量の測定値は３％未満であった。デジレ
(Désirée)
品種の野生型澱粉のアミロース含量は19-22％の範囲であった。

c）澱粉のリン酸含量の測定

澱粉のリン酸含量は、ブドウ糖残基のC-6位に結合したリン酸量の測定によって求めた。この目的のため、まず澱粉を酸加水分解によって分解し、次に、グルコース-6-リン酸含量を以下に記述するように酵素試験によって測定した。

澱粉100mgを0.7N HCl500μLと共に100℃で４時間インキュベートした。酸加水分解後、反応混合液10μLをイミダゾール緩衝液（100mMイミダゾール、５mM $MgCl_2$、pH6.9、0.4mMNAD$^+$）600μLに加えた。調製物中のグルコース-6-リン酸含量は、酵素グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼによる変換によって測定した。この目的のため、グルコース-6-リン酸

デヒドロゲナーゼ１U（ロイコノストック・メセンテロイデス由来（ベーリンガー・マンハイム））を反応混合液に加え、産生されたNADHを340nmでの吸収の測定によって定量した。

プラスミドpB33-anti-RLとプラスミドpB33-anti-GBSS Iで同時形質転換したトランスジェニックジャガイモ植物のR3-5およびR3-6株と共に、品種デジレ

(Désirée)

の非形質転換ジャガイモ植物の澱粉１mg当たりのグルコース-6-リン酸含量を以下の表に示す。比較として、プラスミドpB33-anti-GBSS Iで形質転換したいわゆるロウ質ジャガイモ（US2-10）由来の澱粉の値も同様に示す。

表７

植物	nmolグルコース-6-リン酸／mg澱粉	%
野生型	9.80 ± 0.68	100
R3-5	1.32 ± 0.10	13
R3-6	1.37 ± 0.15	14
US2-10	10.82 ± 0.42	110

配列表

（1）一般情報：
（i）出願人：
（A）氏名：Jens Koβmann
（B）街路名：Golmer Fichten 9
（C）市名：Golm
（E）国名：DE
（F）郵便番号：14476
（ii）発明の名称：修飾澱粉を合成する植物、その産生プロセスおよび修飾澱粉
（iii）配列数：4
（iv）コンピューター読み取りフォーム：
（A）メディア形式：Floppy disk
（B）コンピューター：IBM PC compatible
（C）運転システム：PC-DOS/MS-DOS
（D）ソフトウェア：PatentIn Release #1.0,Version #1.30（EPA）
（2）配列番号：１の情報：
（i）配列の特性：
（A）配列の長さ：4856塩基対
（B）配列の型：ヌクレオチド
（C）鎖の数：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖状：
（ii）配列の種類：cDNA to mRNA
（vi）起源：
（A）生物名：Solanum tuberosum
（B）株名：C.V.Berolina
（ix）配列の特徴：
（A）特徴を表す記号：CDS
（B）存在位置：105..4497
（xi）配列の記載：配列番号：１：

CATCTTCATC GAATTTCTCG AAGCTTCTTC GCTAATTTCC TGGTTTCTTC ACTCAAAATC 60

GACGTTTCTA GCTGAACTTG AGTGAATTAA GCCAGTGGGA GGAT ATG AGT AAT TCC 116
Met Ser Asn Ser
1

TTA GGG AAT AAC TTG CTG TAC CAG GGA TTC CTA ACC TCA ACA GTG TTG 164
Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu
5 10 15 20

GAA CAT AAA AGT AGA ATC AGT CCT CCT TGT GTT GGA GGC AAT TCT TTG 212
Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu
25 30 35

TTT CAA CAA CAA GTG ATC TCG AAA TCA CCT TTA TCA ACT GAG TTT CGA 260
Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg
40 45 50

GGT AAC AGG TTA AAG GTG CAG AAA AAG AAA ATA CCT ATG GAA AAG AAG 308
Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Glu Lys Lys
55 60 65

CGT GCT TTT TCT AGT TCT CCT CAT GCT GTA CTT ACC ACT GAT ACC TCT 356
Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser
70 75 80

TCT GAG CTA GCA GAA AAG TTC AGT CTA GGG GGG AAT ATT GAG CTA CAG 404
Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn Ile Glu Leu Gln
85 90 95 100

GTT GAT GTT AGG CCT CCC ACT TCA GGT GAT GTG TCC TTT GTG GAT TTT 452
Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser Phe Val Asp Phe
105 110 115

CAA GTA ACA AAT GGT AGT GAT AAA CTG TTT TTG CAC TGG GGG GCA GTA 500

```
Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Val
            120                 125                 130
AAA TTC GGG AAA GAA ACA TGG TCT CTT CCG AAT GAT CGT CCA GAT GGG      548
Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp Arg Pro Asp Gly
        135                 140                 145
ACC AAA GTG TAC AAG AAC AAA GCA CTT AGA ACT CCA TTT GTT AAA TCT      596
Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser
    150                 155                 160
GGC TCT AAC TCC ATC CTG AGA CTG GAG ATA CGA GAC ACT GCT ATC GAA      644
Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu
165                 170                 175                 180
GCT ATT GAG TTT CTC ATA TAC GAT GAA GCC CAC GAT AAA TGG ATA AAG      692
Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp Lys Trp Ile Lys
                185                 190                 195
AAT AAT GGT GGT AAT TTT CGT GTC AAA TTG TCA AGA AAA GAG ATA CGA      740
Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg
            200                 205                 210
GGC CCA GAT GTT TCT GTT CCT GAG GAG CTT GTA CAG ATC CAA TCA TAT      788
Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr
        215                 220                 225
TTG AGG TGG GAG AGG AAG GGA AAA CAG AAT TAC CCC CCT GAG AAA GAG      836
Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Glu
    230                 235                 240
AAG GAG GAA TAT GAG GCT GCT CGA ACT GTG CTA CAG GAG GAA ATA GCT      884
Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln Glu Glu Ile Ala
245                 250                 255                 260
CGT GGT GCT TCC ATA CAG GAC ATT CGA GCA AGG CTA ACA AAA ACT AAT      932
Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn
                265                 270                 275
```

GAT AAA AGT CAA AGC AAA GAA GAG CCT CTT CAT GTA ACA AAG AGT GAT 980
Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp
280 285 290

ATA CCT GAT GAC CTT GCC CAA GCA CAA GCT TAC ATT AGG TGG GAG AAA 1028
Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys
295 300 305

GCA GGA AAG CCG AAC TAT CCT CCA GAA AAG CAA ATT GAA GAA CTC GAA 1076
Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu
310 315 320

GAA GCA AGA AGA GAA TTG CAA CTT GAG CTT GAG AAA GGC ATT ACC CTT 1124
Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ile Thr Leu
325 330 335 340

GAT GAG TTG CGG AAA ACG ATT ACA AAA GGG GAG ATA AAA ACT AAG GTG 1172
Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val
345 350 355

GAA AAG CAC CTG AAA AGA AGT TCT TTT GCC GTT GAA AGA ATC CAA AGA 1220
Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg
360 365 370

AAG AAG AGA GAC TTT GGG CAT CTT ATT AAT AAG TAT ACT TCC AGT CCT 1268
Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro
375 380 385

GCA GTA CAA GTA CAA AAG GTC TTG GAA GAA CCA CCA GCC TTA TCT AAA 1316
Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys
390 395 400

ATT AAG CTG TAT GCC AAG GAG AAG GAG GAG CAG ATT GAT GAT CCG ATC 1364
Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile
405 410 415 420

CTA AAT AAA AAG ATC TTT AAG GTC GAT GAT GGG GAG CTA CTG GTA CTG 1412
Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu

425 430 435

GTA GCA AAG TCC TCT GGG AAG ACA AAA GTA CAT CTA GCT ACA GAT CTG 1460
Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu
440 445 450

AAT CAG CCA ATT ACT CTT CAC TGG GCA TTA TCC AAA AGT CCT GGA GAG 1508
Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu
455 460 465

TGG ATG GTA CCA CCT TCA AGC ATA TTG CCT CCT GGG TCA ATT ATT TTA 1556
Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu
470 475 480

GAC AAG GCT GCC GAA ACA CCT TTT TCA GCC AGT TCT TCT GAT GGT CTA 1604
Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu
485 490 495 500

ACT TCT AAG GTA CAA TCT TTG GAT ATA GTA ATT GAA GAT GGC AAT TTT 1652
Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe
505 510 515

GTG GGG ATG CCA TTT GTT CTT TTG TCT GGT GAA AAA TGG ATT AAG AAC 1700
Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn
520 525 530

CAA GGG TCG GAT TTC TAT GTT GGC TTC AGT GCT GCA TCC AAA TTA GCA 1748
Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala
535 540 545

CTC AAG GCT GCT GGG GAT GGC AGT GGA ACT GCA AAG TCT TTA CTG GAT 1796
Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp
550 555 560

AAA ATA GCA GAT ATG GAA AGT GAG GCT CAG AAG TCA TTT ATG CAC CGG 1844
Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg
565 570 575 580

TTT AAT ATT GCA GCT GAC TTG ATA GAA GAT GCC ACT AGT GCT GGT GAA 1892

```
Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu
                585                 590                 595
CTT GGT TTT GCT GGA ATT CTT GTA TGG ATG AGG TTC ATG GCT ACA AGG     1940
Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg
            600                 605                 610
CAA CTG ATA TGG AAC AAA AAC TAT AAC GTA AAA CCA CGT GAA ATA AGC     1988
Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser
        615                 620                 625
AAG GCT CAG GAC AGA CTT ACA GAC TTG TTG CAG AAT GCT TTC ACC AGT     2036
Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser
    630                 635                 640
CAC CCT CAG TAC CGT GAA ATT TTG CGG ATG ATT ATG TCA ACT GTT GGA     2084
His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly
645                 650                 655                 660
CGT GGA GGT GAA GGG GAT GTA GGA CAG CGA ATT AGG GAT GAA ATT TTG     2132
Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu
                665                 670                 675
GTC ATC CAG AGG AAC AAT GAC TGC AAG GGT GGT ATG ATG CAA GAA TGG     2180
Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp
            680                 685                 690
CAT CAG AAA TTG CAT AAT AAT ACT AGT CCT GAT GAT GTT GTG ATC TGT     2228
His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys
        695                 700                 705
CAG GCA TTA ATT GAC TAC ATC AAG AGT GAT TTT GAT CTT GGT GTT TAT     2276
Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr
    710                 715                 720
TGG AAA ACC CTG AAT GAG AAC GGA ATA ACA AAA GAG CGT CTT TTG AGT     2324
Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser
725                 730                 735                 740
```

TAT GAC CGT GCT ATC CAT TCT GAA CCA AAT TTT AGA GGA GAT CAA AAG 2372
Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys
745 750 755

GGT GGT CTT TTG CGT GAT TTA GGT CAC TAT ATG AGA ACA TTG AAG GCA 2420
Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala
760 765 770

GTT CAT TCA GGT GCA GAT CTT GAG TCT GCT ATT GCA AAC TGC ATG GGC 2468
Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly
775 780 785

TAC AAA ACT GAG GGA GAA GGC TTT ATG GTT GGA GTC CAG ATA AAT CCT 2516
Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro
790 795 800

GTA TCA GGC TTG CCA TCT GGC TTT CAG GAC CTC CTC CAT TTT GTC TTA 2564
Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu
805 810 815 820

GAC CAT GTG GAA GAT AAA AAT GTG GAA ACT CTT CTT GAG AGA TTG CTA 2612
Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu
825 830 835

GAG GCT CGT GAG GAG CTT AGG CCC TTG CTT CTC AAA CCA AAC AAC CGT 2660
Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg
840 845 850

CTA AAG GAT CTG CTG TTT TTG GAC ATA GCA CTT GAT TCT ACA GTT AGA 2708
Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg
855 860 865

ACA GCA GTA GAA AGG GGA TAT GAA GAA TTG AAC AAC GCT AAT CCT GAG 2756
Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu
870 875 880

AAA ATC ATG TAC TTC ATC TCC CTC GTT CTT GAA AAT CTC GCA CTC TCT 2804
Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser

885 890 895 900

GTG GAC GAT AAT GAA GAT CTT GTT TAT TGC TTG AAG GGA TGG AAT CAA 2852
Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln
905 910 915

GCT CTT TCA ATG TCC AAT GGT GGG GAC AAC CAT TGG GCT TTA TTT GCA 2900
Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala
920 925 930

AAA GCT GTG CTT GAC AGA ACC CGT CTT GCA CTT GCA AGC AAG GCA GAG 2948
Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu
935 940 945

TGG TAC CAT CAC TTA TTG CAG CCA TCT GCC GAA TAT CTA GGA TCA ATA 2996
Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile
950 955 960

CTT GGG GTG GAC CAA TGG GCT TTG AAC ATA TTT ACT GAA GAA ATT ATA 3044
Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile
965 970 975 980

CGT GCT GGA TCA GCA GCT TCA TTA TCC TCT CTT CTT AAT AGA CTC GAT 3092
Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp
985 990 995

CCC GTG CTT CGG AAA ACT GCA AAT CTA GGA AGT TGG CAG ATT ATC AGT 3140
Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile Ser
1000 1005 1010

CCA GTT GAA GCC GTT GGA TAT GTT GTC GTT GTG GAT GAG TTG CTT TCA 3188
Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ser
1015 1020 1025

GTT CAG AAT GAA ATC TAC GAG AAG CCC ACG ATC TTA GTA GCA AAA TCT 3236
Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser
1030 1035 1040

GTT AAA GGA GAG GAG GAA ATT CCT GAT GGT GCT GTT GCC CTG ATA ACA 3284

Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr
1045 1050 1055 1060

CCA GAC ATG CCA GAT GTT CTT TCA CAT GTT TCT GTT CGA GCT AGA AAT 3332
Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn
1065 1070 1075

GGG AAG GTT TGC TTT GCT ACA TGC TTT GAT CCC AAT ATA TTG GCT GAC 3380
Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp
1080 1085 1090

CTC CAA GCA AAG GAA GGA AGG ATT TTG CTC TTA AAG CCT ACA CCT TCA 3428
Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser
1095 1100 1105

GAC ATA ATC TAT AGT GAG GTG AAT GAG ATT GAG CTC CAA AGT TCA AGT 3476
Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser
1110 1115 1120

AAC TTG GTA GAA GCT GAA ACT TCA GCA ACA CTT AGA TTG GTG AAA AAG 3524
Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys
1125 1130 1135 1140

CAA TTT GGT GGT TGT TAC GCA ATA TCA GCA GAT GAA TTC ACA AGT GAA 3572
Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu
1145 1150 1155

ATG GTT GGA GCT AAA TCA CGT AAT ATT GCA TAT CTG AAA GGA AAA GTG 3620
Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val
1160 1165 1170

CCT TCC TCG GTG GGA ATT CCT ACG TCA GTA GCT CTT CCA TTT GGA GTC 3668
Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val
1175 1180 1185

TTT GAG AAA GTA CTT TCA GAC GAC ATA AAT CAG GGA GTG GCA AAA GAG 3716
Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu
1190 1195 1200

TTG CAA ATT CTG ATG AAA AAA CTA TCT GAA GGA GAC TTC AGC GCT CTT 3764
Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu
1205 1210 1215 1220

GGT GAA ATT CGC ACA ACG GTT TTA GAT CTT TCA GCA CCA GCT CAA TTG 3812
Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu
1225 1230 1235

GTC AAA GAG CTG AAG GAG AAG ATG CAG GGT TCT GGC ATG CCT TGG CCT 3860
Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro
1240 1245 1250

GGT GAT GAA GGT CCA AAG CGG TGG GAA CAA GCA TGG ATG GCC ATA AAA 3908
Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys
1255 1260 1265

AAG GTG TGG GCT TCA AAA TGG AAT GAG AGA GCA TAC TTC AGC ACA AGG 3956
Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg
1270 1275 1280

AAG GTG AAA CTG GAT CAT GAC TAT CTG TGC ATG GCT GTC CTT GTT CAA 4004
Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu Val Gln
1285 1290 1295 1300

GAA ATA ATA AAT GCT GAT TAT GCA TTT GTC ATT CAC ACA ACC AAC CCA 4052
Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro
1305 1310 1315

TCT TCC GGA GAC GAC TCA GAA ATA TAT GCC GAG GTG GTC AGG GGC CTT 4100
Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu
1320 1325 1330

GGG GAA ACA CTT GTT GGA GCT TAT CCA GGA CGT GCT TTG AGT TTT ATC 4148
Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile
1335 1340 1345

TGC AAG AAA AAG GAT CTC AAC TCT CCT CAA GTG TTA GGT TAC CCA AGC 4196
Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser

```
    1350                1355                1360
AAA CCG ATC GGC CTT TTC ATA AAA AGA TCT ATC ATC TTC CGA TCT GAT     4244
Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp
1365                1370                1375                1380
TCC AAT GGG GAA GAT TTG GAA GGT TAT GCC GGT GCT GGC CTC TAC GAC     4292
Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp
                1385                1390                1395
AGT GTA CCA ATG GAT GAG GAG GAA AAA GTT GTA ATT GAT TAC TCT TCC     4340
Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser
            1400                1405                1410
GAC CCA TTG ATA ACT GAT GGT AAC TTC CGC CAG ACA ATC CTG TCC AAC     4388
Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn
        1415                1420                1425
ATT GCT CGT GCT GGA CAT GCT ATC GAG GAG CTA TAT GGC TCT CCT CAA     4436
Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln
    1430                1435                1440
GAC ATT GAG GGT GTA GTG AGG GAT GGA AAG ATT TAT GTC GTT CAG ACA     4484
Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr
1445                1450                1455                1460
AGA CCA CAG ATG T GATTATATTC TCGTTGTATG TTGTTCAGAG AAGACCACAG       4537
Arg Pro Gln Met
ATGTGATCAT ATTCTCATTG TATCAGATCT GTGACCACTT ACCTGATACC TCCCATGAAG   4597
TTACCTGTAT GATTATACGT GATCCAAAGC CATCACATCA TGTTCACCTT CAGCTATTGG   4657
AGGAGAAGTG AGAAGTAGGA ATTGCAATAT GAGGAATAAT AAGAAAAACT TTGTAAAAGC   4717
TAAATTAGCT GGGTATGATA TAGGGAGAAA TGTGTAAACA TTGTACTATA TATAGTATAT   4777
ACACACGCAT TATGTATTGC ATTATGCACT GAATAATATC GCAGCATCAA AGAAGAAATC   4837
CTTTGGGTGG TTTCAAAAA                                               4856
```

(2) 配列番号：２の情報：
(i) 配列の特性：
(A) 配列の長さ：1464アミノ酸
(B) 配列の型：アミノ酸
(D) トポロジー：直鎖状：
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列の記載：配列番号：２：

Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr
1 5 10 15
Ser Thr Val Leu Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly
20 25 30
Gly Asn Ser Leu Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser
35 40 45
Thr Glu Phe Arg Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro
50 55 60
Met Glu Lys Lys Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr
65 70 75 80
Thr Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn
85 90 95
Ile Glu Leu Gln Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser
100 105 110
Phe Val Asp Phe Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His
115 120 125
Trp Gly Ala Val Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp
130 135 140
Arg Pro Asp Gly Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro
145 150 155 160
Phe Val Lys Ser Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp
165 170 175
Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp

180 185 190

Lys Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg

195 200 205

Lys Glu Ile Arg Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln

210 215 220

Ile Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro

225 230 235 240

Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln

245 250 255

Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu

260 265 270

Thr Lys Thr Asn Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val

275 280 285

Thr Lys Ser Asp Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile

290 295 300

Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile

305 310 315 320

Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys

325 330 335

Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile

340 345 350

Lys Thr Lys Val Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu

355 360 365

Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr

370 375 380

Thr Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro

385 390 395 400

Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile

405 410 415

Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu
420 425 430

Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu
435 440 445

Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys
450 455 460

Ser Pro Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly
465 470 475 480

Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser
485 490 495

Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu
500 505 510

Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys
515 520 525

Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala
530 535 540

Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys
545 550 555 560

Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser
565 570 575

Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr
580 585 590

Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe
595 600 605

Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro
610 615 620

Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn
625 630 635 640

Ala Phe Thr Ser His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met

645 650 655

Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg

660 665 670

Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met

675 680 685

Met Gln Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp

690 695 700

Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp

705 710 715 720

Leu Gly Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu

725 730 735

Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg

740 745 750

Gly Asp Gln Lys Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg

755 760 765

Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala

770 775 780

Asn Cys Met Gly Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val

785 790 795 800

Gln Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu

805 810 815

His Phe Val Leu Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu

820 825 830

Glu Arg Leu Leu Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys

835 840 845

Pro Asn Asn Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp

850 855 860

Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn

865 870 875 880

Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn
885 890 895

Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys
900 905 910

Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp
915 920 925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala
930 935 940

Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr
945 950 955 960

Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr
965 970 975

Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu
980 985 990

Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp
995 1000 1005

Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp
1010 1015 1020

Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu
1025 1030 1035 1040

Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val
1045 1050 1055

Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val
1060 1065 1070

Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn
1075 1080 1085

Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys
1090 1095 1100

Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu

1105 1110 1115 1120

Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg

1125 1130 1135

Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu

1140 1145 1150

Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu

1155 1160 1165

Lys Gly Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu

1170 1175 1180

Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly

1185 1190 1195 1200

Val Ala Lys Glu Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp

1205 1210 1215

Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala

1220 1225 1230

Pro Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly

1235 1240 1245

Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp

1250 1255 1260

Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr

1265 1270 1275 1280

Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala

1285 1290 1295

Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His

1300 1305 1310

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val

1315 1320 1325

Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala

1330 1335 1340

Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu
1345 1350 1355 1360
Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile
1365 1370 1375
Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala
1380 1385 1390
Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile
1395 1400 1405
Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr
1410 1415 1420
Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr
1425 1430 1435 1440
Gly Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr
1445 1450 1455
Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
1460

(2) 配列番号：３の情報：
(i) 配列の特性：
(A) 配列の長さ：1918塩基対
(B) 配列の型：ヌクレオチド
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状：
(ii) 配列の種類：cDNA to mRNA
(vi) 起源：
(A) 生物名：Solanum tuberosum
(B) 株名：C.V.Desiree
(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表す記号：CDS
(B) 存在位置：1..1555
(xi) 配列の記載：配列番号：３：

GCA GAG TGG TAC CAT CAC TTA TTG CAG CCA TCT GCC GAA TAT CTA GGA 48
Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly
1 5 10 15

TCA ATA CTT GGG GTG GAC CAA TGG GCT TTG AAC ATA TTT ACT GAA GAA 96
Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu
20 25 30

ATT ATA CGT GCT GGA TCA GCA GCT TCA TTA TCC TCT CTT CTT AAT AGA 144
Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg
35 40 45

CTC GAT CCC GTG CTT CGG AAA ACT GCA AAT CTA GGA AGT TGG CAG ATT 192
Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile
50 55 60

ATC AGT CCA GTT GAA GCC GTT GGA TAT GTT GTC GTT GTG GAT GAG TTG 240
Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu
65 70 75 80

CTT TCA GTT CAG AAT GAA ATC TAC GAG AAG CCC ACG ATC TTA GTA GCA 288
Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala
85 90 95

AAA TCT GTT AAA GGA GAG GAG GAA ATT CCT GAT GGT GCT GTT GCC CTG 336
Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu
100 105 110

ATA ACA CCA GAC ATG CCA GAT GTT CTT TCA CAT GTT TCT GTT CGA GCT 384
Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala
115 120 125

AGA AAT GGG AAG GTT TGC TTT GCT ACA TGC TTT GAT CCC AAT ATA TTG 432
Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu
130 135 140

GCT GAC CTC CAA GCA AAG GAA GGA AGG ATT TTG CTC TTA AAG CCT ACA 480
Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr
145 150 155 160
CCT TCA GAC ATA ATC TAT AGT GAG GTG AAT GAG ATT GAG CTC CAA AGT 528
Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser
165 170 175
TCA AGT AAC TTG GTA GAA GCT GAA ACT TCA GCA ACA CTT AGA TTG GTG 576
Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val
180 185 190
AAA AAG CAA TTT GGT GGT TGT TAC GCA ATA TCA GCA GAT GAA TTC ACA 624
Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr
195 200 205
AGT GAA ATG GTT GGA GCT AAA TCA CGT AAT ATT GCA TAT CTG AAA GGA 672
Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly
210 215 220
AAA GTG CCT TCC TCG GTG GGA ATT CCT ACG TCA GTA GCT CTT CCA TTT 720
Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe
225 230 235 240
GGA GTC TTT GAG AAA GTA CTT TCA GAC GAC ATA AAT CAG GGA GTG GCA 768
Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala
245 250 255
AAA GAG TTG CAA ATT CTG ACA AAA AAA CTA TCT GAA GGA GAC TTT AGC 816
Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser
260 265 270
GCT CTT GGT GAA ATT CGC ACA ACG GTT TTA GAT CTT TCG ACA CCA GCT 864
Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Thr Pro Ala
275 280 285
CAA TTG GTC AAA GAG CTG AAG GAG AAG ATG CAG GGT TCT GGC ATG CCT 912
Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro

```
    290                 295                 300
TGG CCT GGT GAT GAA GGT CCA AAG CGG TGG GAA CAA GCA TGG ATG GCC      960
Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala
305                 310                 315                 320
ATA AAA AAG GTG TGG GCT TCA AAA TGG AAT GAG AGA GCA TAC TTC AGC     1008
Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser
                325                 330                 335
ACA AGG AAG GTG AAA CTG GAT CAT GAC TAT CTG TGC ATG GCT GTC CTT     1056
Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu
            340                 345                 350
GTT CAA GAA ATA ATA AAT GCT GAT TAT GCA TTT GTC ATT CAC ACA ACC     1104
Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr
        355                 360                 365
AAC CCA TCT TCC GGA GAC GAC TCA GAA ATA TAT GCC GAG GTG GTC AGG     1152
Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg
    370                 375                 380
GGC CTT GGG GAA ACA CTT GTT GGA GCT TAT CCA GGA CGT GCT TTG AGT     1200
Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser
385                 390                 395                 400
TTT ATC TGC AAG AAA AAG GAT CTC AAC TCT CCT CAA GTG TTA GGT TAC     1248
Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr
                405                 410                 415
CCA AGC AAA CCG ATC GGC CTT TTC ATA AAA AGA TCT ATC ATC TTC CGA     1296
Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg
            420                 425                 430
TCT GAT TCC AAT GGG GAA GAT TTG GAA GGT TAT GCC GGT GCT GGC CTC     1344
Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu
        435                 440                 445
TAC GAC AGT GTA CCA ATG GAT GAG GAG GAA AAA GTT GTA ATT GAT TAC     1392
```

```
Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr
    450                 455                 460

TCT TCC GAC CCA TTG ATA ACT GAT GGT AAC TTC CGC CAG ACA ATC CTG    1440
Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu
465                 470                 475                 480

TCC AAC ATT GCT CGT GCT GGA CAT GCT ATC GAG GAG CTA TAT GGC TCT    1488
Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser
                485                 490                 495

CCT CAA GAC ATT GAG GGT GTA GTG AGG GAT GGA AAG ATT TAT GTC GTT    1536
Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
            500                 505                 510

CAG ACA AGA CCA CAG ATG T GATTATATTC TCGTTGTATG TTGTTCAGAG         1585
Gln Thr Arg Pro Gln Met
        515

AAGACCACAG ATGTGATCAT ATTCTCATTG TATCAGATCT GTGACCACTT ACCTGATACC  1645

TCCCATGAAG TTACCTGTAT GATTATACGT GATCCAAAGC CATCACATCA TGTTCACCTT  1705

CAGCTATTGG AGGAGAAGTG AGAAGTAGGA ATTGCAATAT GAGGAATAAT AAGAAAAACT  1765

TTGTAAAAGC TAAATTAGCT GGGTATGATA TAGGGAGAAA TGTGTAAACA TTGTACTATA  1825

TATAGTATAT ACACACGCAT TATGTATTGC ATTATGCACT GAATAATATC GCAGCATCAA  1885

AGAAGAAATC CTTTGGGTGG TTTCAAAAAA AAA                               1918
```

(2) 配列番号：４の情報：
(i) 配列の特性：
(A) 配列の長さ：518アミノ酸
(B) 配列の型：アミノ酸
(D) トポロジー：直鎖状：
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列の記載：配列番号：４：

Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly
1 5 10 15
Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu
20 25 30
Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg
35 40 45
Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile
50 55 60
Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu
65 70 75 80
Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala
85 90 95
Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu
100 105 110
Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala
115 120 125
Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu
130 135 140
Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr
145 150 155 160
Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val
180 185 190
Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr
195 200 205
Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly
210 215 220
Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe
225 230 235 240

Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala
245 250 255
Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser
260 265 270
Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Thr Pro Ala
275 280 285
Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro
290 295 300
Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala
305 310 315 320
Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser
325 330 335
Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu
340 345 350
Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr
355 360 365
Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg
370 375 380
Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser
385 390 395 400
Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr
405 410 415
Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg
420 425 430
Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu
435 440 445
Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr
450 455 460
Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu

465 470 475 480

Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser

485 490 495

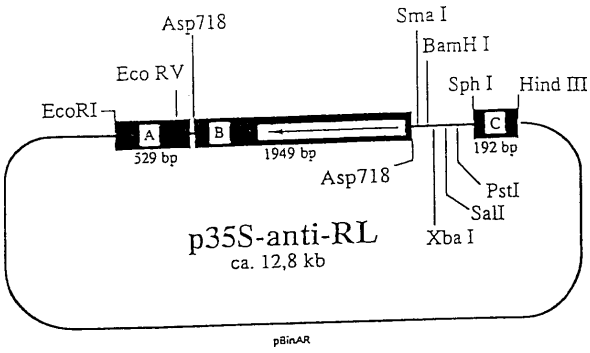
Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val

500 505 510

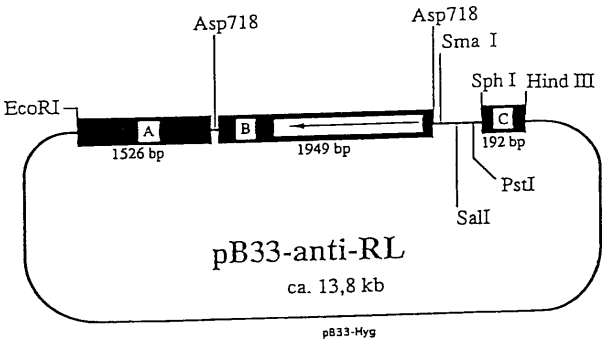
Gln Thr Arg Pro Gln Met

515

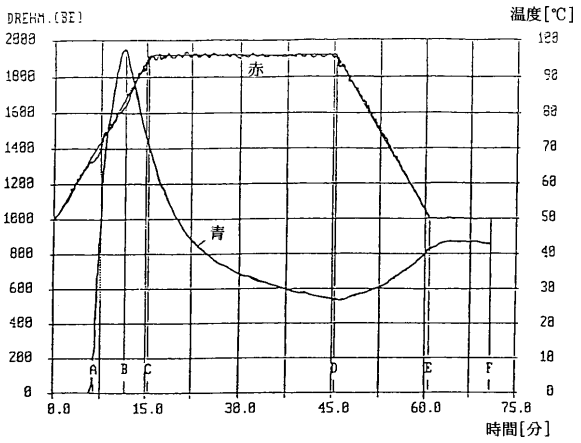
【図１】



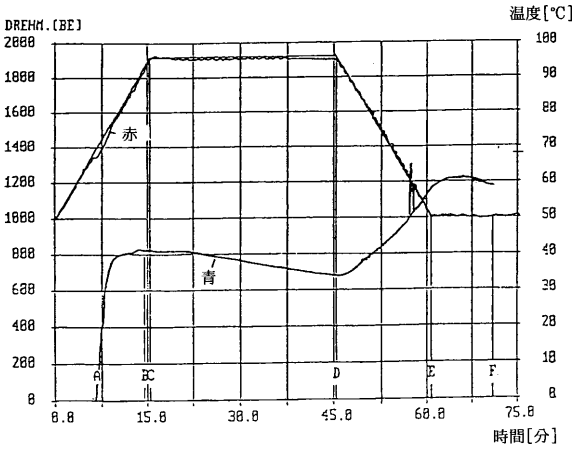
【図２】



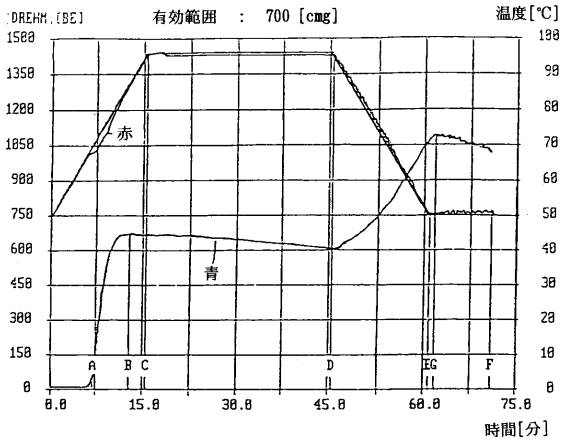
【図３】



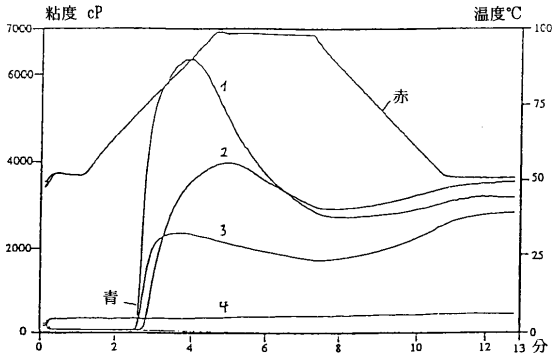
【図４】


DREHM.[BE]
温度[℃]
赤
青
A
BC
D
E
F
時間[分]

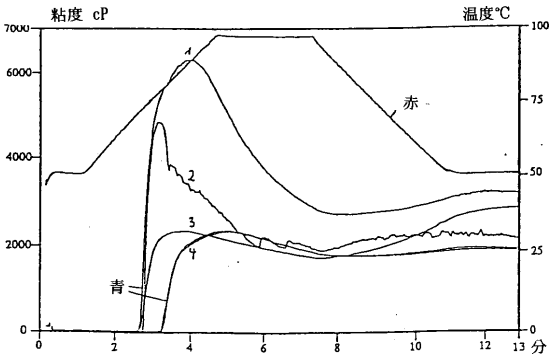
【図５】


DREHM.[BE]
有効範囲 : 700 [cmg]
温度[℃]
赤
青
A
B
C
D
EG
F
時間[分]

【図６】


粘度 cP
温度℃
赤
青
1
2
3
4
分

【図７】


粘度 cP
温度℃
赤
青
1
2
3
4
分

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	C
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A

微生物の受託番号 DSM 6146
微生物の受託番号 DSM 9505

(56)参考文献 特表平09－502098（JP，A）
国際公開第92／011375（WO，A1）

(58)調査した分野(Int.Cl.，DB名)
C12N 15/00 - 90
C12N 1/00 - 7/08
C07K 14/00 - 16/46
A01H 1/00 - 5/12
C12Q 1/68 - 70
C12P 21/00 - 08
C08B 30/00
G01N 33/50 - 98
PubMed,MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq