

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5284261号
(P5284261)

(45) 発行日 平成25年9月11日(2013.9.11)

(24) 登録日 平成25年6月7日(2013.6.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/10 (2006.01)
A 01 H 1/00 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)
C 08 B 30/00 (2006.01)

C 12 N 5/00 103
A 01 H 1/00 A
C 12 N 15/00 Z NAA
C 08 B 30/00

請求項の数 20 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2009-523210 (P2009-523210)
(86) (22) 出願日 平成19年8月9日 (2007.8.9)
(65) 公表番号 特表2010-500012 (P2010-500012A)
(43) 公表日 平成22年1月7日 (2010.1.7)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2007/007282
(87) 國際公開番号 WO2008/017518
(87) 國際公開日 平成20年2月14日 (2008.2.14)
審査請求日 平成22年6月25日 (2010.6.25)
(31) 優先権主張番号 06090134.5
(32) 優先日 平成18年8月9日 (2006.8.9)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 60/836,817
(32) 優先日 平成18年8月10日 (2006.8.10)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507203353
バイエル・クロップサイエンス・アーゲー
BAYER CROPSCIENCE AG
ドイツ国、40789・モンハイム、アル
フレートーノベルーシュトラーセ・50
(74) 代理人 100078662
弁理士 津国 肇
(74) 代理人 100113653
弁理士 東田 幸四郎
(74) 代理人 100116919
弁理士 斎藤 房幸
(72) 発明者 フローベルク, クラウス
ドイツ国、14532 クラインマッハナ
ウ、ビルツヴァルト 17

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】増大した膨潤力を有するデンプンを合成する遺伝的に改変された植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝的に改変されていない野生型の植物細胞と比較して、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性と、グルカン-水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性とを有する、遺伝的に改変された植物細胞であって、

ここで、前記デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号6で示されるアミノ酸配列のアミノ酸322～351(ドメイン1)と少なくとも95%の同一性を有し、配列番号6で示されるアミノ酸配列のアミノ酸423～462(ドメイン2)と少なくとも95%の同一性を有し、配列番号6で示されるアミノ酸配列のアミノ酸641～705(ドメイン3)と少なくとも98%の同一性を有し、

ここで、前記デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質は、コムギ(*Triticum*)、オオムギ(*Hordeum Vulgare*)、タルホコムギ(*Aegilops Tauschii*)、イネ(*Oryza Sativa*)、トウモロコシ(*Zea mays*)、キヤッサバ(*Manihot esculenta*)、インゲンマメ(*Phaseolus vulgaris*)、ジャガイモ(*Solanum tuberosum*)、エンドウマメ(*Pisum sativum*)、サツマイモ(*Ipomoea batatas*)、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、サトイモ(*Colocasia esculenta*)、オストレオコッカス・タウリ(*Ostreaeococcus tauri*)、コナミドリムシ(*Chlamydomonas reinhardtii*)由来であり、

10

20

ここで、前記グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質がジャガイモ由来であり、

ここで、前記増大した活性を導く遺伝的改变が、前記デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をおよび / または前記グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする少なくとも 1 つの外来核酸分子の導入であり、

ここで、1 つの外来核酸分子の場合、前記外来核酸分子は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含み、複数の外来核酸分子の場合、前記外来核酸分子は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする第一の外来核酸分子およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする第二の外来核酸分子である、

遺伝的に改变された植物細胞。

【請求項 2】

遺伝的改变が、植物のゲノム中への少なくとも 1 つの外来核酸分子の導入からなる、請求項 1 に記載の遺伝的に改变された植物細胞。

【請求項 3】

遺伝的に改变されていない対応する野生型の植物細胞から単離されたデンプンと比較して、改变されたデンプンを合成する、請求項 1 及び 2 のいずれか一項に記載の遺伝的に改变された植物細胞。

【請求項 4】

増大した熱湯膨潤力を有するデンプンを合成する、請求項 1、2 及び 3 のいずれか一項に記載の遺伝的に改变された植物細胞。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の遺伝的に改变された植物細胞を含む植物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の遺伝的に改变された植物細胞を含む、請求項 5 に記載の植物の繁殖材料。

【請求項 7】

a) 植物細胞が、遺伝的に改变され、遺伝的改变が、以下の工程 i および ii :

i) 遺伝的に改变されていない対応する野生型の植物細胞と比較して、デンプン合成酵素IIの酵素活性を有するタンパク質の活性の増大に至る遺伝的改变の植物細胞中への導入、

ii) 遺伝的に改变されていない対応する野生型の植物細胞と比較して、グルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質の活性の増大に至る遺伝的改变の植物細胞中への導入、

を任意の順番で個々にまたは同時に含み、

b) 植物が、工程 a) の植物細胞から再生される、遺伝的に改变された植物の作出のための方法であって、

ここで、前記活性の増大に至る遺伝的改变の植物細胞中への導入が、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をおよび / またはグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする少なくとも 1 つの外来核酸分子の導入であり、

ここで、前記デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸 322 ~ 351 (ドメイン 1) と少なくとも 95 % の同一性を有し、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸 423 ~ 462 (ドメイン 2) と少なくとも 95 % の同一性を有し、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸 641 ~ 705 (ドメイン 3) と少なくとも 98 % の同一性を有し、

ここで、前記デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質は、コムギ (*Triticum*) 、オオムギ (*Hordeum vulgare*) 、タルホコムギ (*Aegilops tauschii*) 、イネ (*Oryza sativa*) 、トウモロコシ (*Zea mays*) 、キャッサバ (*Manihot esculenta*) 、インゲンマメ (*Phaseolus*)

10

20

40

50

s e o l u s v u l g a r i s)、ジャガイモ (S o l a n u m t u b e r o s u m)、エンドウマメ (P i s u m s a t i v u m)、サツマイモ (I p o m e a b a t a t a s)、シロイヌナズナ (A r a b i d o p s i s t h a l i a n a)、サトイモ (C o l o c a s i a e s c u l e n t a)、オストレオコッカス・タウリ (O s t r a e o c o c c u s t a u r i)、コナミドリムシ (C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d i i)由来であり、

ここで、前記グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質がジャガイモ由来であり、

ここで、1つの外来核酸分子の場合、前記外来核酸分子は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含み、複数の外来核酸分子の場合、前記外来核酸分子は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする第一の外来核酸分子およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする第二の外来核酸分子である、

方法。

【請求項 8】

更に以下の工程：

c) 工程 b) に従った植物を用いてさらなる植物が作出される、
を含む、請求項 7 に記載の遺伝的に改変された植物の作出のための方法。

【請求項 9】

植物細胞が、工程 b) に従った植物から単離され、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性とグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性とを有する植物が作出されるまで、方法の工程 a) ~ b) が、反復される、請求項 7 に記載の遺伝的に改変された植物の作出のための方法。

【請求項 10】

植物細胞が、工程 c) に従った植物から単離され、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性とグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性とを有する植物が作出されるまで、方法の工程 a) ~ c) が、反復される、請求項 8 に記載の遺伝的に改変された植物の作出のための方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の遺伝的に改変された植物細胞、請求項 5 に記載の植物、請求項 6 に記載の繁殖材料または請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法によつて得られることのできる植物からのデンプンの抽出の工程を含む、改変されたデンプンの製造のための方法。

【請求項 12】

請求項 5 に記載の植物の、請求項 6 に記載の繁殖材料の、または請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法によって得られることのできる植物の、デンプンの製造のための使用。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の方法によって得られることのできる改変されたデンプン。

【請求項 14】

少なくとも 110 g/g の熱湯膨潤力を有する、請求項 13 に記載の改変されたデンプン。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 のいずれか一項に記載の改変されたデンプンがその後、誘導体化される、誘導体化されたデンプンの製造のための方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法によって得られることのできる誘導体化されたデンプン。

【請求項 17】

誘導体化されたデンプンの製造のための、請求項 13 または 14 のいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

の改変されたデンプンの使用。

【請求項 18】

請求項 11 に記載の方法によって得られることのできる改変されたデンプンを含む、または請求項 13 または 14 のいずれか一項に記載の改変されたデンプンを含む、粉末。

【請求項 19】

請求項 5 に記載の植物の、請求項 6 に記載の繁殖材料の、または請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法によって得られることのできる植物のすりつぶしの工程を含む、粉末の製造のための方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の遺伝的に改変された植物細胞、請求項 5 に記載の植物、請求項 6 に記載の繁殖材料または請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法によって得られることのできる植物の、粉末の製造のための使用。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性とグルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性とを有する遺伝的に改変された植物細胞および植物、ならびに前記遺伝的に改変された植物細胞および植物の作出のための方法に関するものである。この種類の植物は、増大した熱湯膨潤力を有するデンプンを合成する。本発明は同様に、増大した熱湯膨潤力を有するデンプン、および前記デンプンの調製のための方法にも関するものである。 20

【0002】

油、脂肪およびタンパク質のほかに、多糖は、植物の主要な再生可能な原材料である。セルロースのほかに、より高次の植物における最も重要な貯蔵物質の 1 つであるデンプンは、多糖において中心的な役割を担う。

【0003】

さらに、デンプンは、栄養生理学的観点において、ヒトおよび動物の栄養の必須構成体である。食物中に含有されるデンプンの構造的特徴は、食物の全種類の機能生理学特性（例えば、水結合力、膨潤力）、栄養生理学特性（例えば、消化性、血糖上昇率に及ぼす食物の影響）または構造に付与する（例えば、切断抵抗性、質感、粘着性、加工しやすさ）特性に影響することが可能である。食物組成はしたがって、問題の食物の所望の特性を決定する特定の構造的特徴を有するデンプンをしばしば含有する。デンプン貯蔵植物組織を含有する食物（例えば、子実、果実、粉末）の特性は、植物組織中に含有されるデンプンによっても影響され得る。 30

【0004】

多糖デンプンは、化学的に均質な基本構造単位であるグルコース分子のポリマーである。しかしながら、本明細書に関与するものは、重合の程度、グルコース鎖の分枝の発生およびその鎖長に関して異なっており、およびさらには改変され、例えばリン酸化されることが可能である異なる分子形態の非常に複雑な混合物である。したがって、デンプンは、均質な原材料ではない。特に、 α -1, 4 - グリコシド結合したグルコース分子の本質的に未分枝のポリマーであるアミロースは、異なって分枝したグルコース鎖の複雑な混合物であるアミロペクチンとは区別される。分枝は、本明細書において、さらなる α -1, 6 - グリコシド結合の発生の結果として生じる。産業的デンプン製造のために、または例えば、トウモロコシ、コメ、コムギまたはジャガイモ等の食物として使用される典型的な植物において、合成されたデンプンは、アミロース約 20 ~ 25 % およびアミロペクチン約 70 ~ 75 % からなる。 40

【0005】

デンプンの機能的特性、栄養生理学特性または構造に付与する特性、例えば、デンプンの溶解度、老化挙動、水結合能、フィルム形成特性、粘性、ゼラチン化特性、凍結融解安定性、酸安定性、ゲル強度、膨潤力、消化性およびデンプン顆粒サイズなどはとりわけ、 50

アミロース / アミロペクチン比、グルコースポリマーの分子量、側鎖の分布パターン、イオウの含有量、脂質およびタンパク質の含有量および / またはデンプン顆粒の形態など、デンプンの構造的特徴によって影響される。

【 0 0 0 6 】

育種に基づく方法によって、デンプンの選択された構造的特徴およびしたがって、植物細胞中のデンプンの機能的特性、栄養生理学特性または構造に付与する特性は、変化することが可能である。しかしながら、このことは、デンプンの選択された構造的特徴に関して今日唯一起り得る（例えば、アミロペクチン / アミロース含有量、米国特許第 5,300,145 号）。現時点で、例えば、育種方法単独によって植物デンプン中のリン酸の含有量に影響することは起り得ない。 10

【 0 0 0 7 】

育種方法に対する代替例は、遺伝子工学方法によるデンプン産生植物の選択された改变からなる。しかしながら、このための必要条件は、トランスジェニック植物におけるデンプン合成および / またはデンプン改变ならびにそれらのその後の機能的分析に関する酵素の同定および特徴付けである。

【 0 0 0 8 】

異なる反応を触媒する多様な酵素は、植物細胞におけるデンプン合成に関与する。デンプン合成酵素 (EC.2.4.1.21、ADP-グルコース、1,4---D-グルカン 4---D-グルコシルトランスフェラーゼ) は、ADP-グルコースのグリコシルラジカルを - 1,4-グルカンへ転移することによって重合反応を触媒し、転移されたグルコシルラジカルは、- 1,4-結合の生成によって - 1,4-グルカンへ連結される。これまで研究されたほぼすべての植物において、各場合においてデンプン合成酵素の多くのアイソフォームを示すことが可能であった。デンプン合成酵素は、2つの異なる群へと分割されることが可能であり、すなわち顆粒結合デンプン合成酵素 (GSSS) および可溶性デンプン合成酵素 (本発明との関係において「SS」とも略記) である。顆粒結合デンプン合成酵素は、アミロースの合成を触媒するのに対し、可溶性デンプン合成酵素は、アミロペクチンの合成に関与する (Ball and Morell, 2003, Annu. Rev. Plant Biol. 54, 207-233; Teltow et al., 2004, J. Expt. Bot. 55(406), 2131-2145)。可溶性デンプン合成酵素の群は、SSI、SSII、SSIII、SSIVとして技術文献中に指定される多くのアイソフォームを有する。個々の群 (SSI、SSII、SSIII、SSIV) へのデンプン合成酵素の割り当ては、問題の個々の酵素のタンパク質配列の配列相同性によって実施される (Ball and Morell, 2003, Annu. Rev. Plant Biol. 54, 207-233)。可溶性デンプン合成酵素の各個々のアイソフォームは、最新の学説に従ったデンプン合成における特異的な機能を割り当てられる。双子葉植物においては、これまで、SSIIタンパク質の1つのアイソフォームを示すことが可能であったのに対し、多くの单子葉植物（例えば、トウモロコシ）においては、SSIIタンパク質の2つの異なるクラスが示されており、SSIIaまたはSSIIbによって指定される。单子葉植物において、SSIIaは、胚乳中で優先的に発現し、SSIIbは好ましくは、葉の組織中で発現する (Teltow et al., 2004, J. Expt. Bot. 55(406), 2131-2145)。特に、デンプン合成における個々の可溶性デンプン合成酵素の特異的機能は、現時点ではなお、最終的に明確されていない (Ball and Morell, 2003, Annu. Rev. Plant Biol. 54, 207-233)。 30 40

【 0 0 0 9 】

デンプンの機能的特性、栄養生理学特性または構造に付与する特性は、デンプンの非炭素成分であるリン酸の含有量によっても影響される。（デンプンリン酸エステルとして指定される本発明に関連して）モノエステルの形態にあるデンプンのグルコース分子に共有結合するリン酸と、デンプンと結合したリン脂質の形態にあるリン酸との間の区別が、本発明においてなされるべきである。

【 0 0 1 0 】

デンプンリン酸エステルの含有量は、植物の種類に応じて変動する。例えば、あるトウモロコシ変異体は、デンプンリン酸エステルの増大した含有量を有するデンプンを合成す 50

る（蝶様トウモロコシ 0.002% および高アミローストウモロコシ 0.013%）のに対し、トウモロコシの従来の種類は、デンプンリン酸エステルの痕跡量を含有するにすぎない。同様に、デンプンリン酸エステルの少量は、コムギにおいて見出される（0.001%）のに対し、カラスムギおよびモロコシ属においては、デンプンリン酸エステルも検出することは不可能であった。同様に、デンプンリン酸エステルは、コメの従来の種類（0.013%）よりもコメ変異体（蝶様コメ 0.003%）において見出された。デンプンリン酸エステルの有意な量は、例えば、タピオカ（0.008%）、サツマイモ（0.011%）、クズウコン（0.021%）またはジャガイモ（0.089%）など、塊茎または根で貯蔵するデンプンを合成する植物において見出された。各場合において上述に引用されるデンプンリン酸エステルの含有量に関する%値は、デンプンの乾燥重量と関連し、Janeら（1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832）によって測定されている。
10

【0011】

デンプンリン酸エステルは、重合したグルコースモノマーのC2、C3またはC6位におけるモノエステルの形態で存在し得る（Takeda and Hizukuri, 1971, Starch/Starke 23, 267-272）。植物によって合成されたデンプン中のリン酸のリン酸分布は一般的に、グルコース分子のC3位におけるリン酸ラジカル約30~40%およびC6位におけるリン酸ラジカル約60~70%が共有結合している点で区別される（Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218）。Blennowら（2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174）は、例えば、ジャガイモデンプン（デンプン1mgあたり7.8~33.5nmol、栽培品種による）、様々なウコン属の種由来のデンプン（1mgあたり1.8~6.3nmol、栽培品種による）、タピオカデンプン（デンプン1mgあたり2.5nmol）、コメデンプン（デンプン1mgあたり1.0nmol）、リョクトウデンプン（デンプン1mgあたり3.5nmol）およびモロコシデンプン（デンプン1mgあたり0.9nmol）など、様々なデンプンの含有量を測定した。オオムギデンプンおよびトウモロコシの様々な蝶様変異体由来のデンプンにおいて、これらの著者は、C6位に結合したいずれのデンプンリン酸エステルも検出することはできなかった。これまで、植物の遺伝子型とデンプンリン酸エステル含有量との間を何ら関係付けることはできなかった（Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832）。したがって、育種測定によって植物中のデンプンリン酸エステルの含有量に影響を及ぼすことは不可能である。
20

【0012】

これまで、デンプンのグルコース分子中へのリン酸ラジカルの共有結合の導入を仲介する2つのタンパク質が記載されている。第一のタンパク質は、-グルカン-水ジキナーゼ（GWD、E.C.:2.7.9.4）（Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171）の酵素活性を有し、特により古い科学文献においてしばしばR1と呼ばれ、ジャガイモ塊茎中の貯蔵デンプンのデンプン顆粒に結合している（Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477）。デンプン中へのデンプンリン酸エステルの導入を触媒する、文献中に記載される第二のタンパク質は、ホスホグルカン-水ジキナーゼ（PWD、E.C.:2.7.9.5）の酵素活性を有する（Kotting et al., 2005, Plant Physiol. 137, 2424-252, Baunsgaard et al., 2005, Plant Journal 41, 595-605）。

【0013】

GWDとPWDとの間の有意差は、GWDが、リン酸化されていないデンプンを基質として使用することが可能であり、すなわち、リン酸化されていないデンプンのデノボ（de novo）リン酸化が、GWDによって触媒されることが可能であるのに対し、PWDは、既にリン酸化されたデンプンを基質として必要とし、すなわち、リン酸をすでにリン酸化されたデンプンへとさらに導入するという事実からなる（Kotting et al., 2005, Plant Physiol. 137, 2424-252, Baunsgaard et al., 2005, Plant Journal 41, 595-605）。GWDとPWDの間のさらなる有意差は、GWDがもっぱら、デンプンのグルコース分子のC6位へとリン酸基を導入するのに対し、PWDがもっぱら、リン酸化されたデンプンのグルコース分子のC3位をリン酸化するという事実からなる（Ritte et al., 2006, FEBS Letters 580, 4872-4876）。
30
40
50

【0014】

GWDまたはPWDによって触媒される反応において、出発材料である（GWDのための）-1,4-グルカンまたは（PWDのための）リン酸化された-1,4-グルカン、アデノシン三リン酸（ATP）および水が反応し、生成物であるグルカンリン酸エステル（デンプンリン酸エステル）、モノリン酸およびアデノシンーリン酸を与える（Kotting et al., 2005, Plant Physiol. 137, 2424-252, Ritte et al., 2002, PNAS 99, 716 6-7171）。

【0015】

ジャガイモからのGWDコード遺伝子の発現により、GWDタンパク質の増大した活性を有するコムギ植物は、W00234923に記載されている。デンプンリン酸エステルを検出することが不可能であった対応する野生型植物と比較して、これらの植物は、グルコース分子のC6位におけるデンプンリン酸エステルの有意な量を含有するデンプンを合成する。10

【0016】

WO052359は、トウモロコシ植物によって使用されるコドンに関して最適化されたトウモロコシ植物中でのジャガイモ由来のGWDの過剰発現を記載する。³¹P-NMRによって、グルコースの量に基づいた0.0736%のリン酸の問題のトウモロコシデンプンの（グルコース分子のC6、C3およびC2位において結合した）全体のリン酸含有量が測定された。98の分子量がリン酸に関する基礎として採用される場合、デンプン1mgあたりのリン酸約7.5nmolの全リン酸含有量は、トランスジェニックトウモロコシ植物から単離されたデンプンに関してWO052359において測定された0.0736%の全リン酸含有量の結果である。20

【0017】

シロイヌナズナ由来のPWDコード遺伝子の過剰発現によりPWDタンパク質の増大した活性を有する植物は、WO05095617において記載されている。対応する形質転換していない野生型植物と比較して、これらの植物は、デンプンリン酸エステルの増大した含有量を有する。

【0018】

例えば、食品産業でのデンプンの加工における重要な機能的特性は、膨潤力である。アミロース/アミロペクチン比、側鎖長、分子量、分枝数等のデンプンの多様な構造的特性は、問題のデンプンの膨潤力に影響を及ぼす（Narayana and Moorthy, 2002, Starch/Stärke 54, 559-592）。30

【0019】

アミロース/アミロペクチン比、アミロペクチンの側鎖分布およびデンプンポリマーの分子量分布に加えて、デンプンリン酸エステルの量も、機能的特性、特にデンプンの膨潤力に影響するという忠告は、科学文献から得られ得る（Narayana and Moorthy, 2002, Starch/Stärke 54, 559-592）。

【0020】

デンプンの膨潤量に関して、冷水（例えば、室温）中の膨潤力と温水または熱水中の膨潤力との間の区別がなされるべきであることは強調されるべきである。未変性のデンプンは、たとえそうであるとしても冷水中でごくわずかな膨潤力を有するのに対し、物理的に改变された（化した、乾燥した）デンプンはすでに、冷水中で膨潤することが可能である。冷水中で膨潤するデンプンに関する製品加工が、例えば米国特許第4,280,851号に記載されている。本発明と関連して、「膨潤力」という用語は、温かい/熱い水性懸濁液中のデンプンの挙動に関する。膨潤力は、標準的に、水の過剰量の存在下でデンプン顆粒を加温し、懸濁液の遠心分離後に非結合水を除去し、得られた残渣の重量を秤量されたデンプン量の重量で除した商を形成することによって測定される。この方法を実施する場合、加温の際に、デンプン顆粒のデンプン懸濁結晶面積が溶解され、水分子が、デンプン顆粒中に挿入するが、デンプン顆粒自体の構造がここでは破壊されておらず、すなわち、水分子の吸収によって生じる個々のデンプン顆粒の膨潤のみが生じる。40

【0021】

1020304050

子実デンプンと比較して、塊茎または塊茎組織から単離されたデンプンは、有意に高い熱湯膨潤力を有する。

【0022】

多様な品種から単離されたジャガイモデンプンに関し、74.15 g/gの最大膨潤力（クフリ・ジョティ（Kufri Jyoti）品種）が、Leachらの方法（1959, Cereal Chemistry 36, 534-544）に従って、85で測定された（Singh et al., 2002, Journal of the Science of Food and Agriculture 82, 1376-1383）。Takizawaら（2004, Brazilian Archives of Biology and Technology 47 (6), 921-931）は、ジャガイモデンプンに関して100 g/gの膨潤力を測定した（90、Leachらの方法（1959, Cereal Chemistry 36, 534-544）による）。多様な栽培品種から単離されたコムギデンプンは、16.6～26.0 g/gの膨潤力（温度：沸騰中の0.1% AgNO₃懸濁液）を有する（Yamamori and Quynh, 2000, Theor Appl Genet 100, 23-28）。外皮のないオオムギの多様な栽培品種から単離されたデンプンは、16.5 g/gまたは19.3 g/gの膨潤力を有し、該オオムギの多様な栽培品種の蝶様デンプンまたはアミロースを含有しないデンプンは、36.0～55.7 g/gの膨潤力を有する（温度：70の0.1% AgNO₃水溶液、Yasui et al., 2002, Starch/ Starke 54, 179-184）。トウモロコシデンプンに関して、22.3 g/gの膨潤力、および高アミローストウモロコシデンプンに関して、9.6 g/g（Hylon V）、6.1 g/g（Hylon VII）または3.9 g/g（LAPS = 低アミロペクチンデンプン）の膨潤力を測定した（90、Shi et al., 1998, J. Cereal Sci. 27, 289-299）。米国特許第6,2909,907号において、35.4 g/gの膨潤力が、蝶様デンプンに関して示された。多様なコメ栽培品種から単離されたデンプンに関して、26.0～33.2 g/gの膨潤力が、Leachらの方法（1959, Cereal Chemistry 36, 534-544）に従って測定された（Sodhi and Singh, 2003, Food Chemistry 80, 99-108）。Chenら（2003, Starch/Starke 55, 203-212）は、蝶様コメデンプンと高アミロースコメデンプンとの多様な混合物に関して、約25～約49 g/gの膨潤力を測定した。Yasuiら（2002, Starch/ Starke 54, 179-184）は、アミロースを含有しないコメデンプンに関して、55.7 g/gの膨潤力を測定した（0.1% 硝酸銀水溶液中で沸騰水中で測定）。

【0023】

未変性デンプンの誘導体の調製によって、デンプンの機能的特性は変化し得る。「架橋された」コムギデンプンは、架橋の程度に応じて、6.8～8.9 g/gの膨潤力を有し、アセチル化したコムギデンプンは、せいぜい10.3 g/gの膨潤力を有し、同時に、架橋されおよびアセチル化されたコムギデンプンは、9.4 g/gの膨潤力を有するのに対し、対応する誘導体化されていないデンプンは、8.8 g/gの膨潤力を有した（90で測定；Van Hung and Morita, 2005, Starch/Starke 57, 413-420）。

【0024】

アセチル化した蝶様コメデンプンに関して、約30 g/gの膨潤力が、架橋された蝶様コメデンプンに関して、約15 g/gの膨潤力が測定されたのに対し、対応する誘導体化されていない蝶様コメデンプンは、約41 g/gの膨潤力を有した。アセチル化したコメデンプンは、約20 g/gの膨潤力を有し、架橋されたコメデンプンは、約13 g/gの膨潤力を有するのに対し、対応する誘導体化されていないコメデンプンは、約14 g/gの膨潤力を有した（90で測定、Liu et al., 1999, Starch/Starke 52, 249-252）。米国特許第6,299,907号は、架橋したデンプンを記載し、架橋反応は、水酸化ナトリウム／硫酸ナトリウム溶液中で問題のデンプンの前膨潤の後に実施される。架橋の程度に応じて、コムギデンプンに関しては、6.8～7.3 g/gの膨潤力（誘導体化されていないコムギデンプン14.7 g/gに相当）が、ヒドロキシプロピルコムギデンプンに関しては、9.7 g/gの膨潤力（誘導体化されていない小麦デンプン22.9 g/gに相当）が、架橋されたトウモロコシデンプンに関しては、5.9 g/gの膨潤力（誘導体化されていないトウモロコシデンプン16.7 g/gに相当）が、架橋された蝶様トウモロコシデンプンに関しては、8.3 g/gの膨潤力（誘導体化されていない蝶様トウモロコシデンプン35.4 g/gに相当）が、および架橋されたジャガイモデンプンに関しては、6.7 g/gの膨潤力（相当する

10

20

30

40

50

誘導体化されていないジャガイモデンプンは、正確には特定されていなかった)が測定された(95で測定)。このことから、デンプンの膨潤力が、たとえそうであったとしても、今日、誘導体化の通例の方法によって有意に増大することが不可能であることが結果として得られる。

【0025】

本発明は、機能的特性の変化した利用可能な改変されたデンプンを製造する目的、機能的特性の変化したデンプンを合成する植物細胞および植物、ならびに該植物および/または植物細胞の作出のための方法および手段に基づいている。

【0026】

本発明はしたがって、遺伝的に改変されていない対応する野生型の植物細胞または野生型植物と比較して、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性と、グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性とを有する、遺伝的に改変された植物細胞および遺伝的に改変された植物に関する。

【0027】

本発明の第一の局面は、遺伝的に改変された植物細胞または植物に関するものであり、遺伝的改変は、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞または野生型植物と比較して、デンプン合成酵素IIの活性を有する少なくとも1つのタンパク質の活性における増大、および同時に、グルカン・水ジキナーゼの活性を有する少なくとも1つのタンパク質の活性における増大に至る。

【0028】

遺伝的改変は、本発明において、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞または野生型植物と比較して、遺伝的に改変された植物細胞または遺伝的に改変された植物におけるデンプン合成酵素IIの活性を有する少なくとも1つのタンパク質、および(同時に)グルカン・水ジキナーゼの活性を有する少なくとも1つのタンパク質の活性における増大に至る遺伝的改変であり得る。

【0029】

「野生型植物細胞」という用語は、本発明と関連して、これらが、本発明に従った植物細胞の作出のための出発材料として機能する植物細胞であり、すなわち、前記植物細胞の遺伝情報が、導入される遺伝的改変は別として、本発明に従った植物細胞の遺伝情報に相当することを意味する。

【0030】

本発明と関連して、「野生型植物」という用語は、これらが、本発明に従った植物細胞の作出のための出発材料として機能する植物であり、すなわち、前記植物の遺伝情報が、導入される遺伝的改変は別として、本発明に従った植物の遺伝情報に相当することを意味する。

【0031】

「対応する」という用語は、本発明と関連して、多くの論文の比較の上で、互いに比較されている問題の論文が、同一条件下で維持されたことを意味する。本発明と関連して、野生型植物細胞または野生型植物と関連した「対応する」という用語は、互いに比較されている前記植物細胞または植物が、同一の栽培条件下で生育し、それらが同一の(栽培)齢を有することを意味する。

【0032】

「デンプン合成酵素IIの活性を有する少なくとも1つのタンパク質の増大した活性」という用語は、本発明において、本発明と関連して、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする内在性遺伝子の発現の増大、および/または細胞におけるデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の量の増大、および/または細胞におけるデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の酵素活性の増大を意味する。

【0033】

「グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性」という用語は、本発明において、本発明と関連して、グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質

10

20

30

40

50

をコードする内在性遺伝子の発現における増大、および／または細胞におけるグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の量における増大、および／または細胞におけるグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の酵素活性における増大を意味する。

【0034】

発現の増大は、例えば、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードし、またはグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする転写産物の量の測定によって決定されることが可能である。このことは、例えば、ノザンプロット分析またはR T - P C R によって実施されることが可能である。本発明において、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする転写産物の量の増大は好ましくは、遺伝的に改変されていない対応する細胞と比較して、転写産物の量の、少なくとも100%、特に少なくとも125%、好ましくは少なくとも150%および特に好ましくは少なくとも200%ほどの増大を意味する。デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする転写産物の検出可能な量を含有しない植物または植物細胞が、本発明に従った遺伝的改変後に、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする転写産物の検出可能な量を含有することも意味する。

【0035】

本発明において、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする転写産物の量の増大は好ましくは、遺伝的に改変されていない対応する細胞と比較して、転写産物の量の、少なくとも50%、特に少なくとも70%、好ましくは少なくとも85%および特に好ましくは少なくとも100%の増大を意味する。

【0036】

グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする転写産物の量の増大は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする転写産物の検出可能な量を含有しない植物または植物細胞が、本発明に従った遺伝的改変後に、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする転写産物の検出可能な量を含有することも意味する。

【0037】

結果として問題の植物細胞におけるデンプン合成酵素IIおよびグルカン - 水ジキナーゼのタンパク質の増大した活性を有する、デンプン合成酵素IIの活性を有しましたはグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の量の増大は、例えば、ウェスタンプロット分析、E L I S A (酵素結合免疫吸着検定法) またはR I A (ラジオイムノアッセイ) 等の免疫学的方法によって測定されることが可能である。本発明において、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の量の増大は好ましくは、遺伝的に改変されていない対応する細胞と比較して、問題のタンパク質の量の、少なくとも100%、特に少なくとも125%、好ましくは少なくとも150%および特に好ましくは少なくとも200%の増大を意味する。デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の量の増大は、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の検出可能な量を含有しない植物または植物細胞が、本発明に従った遺伝的改変後に、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の検出可能な量を含有することも意味する。

【0038】

本発明において、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の量の増大は好ましくは、遺伝的に改変されていない対応する細胞と比較して、問題のタンパク質の量の、少なくとも50%、特に少なくとも70%、好ましくは少なくとも85%および特に好ましくは少なくとも100%ほどの増大を意味する。

【0039】

グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の量の増大は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の検出可能な量を含有しない植物または植物細胞が、本発明に従った遺伝的改変後に、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の検出可能な量を含有することも意味する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

特定のタンパク質と特異的に反応する、すなわち、該タンパク質に特異的に結合する抗体の產生のための方法は、当業者に公知である（例えば、Lottspeich and Zorbas (Eds.) , 1998, Bioanalytik [Bioanalytics], Spektrum akad. Velag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4参照）。この種の抗体の產生は、いくつかの会社（例えば、Eurogentec , Belgium）によって役務契約として提供される。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の量の増大を、免疫学的方法によって検出することを可能とする抗体は、Röberthら (1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) およびRitteら (2000, Plant Journal 21, 387-391) において記載されている。デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の量の増大を、免疫学的方法によって測定することを可能とする抗体は、Walter ("Untersuchungen der Expression und Funktion der Starchsynthase II (SS II) aus Weizen (Triticum aestivum)" [Investigations of the expression and function of starch synthase II (SS II) from wheat (Triticum aestivum)], the faculty of Biology of the University of Hamburgにおける学位論文, ISBN 3-8265-8212-8) において記載されている。
10

【 0 0 4 1 】

グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性の量は、例えば、文献 (Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532; Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) に記載されるように検出されることが可能である。

【 0 0 4 2 】

デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の量は、例えば、文献 (Nishi et al., 2001, Plant Physiology 127, 459-472) において記載されるように測定されることが可能である。デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の量の測定のための好ましい方法は、一般的な方法の第9項に記載されている。
20

【 0 0 4 3 】

好ましくは、本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物は、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞または野生型植物と比較して、少なくとも6倍、好ましくは少なくとも7倍、特に好ましくは少なくとも8倍、特に好ましくは少なくとも9倍、および非常に特に好ましくは少なくとも10倍増大するデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性を有する。
30

【 0 0 4 4 】

デンプン合成酵素II (ADP - グルコース - 1, 4 - D - グルカン - 4 - D - グルコシルトランスフェラーゼ ; EC2.4.1.21) の活性を有するタンパク質は、前記タンパク質の構造中に特定のドメインの配列を有する。N末端に、前記タンパク質は、色素体における輸送のためのシグナルペプチドを有する。N末端からC末端の方向に、N末端領域および触媒ドメインが続く (Li et al., 2003, Funct Integr Genomics 3, 76-85)。デンプン合成酵素IIの活性を有する様々なタンパク質のアミノ酸配列比較 (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) に基づいたさらなる分析は、これらのタンパク質が、3つの特異的ドメインを有することを示した。配列番号6に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸322～351は、ドメイン1を表し、アミノ酸423～462は、ドメイン2を表し、アミノ酸641～705は、ドメイン3を表す。ドメイン1は、配列番号5で示される核酸配列のヌクレオチド1190～1279によってコードされ、ドメイン2は、ヌクレオチド1493～1612によってコードされ、ドメイン3は、ヌクレオチド2147～2350によってコードされる。
40

【 0 0 4 5 】

本発明と関連して、「デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質」という用語は、基質ADP - グルコースのグルコース分子が、-1, 4 - 連結の形成とともに -1, 4 - 連結されたグルカン鎖へ転移され (ADP - グルコース + { (1, 4) - D - グルコシル } (N) ADP + { (1, 4) - D - グルコシル } (N+1))、デンプン合成酵素IIのタンパク質の活性を有するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号6で示
50

されるアミノ酸配列のアミノ酸 322～351（ドメイン1）と少なくとも 86%、好ましくは少なくとも 93%、特に好ましくは少なくとも 95% の同一性を有し、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸 423～462（ドメイン2）と少なくとも 83%、好ましくは少なくとも 86%、特に好ましくは少なくとも 95% の同一性を有し、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸 641～705（ドメイン3）と少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 82%、好ましくは 86%、特に好ましくは 98% の同一性を有するグリコシル化反応を触媒するタンパク質を意味するものとして理解されるべきである。

【0046】

ドメイン1、2および3との該同一性を有し、およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列およびそれに対応するアミノ酸配列は、当業者に公知であり、例えば、受託番号第AY133249号（オオムギ）、受託番号第AY133248号（タルホコムギ）、受託番号第XP467757号、第AAK64284号（イネ）、第AAK81729号（イネ）、受託番号第AAD13341号、第AAS77569号、第AAD13342号（トウモロコシ）、受託番号第AAF 13168号（キャッサバ）、受託番号第BAD18846号（インゲンマメ）、受託番号第CAA61241号（ジャガイモ）、受託番号第CAA61269号（エンドウマメ）、受託番号第AAC19119号（サツマイモ）、受託番号第AAF 26156号（シロイヌナズナ）、受託番号第AAP41030号（サトイモ）、受託番号第AAS88880号（オストレオコッカス・タウリ (*Ostreaeococcus tauri*)）または受託番号第AAC17970号（コナミドリムシ）で刊行されている。デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする記載された核酸配列およびアミノ酸配列は、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) によってアクセス可能であり、参考文献の記載によって本願の明細書に明確に含まれる。

【0047】

本発明の脈絡において、「グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質」という用語は、ATPからデンプンへ リン酸残基を転移させるタンパク質を意味するものとして理解されるべきである。シロイヌナズナ *s e x 1 - 3* 変異体の葉から単離されたデンプンは、共有結合したリン酸ラジカルの検出可能な量を有さないが、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質によってリン酸化され、すなわち、例えばシロイヌナズナ *s e x 1 - 3* 変異体の葉から単離されたリン酸化されていないデンプンが、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質によって触媒されるリン酸化反応において基質として使用される。

【0048】

ATPの リン酸ラジカルは、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質からデンプンへ転移し、ATPの リン酸ラジカルは、水へ転移する。AMP（アデノシン一リン酸）は、さらなる反応産物として結果的に生じる。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質はしたがって、[- 1 , 4 - グルカン] - 水ジキナーゼとして、またはデンプン - 水ジキナーゼ (EC: 2.7.9.4; Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) としても指定される。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質によって触媒されるデンプンのリン酸化において、さらなるリン酸モノエステル結合が、グルコース分子のC6位を独占的に生じる (Ritte et al., 2006, FEBS Letters 580, 4872-4876)。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質によるデンプンのリン酸化反応の触媒において、ATPの リン酸ラジカルが、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸へ共有結合するリン酸化したタンパク質は、中間体として結果的に生じる (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171)。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の自己リン酸化によって結果的に中間体が生じ、すなわち、グルカン - 水ジキナーゼ自体の活性を有するタンパク質は、中間体に至る反応を触媒する。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードするアミノ酸配列は、ホスホヒスチジンドメインを含有する。ホスホヒスチジンドメインは、例えば、Tien-Shin Yuら (2001, Plant Cell 13, 1907-1918) において記載されている。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の自己リン酸化において、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質を

10

20

30

40

50

コードするアミノ酸配列のホスホヒスチジンドメインにおけるヒスチジンラジカルは、リン酸化される (Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532)。配列番号 2 で示されるジャガイモ由来のグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質のタンパク質配列において、アミノ酸 1064 ~ 1075 は、ホスホヒスチジンドメインである。ホスホヒスチジンドメインの（例えば配列番号 2 で示されるアミノ酸 1069 のタンパク質配列における）保存されたヒスチジンラジカルが、別のアミノ酸によって置換される場合、自己リン酸化およびしたがって変異誘発されたタンパク質によるグルカンのリン酸化も、もはや生じない (Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532)。さらに、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質は、例えば配列番号 2 で示されるアミノ酸 1121 ~ 1464 のアミノ酸配列に含まれる C 末端ヌクレオチド結合ドメインを前記タンパク質が有する点で区別される。ヌクレオチド結合ドメインの欠失は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の不活性化を導く (Mikkelsen and Blennow, 2005, Biochemical Journal 385, 355-361)。N 末端において、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質は、配列番号 2 で示されるアミノ酸 78 ~ 362 のアミノ酸配列中に含まれる炭水化物結合ドメイン (CBM) を含有する。炭水化物結合ドメインは、とりわけ、前記ドメインのアミノ酸配列が、保存されたトリプトファン残基を含有する点で区別される。これらの保存されたアミノ酸残基が、別のアミノ酸によって置換される場合、炭水化物結合ドメインは、グルカンに結合する前記ドメインの能力を損失する。例えば、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列におけるアミノ酸 W139 または W194 の置換は、炭水化物結合ドメインの機能の損失を導く。しかしながら、グルカン - 水ジキナーゼの炭水化物結合ドメインが、欠失される場合（例えば、アミノ酸 1 ~ 362 の欠失、ここで配列番号 2 で示されるアミノ酸配列中のアミノ酸 1 ~ 77 は、色素体シグナルペプチドである）、これは、酵素のリン酸化活性の不活性化を導かない (Mikkelsen et al., 2006, Biochemistry 45, 4674-4682)。

【0049】

グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列およびこれらに対応するアミノ酸配列は、例えばジャガイモ (WO 97 11188、GenBank受託番号第AY027522号、第Y09533号)、コムギ (WO 00 77229、米国特許第6,462,256号、GenBank受託番号第AAN93923号、GenBank受託番号第AR236165号)、コメ (GenBank受託番号AAR61445号、GenBank受託番号第AR400814号)、トウモロコシ (GenBank受託番号AAR61444号、GenBank受託番号第AR400813号)、ダイズ (GenBank受託番号AAR61446号、GenBank受託番号第AR400815号)、ウコン（配列番号 3）、柑橘類 (GenBank受託番号第AY094062号)、アラビドブシス (GenBank受託番号第AF 3 12027号) および緑藻類オストレオコッカス・タウリ (Ostreococcus tauri) (GenBank受託番号第AY570720.1号) など、異なる種に関して記載されている。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする記載された核酸配列およびアミノ酸配列は、とりわけ、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) によって刊行されており、参考文献の記載によって本願の明細書に明確に含まれる。

【0050】

本発明のさらなる実施態様は、本発明に従った遺伝的に改变された植物細胞または本発明に従った遺伝的に改变された植物に関するものであり、遺伝的改变は、植物細胞のゲノム中へのまたは植物のゲノム中への少なくとも 1 つの外来核酸分子の導入からなる。

【0051】

この関係において、「遺伝的改变」という用語は、植物細胞のゲノム中へのまたは植物のゲノム中への同種 (homologous) 的および / または異種 (heterologous) 的外来核酸分子の導入を意味するものであり、これらの分子の該導入は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性の増大およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の増大に至る。

【0052】

外来核酸分子の導入によって、本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物は、前記植物細胞および前記植物の遺伝情報において変化する。少なくとも 1 つの外来核酸分

子の存在または発現は、表現型の変化を導く。本発明において、「表現型の」変化とは、好ましくは細胞の1つ以上の機能の測定可能な変化を意味する。例えば、本発明に従った遺伝的に改変された植物細胞および本発明に従った遺伝的に改変された植物は、導入される外来核酸分子の存在の理由で、または前記核酸分子の発現の場合において、グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性の増大およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の増大を示す。

【0053】

「外来核酸分子」という用語は、本発明と関連して、対応する野生型植物細胞において天然には生じない、または実際の空間的配置において野生型植物細胞において天然には生じない、または野生型植物細胞のゲノム中の天然には生じない部位中に局在する、いずれかの種類の分子を意味するものとして理解される。好ましくは、外来核酸分子とは、植物細胞中で組み合わせまたは特異的空間的配置が天然には生じない多様な要素からなる組換え分子である。10

【0054】

原理上、外来核酸分子は、植物細胞または植物におけるグルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の増大を生じるいずれかの所望の核酸分子であり得る。

【0055】

「組換え核酸分子」という用語は、本発明と関連して、組換え核酸分子に存在するようには一緒に天然には存在しない異なる核酸分子を含有する核酸分子を意味するものとして理解されるべきである。したがって、例えば、組換え核酸分子は、グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をおよび/またはデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子に加えて、組換え核酸分子は、記載される核酸分子と一緒にには天然には存在しないさらなる核酸配列を含有することが可能である。グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をまたはデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子と一緒に、組換え核酸分子に存在すると記載されるさらなる核酸配列は、本発明におけるいずれかの所望の配列であり得る。例えば、前記核酸配列は、ゲノムおよび/または植物の核酸配列であり得る。好ましくは、記載されるさらなる核酸配列は、制御配列（プロモーター、終止シグナル、エンハンサー）であり、特に好ましくは、植物組織中で活性である制御配列であり、特に好ましくは植物組織中で活性である組織特異的制御配列である。組換え核酸分子の生成のための方法は、当業者に公知であり、例えば連結、ゲノム組換えまたは核酸分子のデノボ合成による核酸分子の接続等の遺伝子工学的方法を含む（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN: 0471250929参照）。2030

【0056】

「ゲノム」という用語は、本発明と関連して、植物細胞中に存在する遺伝性材料の全体性を意味するものとして理解されるべきである。細胞核に加えて、他の区画（例えば、色素体、ミトコンドリア）も遺伝性材料を含有することは当業者に公知である。40

【0057】

さらなる実施態様において、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、少なくとも1つの外来核酸分子が、グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードすることを特徴とする。好ましくは、グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする外来核酸分子は、多様な植物種から当業者に知られた既に記載された核酸分子であり、特に好ましくはジャガイモまたはウコン由来のグルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子、特に好ましくは、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有しまたは配列番号1に示される核酸配列によってコードされるグルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子である。

【0058】

50

配列番号 3 および配列番号 4 で示される配列は、従前刊行されていない。植物細胞または植物、特にウコン由来のグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする外来核酸分子を含有するコメ植物細胞またはコメ植物は、他の種（例えば、ジャガイモ）由来のグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする外来核酸分子を含有する植物細胞または植物よりも高いデンプンリン酸エステル含有量を有するデンプンを合成する点で区別される。

【 0 0 5 9 】

したがって、本発明は、

- a) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸分子；
 - b) アミノ酸配列が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、優先的には少なくとも 93 %、好ましくは少なくとも 96 % および特に好ましくは少なくとも 99 % 含有するタンパク質をコードする核酸分子；
 - c) 配列番号 3 で示される核酸配列または相補的な配列を含む核酸分子；
 - d) 配列番号 3 で示される核酸配列と少なくとも 90 %、優先的には少なくとも 93 %、好ましくは少なくとも 96 % および特に好ましくは少なくとも 99 % の同一性を有する核酸分子；
 - e) a) または c) で記載される核酸分子の少なくとも 1 本の鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；
 - f) 遺伝暗号の縮重の理由で、ヌクレオチド配列が、a) または c) で記載される核酸分子の配列とは異なる核酸分子；
 - g) a)、b)、c)、d)、e) または f) で記載される核酸分子の断片、対立遺伝子多型および / または誘導体である核酸分子；
 - h) 植物細胞において転写を開始する調節エレメント（プロモーター）へ連結される、a)、b)、c)、d)、e)、f) または g) に従った核酸分子または
 - i) プロモーターが、組織特異的プロモーター、特に好ましくは、特に植物胚乳細胞における転写を開始するプロモーターである、h) に従った核酸分子
- からなる群より選択されるグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子にも関する。

【 0 0 6 0 】

さらに、本発明は、本発明に従った外来核酸分子を含有するプラスミド、ベクターおよび植物細胞または植物に関する。

【 0 0 6 1 】

さらなる実施態様において、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、少なくとも 1 つの外来核酸分子が、デンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質をコードすることを特徴とする。好ましくは、デンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質をコードする外来核酸分子は、多様な植物種から当業者に知られた既に記載された核酸分子であり、特に好ましくはコムギ由来のデンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質をコードする核酸分子、特に好ましくは、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列を有しましたは配列番号 5 に示される核酸配列によってコードされるデンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質をコードする核酸分子である。

【 0 0 6 2 】

さらなる実施態様において、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、第一の外来核酸分子が、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードし、第二の外来核酸分子が、デンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質をコードすることを特徴とする。

【 0 0 6 3 】

植物細胞または植物における遺伝的改変に関して導入される外来核酸分子は、個々の核酸分子または多くの核酸分子であり得る。前記外来核酸分子はしたがって、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含有する核酸分子と、デンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含有する核酸分子の両

10

20

20

30

40

50

者であり得、前記外来核酸分子は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列が、異なる核酸分子中に存在する核酸分子であり得る。グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列は、例えば1つのベクター、プラスミドもしくは直鎖状で存在する核酸分子、または互いに別個に各場合における2つのベクター、プラスミドまたは直鎖状核酸分子のその他の構成体において同時に含有されることが可能である。

【 0 0 6 4 】

グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列およびデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列が、互いに別個である2つの核酸分子中に存在する場合、前記核酸配列は、植物細胞もしくは植物のゲノム中に同時に導入され（「コトランスクローメーション」）、またはさもなくば連続して、すなわち、互いに経時的に追隨してのいずれかで導入されることが可能である（「スパートランスクローメーション」）。互いに別個の核酸分子は、1つの種の異なる個々の植物細胞または植物へと導入されることも可能である。それにより、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有する少なくとも1つのタンパク質またはデンプン合成酵素IIの活性を有する少なくとも1つの他のタンパク質のいずれかの活性が増大した植物細胞または植物を作出することが可能である。本発明に従った植物は次に、植物のその後の交雑によって、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性が増大し、それとともに、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性が増大した植物を作出することが可能である。

10

【 0 0 6 5 】

さらに、外来核酸分子の導入に関して、野生型植物細胞または野生型植物の代わりにグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性またはデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を既に有する点で区別される変異体細胞または変異体が使用される。変異体は、自発的に（天然に）発生する変異体と、突然変異原の選択的使用（例えば、化学物質、電離放射線など）または遺伝子工学方法（例えば、T-DNA活性化タグ付け、トランスポゾン活性化タグ付け、インサイツ（*in situ*）活性化、インビボ（*in vivo*）変異誘発）によって作出された変異体との両者であり得る。

本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物はしたがって、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を既に有する変異体細胞または変異体におけるグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性の増大に至る外来核酸分子の導入によっても作出されることが可能である。本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物は、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を既に有する変異体細胞または変異体への、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の増大に至る外来核酸分子の導入によっても作出されることが可能である。

20

【 0 0 6 6 】

本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物は、グルカンジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性が増大する変異体を、外来核酸分子の導入の理由でデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物と交雑させることによっても作出されることが可能である。同様に、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性が増大する変異体を、外来核酸分子の導入の理由で、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物と交雑させることによって、本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物を作出することが可能である。

40

【 0 0 6 7 】

本発明に従った植物は、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性が増大する変異体を、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性が増大する変異体と交雑させることによっても作出されることが可能である。

【 0 0 6 8 】

DNAの宿主植物細胞への導入のために、多数の技術が利用可能である。これらの技術には、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）またはア

50

グロバクテリウム・リゾジーンズ (*Agrobacterium rhizogenes*) を、トランスフォーメーション剤として使用する T-DNA による植物細胞のトランスフォーメーション、DNA の電気穿孔法、微粒子銃アプローチによる DNA の導入、およびさらなる可能性が含まれる。

【 0 0 6 9 】

植物細胞のアグロバクテリウム属により仲介されるトランスフォーメーションの使用は、とりわけ、欧洲特許第 120516 号、Hoekema (In: The Binary Plant Vector System Offsetdruckkerij Kanters B.V. Alblaserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46) および Anら (1985, EMBO J. 4, 277-287) において集中的に研究され記載されている。ジャガイモのトランスフォーメーションに関しては、例えば、Rocha-Sosaら (1989, EMBO J. 29-33) を参照されたい。10

【 0 0 7 0 】

アグロバクテリウム属のトランスフォーメーションを基にしたベクターによる単子葉植物のトランスフォーメーションも記載されている (1993, Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, 491-506; Hiei et al., 1994, Plant J. 6, 271-282; Deng et al., 1990, Science in China 33, 28-34; Wilmink et al., 1992, Plant Cell Reports 11, 76-80; May et al., 1995, Bio/Technology 13, 486-492; Conner and Domisse, 1992, Int. J. Plant Sci. 153, 550-555; Ritchie et al., 1993, Transgenic Res. 2, 252-265)。単子葉植物のトランスフォーメーションのための代替的な方法は、微粒子銃アプローチ (Wan and Lemaux, 1994, Plant Physiol. 104, 37-48; Vasil et al., 1993, Bio/Technology 11, 1553-1558; Ritala et al., 1994, Plant Mol. Biol. 24, 317-325; Spencer et al., 1990, Theor. Appl. Genet. 79, 625-631)、原形質体トランスフォーメーション、部分的に透過された細胞の電気穿孔法またはガラス纖維による DNA の組込みによるトランスフォーメーションである。特に、トウモロコシのトランスフォーメーションは、文献中に反復して記載されている (例えば、WO 95 / 06128、欧洲特許第 0513849 号、欧洲特許第 0465875 号、欧洲特許第 0292435 号、Fromm et al., 1990, Biotechnology 8, 833-844; Gordon-Kamm et al., 1990, Plant Cell 2, 603-618; Koziel et al., 1993, Biotechnology 11, 194-200; Moroc et al., 1990, Theor. Appl. Genet. 80, 721-726 参照)。20

【 0 0 7 1 】

他の穀類種の成功したトランスフォーメーションも、例えばオオムギ (Wan and Lemaux, 上述参照、Ritala et al., 上述参照、Krens et al., 1982, Nature 296, 72-74) およびコムギ (Nehra et al., 1994, Plant J. 5, 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307) に関して既に記載されている。上述の方法はすべて、本発明の脈絡において適している。30

【 0 0 7 2 】

グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の導入および / またはデンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質の導入によって遺伝的に改変された植物細胞および植物は、とりわけ、野生型植物細胞または野生型植物において天然には生じない少なくとも 1 つの外来核酸分子を有するという事実によって、またはこの種類の分子が、本発明に従った植物細胞のゲノム又は本発明に従った植物のゲノム中の 1 つの部位で統合されて存在し、野生型植物細胞または野生型植物においてすなわち別のゲノム環境で生じないという事実によって、野生型植物細胞または野生型植物とは区別されることが可能である。さらに、本発明に従ったこのような植物細胞および本発明に従った植物は、場合によりさらに、野生型植物細胞または野生型植物におけるこの種類の分子のコピーを自然発生させるために、ゲノム中へ安定して統合された外来核酸分子の少なくとも 1 つのコピーを含有するという事実によって、野生型植物細胞または野生型植物とは区別されることが可能である。本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物へと導入された外来核酸分子が、野生型植物細胞または野生型植物において既に自然発生した分子へのさらなるコピーである場合、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、特に、この (これらの) さら4050

なるコピーが、野生型植物細胞または野生型植物において生じないゲノム中の部位に局在するという事実によって、野生型植物細胞または野生型植物とは区別されることが可能である。このことは、例えば、サザンプロット分析を用いて実証されることが可能である。

【0073】

さらに、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、好ましくは以下の特徴の少なくとも1つによって野生型植物細胞または野生型植物とは区別されることが可能である：導入される外来核酸分子が、植物細胞または植物に関して異種的である場合、本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物は、導入される核酸分子の転写産物を含有する。これらは、例えば、ノザンプロット分析によって、またはRT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）によって検出されることが可能である。好ましくは、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、導入される核酸分子によってコードされるタンパク質を含有する。このことは、例えば、免疫学的方法によって、特にウェスタンプロット分析によって検出されることが可能である。

【0074】

導入された外来核酸分子が、植物細胞または植物に関して同種的である場合、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、例えば、導入された外来核酸分子のさらなる発現の理由で、野生型植物細胞または野生型植物とは区別されることが可能である。本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は好ましくは、外来核酸分子の転写産物を含有する。このことは、例えば、ノザンプロット分析によって、または「定量的」RT-PCRを用いて検出されることが可能である。

10

20

【0075】

本発明に従った植物は、原理上、いずれかの所望の植物種の植物、すなわち、単子葉植物および双子葉植物の両者であり得る。好ましくは、前記植物は、有用な植物、すなわち、栄養の目的または技術的な目的のために、特に産業目的のために、ヒトによって栽培される植物である。

【0076】

さらなる実施態様において、本発明に従った植物は、デンプン貯蔵植物である。

【0077】

本発明と関連して、「デンプン貯蔵植物」という用語は、例えば、トウモロコシ、コメ、コムギ、ライムギ、カラスムギ、オオムギ、マニオク、ジャガイモ、サゴ、タロイモ、リョクトウ、エンドウマメ、ソルガム、サツマイモ等の貯蔵デンプンを含有する植物の部分を有するすべての植物を意味する。

30

【0078】

好ましい実施態様において、本発明は、本発明に従ったデンプン貯蔵単子葉植物、特に好ましくは、（系統的な）イネ科の植物に関する。特に好ましくは、これらは、コメ、トウモロコシまたはコムギの植物である。

【0079】

本発明と関連して、「コムギ植物」という用語は、コムギ属の植物種またはコムギ属の植物との交雑から作出される植物、特に農業において市販目的のために栽培されるコムギ属の植物種、またはコムギ属の植物との交雑から作出される植物を意味するものであり、特に、コムギ (*Triticum aestivum*) が好ましい。

40

【0080】

本発明と関連して、「トウモロコシ植物」という用語は、トウモロコシ属の植物種、特に農業において市販目的のために栽培されるトウモロコシ属の植物種、特に好ましくはトウモロコシ (*Zea mays*) を意味する。

【0081】

本発明と関連して、「コメ植物」という用語は、イネ属の植物種、特に農業において市販目的のために栽培されるイネ属の植物種、特に好ましくはイネ (*Oryza sativa*) を意味する。

【0082】

50

さらなる実施態様において、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、トランスジェニック植物細胞またはトランスジェニック植物である。

【0083】

本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、遺伝的に改変されていない野生型植物細胞または野生型植物から単離されたデンプンと比較して、改変されたデンプンを合成する。

【0084】

したがって、本発明のさらなる対象は、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞から単離された、または遺伝的に改変されていない対応する野生型植物から単離されたデンプンと比較して、改変されたデンプンを合成する本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物に関する。 10

【0085】

本発明はさらに、本発明に従った植物細胞を含有する遺伝的に改変された植物に関する。このような植物は、本発明に従った植物細胞から、再生によって作出されることが可能である。

【0086】

本発明は、本発明に従った植物細胞を含む、本発明に従った植物の繁殖材料にも関する。

【0087】

本発明において、「繁殖材料」という用語は、無性的または有性的な様式で子孫の作出に適した植物のいずれかの構成体を含む。無性繁殖に関しては、例えば、切断、カルス培養、根茎または塊茎が適している。他の繁殖材料は、例えば、果実、種子、実生、原形質体、細胞培養等を含む。特に好ましくは、繁殖材料は、胚乳含有種子（子実）である。 20

【0088】

さらなる実施態様において、本発明は、果実、貯蔵根、根、花、蕾、苗条または茎、好ましくは種子、顆粒または塊茎等の本発明に従った植物の収穫可能な植物部分に関するものであり、これらの収穫可能な部分は、本発明に従った植物細胞を含有する。

【0089】

本発明に従った植物細胞からまたは本発明に従った植物から合成されるデンプンは、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞から単離されるデンプンと比較して、または遺伝的に改変されていない対応する野生型植物から単離されるデンプンと比較して区別され、特に、増大した熱湯膨潤力を有する点で区別される。 30

【0090】

さらに、本発明は、遺伝的に改変された植物の作出のための方法にも関するものであり、

a) 植物細胞が、遺伝的に改変され、遺伝的改変が、以下の工程iおよびiiをいずれかの望ましい順序で個々にまたは同時に含み、

i) 遺伝的に改変されていない対応する野生型の植物細胞と比較して、デンプン合成酵素I I の酵素活性を有するタンパク質の活性の増大に至る遺伝的改変の植物細胞中への導入、 40

ii) 遺伝的に改変されていない対応する野生型の植物細胞と比較して、グルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質の活性の増大に至る遺伝的改変の植物細胞中への導入、

b) 植物が、工程a) の植物細胞から再生され；

c) 場合により、工程b) に従った植物を用いてさらなる植物が作出され、

ここで、植物細胞は場合により、工程b) またはc) に従った植物から単離され、方法の工程a) ~ c) が、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする外来核酸分子と、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする外来核酸分子とを含有する植物が作出されるまで、反復される。

【0091】

好ましい実施態様において、遺伝的に改変された植物の調製のための本発明に従った方法は、以下の工程を含む：

a) 植物細胞が、遺伝的に改変され、遺伝的改変は、個々にまたは同時に実施されている以下の工程iおよびiiのいずれかの所望の順序またはいずれかの所望の組み合わせにおいて、以下の工程iおよびiiを含む

i) 遺伝的に改変されていない対応する野生型の植物細胞と比較して、デンプン合成酵素IIの酵素活性を有するタンパク質の活性の増大に至る遺伝的改変の植物細胞中への導入、

ii) 遺伝的に改変されていない対応する野生型の植物細胞と比較して、グルカン-水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質の活性の増大に至る遺伝的改変の植物細胞中への導入、

b) 植物が、工程

i) a)i

ii) a)ii

iii) a)iおよびa)ii

に従った遺伝的改変を含む植物細胞から再生され、

c) 工程に従った植物の植物細胞において、

i) 工程a)iiに従った遺伝的改変b)i、

ii) 工程a)iに従った遺伝的改変b)ii

が導入され、および植物が再生され、

d) 場合により、さらなる植物が、工程b)iiiまたはc)iまたはc)iiの1つに従って得られる植物を用いて作出される。

【0092】

植物細胞中へ導入される遺伝的改変が、原理上、デンプン合成酵素IIの酵素活性を有するタンパク質の活性の増大に至るおよび/またはグルカン-水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質の活性の増大に至る改変のいずれかの種類である工程a)に従って、植物細胞中へ導入される遺伝的改変が求められる。

【0093】

本発明に従った方法の工程b)および場合により工程c)に従った植物の再生は、当業者に公知の方法に従って実施されることが可能である（例えば、“Plant Cell Culture Protocols”, 1999, edt. by R. D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2に記載）。

【0094】

本発明に従った方法の（工程c）または工程d）に従った方法に応じた）さらなる植物の作出は、例えば、（例えば、実生、塊茎によるまたはカルス培養および植物全体の再生による）無性繁殖によって、または有性繁殖によって実施されることが可能である。有性繁殖は好ましくは、本発明において、調節された様式で生じ、すなわち、特定の特性を有する選択された植物が、互いに交雑され、繁殖する。選択は好ましくは、（工程c）または工程d）に従った方法に従って作出される）さらなる植物は、上述の工程において導入される改変を含む。

【0095】

遺伝的に改変された植物の作出のための本発明に従った方法において、本発明にしたがって遺伝的に改変された植物細胞の作出のための遺伝的改変は、同時に又は互いに追随する工程において実施されることが可能である。本発明において、デンプン合成酵素IIの酵素活性を有するタンパク質の増大した活性に至る成功した遺伝的改変に関して、グルカン-水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質の増大した活性に至る遺伝的改変に関するものと同一の方法が使用されるかどうかは重要ではない。

【0096】

遺伝的に改変された植物の作出のための本発明に従った方法の好ましい実施態様において、方法の工程b)-1は、植物が、工程a)iに従ったデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する、および/または工程a)iiに従ったグルカン水

10

20

30

40

50

ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物が選択される工程 b) に追随する。選択された植物は次に、さらなる方法の工程のために使用される。

【 0 0 9 7 】

好ましくは、本発明において、工程 a) i に従った遺伝的改变を含有し、対応する遺伝的に改变されていない野生型植物と比較して、少なくとも 6 倍、好ましくは少なくとも 7 倍、特に好ましくは少なくとも 8 倍、特に好ましくは少なくとも 9 倍および非常に特に好ましくは少なくとも 10 倍増大するデンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質の活性の増大を有する植物が選択される。

【 0 0 9 8 】

好ましくは、本発明において、工程 a) ii に従った遺伝的改变を含有し、遺伝的に改变されていない野生型植物と比較して、少なくとも 4 倍、特に好ましくは少なくとも 5 倍、特に好ましくは少なくとも 6 倍増大するデンプンリン酸エステル含有量を有するデンプンを合成する植物が選択される。

【 0 0 9 9 】

遺伝的に改变された植物の作出のための本発明に従った方法のさらなる実施態様において、遺伝的改变は、植物細胞のゲノムへの少なくとも 1 つの外来核酸分子の導入からなり、外来核酸分子 / 核酸分子の存在または発現は、デンプン合成酵素 II の酵素活性を有するタンパク質の増大した活性および / または細胞中でのグルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質の増大した活性に至る。

【 0 1 0 0 】

遺伝的に改变された植物の作出のための本発明に従った方法のさらなる実施態様において、遺伝的改变は、植物細胞のゲノム中への少なくとも 1 つの外来核酸分子の導入からなり、外来核酸分子 / 核酸分子は、デンプン合成酵素 II の酵素活性を有するタンパク質および / またはグルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質をコードする配列を含む。

【 0 1 0 1 】

本発明に従った遺伝的に改变された植物の作出のための本発明に従った方法のさらなる実施態様において、少なくとも 1 つの外来核酸分子は、ジャガイモ、コムギ、コメ、トウモロコシ、ダイズ、柑橘類、ウコンまたはシロイヌナズナ由来のグルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質をコードする。好ましくは、少なくとも 1 つの外来核酸分子は、ウコンまたはジャガイモ由来の、特に好ましくはジャガイモ由来のグルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質、特に好ましくは、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列を有しました配列番号 5 で示される核酸配列によってコードされるタンパク質をコードする。上述の植物由来の核酸配列をコードし、グルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質に関する参照は、既に上述にさらに記載される。

【 0 1 0 2 】

本発明に従った遺伝的に改变された植物の作出のための本発明に従った方法のさらなる実施態様において、少なくとも 1 つの外来核酸分子は、オオムギ、エギロップス (Aegilops) 、コメ、トウモロコシ、マニオク、マメ、ジャガイモ、エンドウマメ、サツマイモ、シロイヌナズナ、タロイモ、オストレオコッカスまたはクラミドモナス由来のデンプン合成酵素 II の酵素活性を有するタンパク質をコードする。好ましくは、少なくとも 1 つの外来核酸分子は、コムギ由来のデンプン合成酵素 II の酵素活性を有するタンパク質をコードする。上述の植物由来のデンプン合成酵素 II の酵素活性を有する上述の核酸配列をコードするタンパク質に関する参照は、既に上述にさらに記載される。

【 0 1 0 3 】

遺伝的改变のために植物細胞または植物中に組み込まれる外来核酸分子に関して既に上述のように、遺伝的に改变された植物の作出のための本発明に従った方法の工程 a) は、個々の核酸分子または多くの核酸分子を包含し得る。したがって、デンプン合成酵素 II の酵素活性を有するタンパク質をコードしました配列はグルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質をコードする外来核酸分子は、一緒に単一の核酸分子に存在し得るか、又は

10

20

30

40

50

別個の核酸分子に存在し得る。デンプン合成酵素IIの酵素活性を有するタンパク質をコードしあるグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子が、別個の核酸分子に存在する場合、これらの核酸分子は、同時にまたは連続した工程において植物細胞中へと導入されることが可能である。

【0104】

さらに、本発明に従った方法の実施の間の外来核酸分子の導入に関して、野生型植物細胞または野生型植物の代わりに、デンプン合成酵素IIの酵素活性を有するタンパク質の増大した活性またはグルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質の増大した活性を既に有する点で区別される変異体細胞または変異体が使用されることが可能である。本発明に従った植物細胞または植物の作出のための変異体の使用に関するさらに上述の記述は、本発明において対応して使用されるべきである。10

【0105】

好ましい実施態様において、本発明は、遺伝的に改変された植物の作出のための本発明に従った方法に関するものであり、デンプン合成酵素IIの酵素活性を有するタンパク質をコードする核酸分子は、

- a) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸分子；
- b) アミノ酸配列が、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、優先的には少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、特に好ましくは少なくとも 95 % および最も好ましくは少なくとも 98 % を有するデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子；20
- c) 配列番号 5 で示される核酸配列または相補的な配列を含む核酸分子；
- d) c) で記載される核酸配列と少なくとも 70 %、優先的には少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、特に好ましくは少なくとも 95 % および最も好ましくは少なくとも 98 % の同一性を有する核酸分子；
- e) a) または c) で記載される核酸分子の少なくとも 1 本の鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；
- f) 遺伝暗号の縮重の理由で、ヌクレオチド配列が、a) または c) で記載される核酸分子の配列とは異なる核酸分子；
- g) a)、b)、c)、d)、e) または f) で記載される核酸分子の断片、対立遺伝子多型および / または誘導体である核酸分子；30
- h) 植物細胞において転写を開始する調節エレメント（プロモーター）へ、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列が連結される、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子または
- i) プロモーターが、組織特異的プロモーター、特に好ましくは、特に植物胚乳細胞における転写を開始するプロモーターである、h) に従った核酸分子からなる群より選択される。

【0106】

さらに好ましい実施態様において、本発明は、遺伝的に改変された植物の作出のための本発明に従った方法に関するものであり、グルカン - 水ジキナーゼの酵素活性を有するタンパク質をコードする核酸分子は、40

- a) 配列番号 2 または配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸分子；
- b) グルカン - 水ジキナーゼの活性を有し、配列が、配列番号 2 または配列番号 4 で示されるアミノ酸配列と少なくとも 70 %、優先的には少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、特に好ましくは少なくとも 95 % および最も好ましくは少なくとも 98 % の同一性を有するタンパク質をコードする核酸分子；
- c) 配列番号 1 または配列番号 3 で示される核酸配列または相補的な配列を含む核酸分子；
- d) c) で記載される核酸配列と少なくとも 70 %、優先的には少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、特に好ましくは少なくとも 95 % および最も好ましくは少な50

くとも 98 % の同一性を有する核酸分子；

e) a) または c) で記載される核酸分子の少なくとも 1 本の鎖とストリングエントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；

f) 遺伝暗号の縮重の理由で、ヌクレオチド配列が、 a) または c) で記載される核酸分子の配列とは異なる核酸分子；

g) a) 、 b) 、 c) 、 d) 、 e) または f) で記載される核酸分子の断片、対立遺伝子多型および / または誘導体である核酸分子；

h) 植物細胞において転写を開始する調節エレメント（プロモーター）へ、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列が連結される、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子または

10

i) プロモーターが、組織特異的プロモーター、特に好ましくは、特に植物胚乳細胞における転写を開始するプロモーターである、 h) に従った核酸分子からなる群より選択される。

【 0107 】

「同一性」という用語は、本発明と関連して、他のタンパク質 / 核酸と同一のアミノ酸 / ヌクレオチド（同一性）の数を意味するもの、 % で表現されるものとして理解されるべきである。好ましくは、コンピュータプログラムを利用して、他のタンパク質 / 核酸に対して、デンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質に関する同一性は、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列の比較によって決定され、デンプン合成酵素 II の活性を有するタンパク質をコードする核酸分子に関する同一性は、配列番号 5 で示される核酸配列の比較によって決定され、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質に関する同一性は、配列番号 2 または配列番号 4 で示されるアミノ酸配列の比較によって決定され、またはグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子に関する同一性は、配列番号 1 または配列番号 3 で示される核酸配列の比較によって決定される。互いに比較されている配列が、異なる長さを有する場合、同一性は、より短い配列がより長い配列と同様に有するアミノ酸 / ヌクレオチドの数が、同一性の % 比を決定するよう決定されるべきである。好ましくは、同一性は、公知であり公共に利用可能であるコンピュータプログラム ClustalW によって決定される（Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680）。ClustalW は、Julie Thompson (Thompson@EMBL.Heidelberg.DE) および Toby Gibson (Gibson@EMBL.Heidelberg.DE) 、European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany によって公共に利用可能にされている。ClustalW は、同様に多様なインターネットサイト、とりわけ IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B. P. 163, 67404 Illkirch Cedex, France; ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) および EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) および EBI のすべてのインターネットミラーサイト (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB 10 1SD, UK) でダウンロードされることが可能である。

20

【 0108 】

好ましくは、バージョン 1.8 の ClustalW コンピュータプログラムは、本発明の脈絡で記載されたタンパク質と、他のタンパク質との同一性を決定するために使用される。以下のパラメータが、本発明において設定されるべきである：KTUPLE=1、TOPDIAG=5、WINDOW=5、PAIRGAP=3、GAPOpen=10、GAPEXTEND=0.05、GAPDIST=8、MAXDIV=40、MATRIX=GONNET、ENDGAPS(OFF)、NOPGAP、NOHGAP。

30

【 0109 】

好ましくは、バージョン 1.8 の ClustalW コンピュータプログラムは、例えば、本発明の脈絡において記載される核酸分子のヌクレオチド配列と、他の核酸分子のヌクレオチド配列との間の同一性を決定するために使用される。以下のパラメータが、本発明において設定されるべきである：KTUPLE=2、TOPDIAGS=4、PAIRGAP=5、DNAMATRIX:IUB、GAPOpen=10、GAPEXT=5、MAXDIV=40、TRANSITIONS：非加重 (nnweight)。

40

【 0110 】

50

同一性はさらに、問題の核酸分子と前記核酸分子によってコードされるタンパク質との間に機能的および／または構造的同等性が存在することを意味する。上述の分子に相同意義であり、これらの分子の誘導体である核酸分子は通常、同一の生物学的機能を発揮する改変であるこれらの分子のバリエーションである。前記核酸分子は、本発明において、天然に生じるバリエーションであり、例えば他の種の配列であり、または変異が天然に生じ得、もしくは選択的変異誘発によって導入されることが可能であるこれらの変異であるいずれかであり得る。さらに、バリエーションは、合成的に調製された配列であり得る。対立遺伝子多型の場合、前記バリエーションは、天然に生じる変異形と、合成的に調製されもしくは組換えDNA技術によって作製される変異形との両者であり得る。誘導体の特別な形態は、例えば、遺伝暗号の縮重の理由で本発明の脈絡において記載される核酸分子とは異なる核酸分子である。

10

【0111】

本発明の脈絡において「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ゼーション条件下での、優先的にはSambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYにおいて記載されるストリンジエントな条件下でのハイブリダイゼーションを意味する。特に好ましくは、「ハイブリダイズすること」とは、以下の条件下でのハイブリダイゼーションを意味する：

ハイブリダイゼーション緩衝液：

2 × SSC ; 10 × Denhardt溶液 (Ficoll 400+PEG+BSA；比1：1：1) ; 0.1% SDS ; 5 mM EDTA ; 50 mM Na₂HPO₄ ; ニシン精子DNA 250 µg/mL ; tRNA 50 µg/mL ; または2.5Mリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.2 ; 1 mM EDTA ; 7% SDS

20

ハイブリダイゼーション温度：

T = 65 ~ 68

洗浄緩衝液：0.1 × SSC ; 0.1% SDS

洗浄温度：T = 65 ~ 68

【0112】

記載される分子とハイブリダイズする核酸分子は、例えば、ゲノムライブラリからまたはcDNAライブラリから単離されることが可能である。このような核酸分子の同定および単離は、本発明において、記載される核酸分子またはこれらの分子の部分またはこれらの分子の逆性相補体を使用して、例えば、標準的な方法に従ったハイブリダイゼーションによってまたはPCRによる增幅によって実施されることが可能である。

30

【0113】

デンプン合成酵素IIの活性を有したまたはグルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列の単離のためのハイブリダイゼーションプローブとして、例えば、配列番号5(デンプン合成酵素II)でまたは配列番号1もしくは配列番号3(グルカン・水ジキナーゼ)またはこれらの配列の部分で示されるヌクレオチド配列を実際に含有したまたは本質的に含有する核酸分子を使用することが可能である。ハイブリダイゼーションプローブとして使用される断片は、通例の合成技術を用いて作製され、および本発明の脈絡において記載される核酸分子のものと配列が本質的に一致する合成断片またはオリゴヌクレオチドであり得る。本発明の脈絡において記載される核酸分子とハイブリダイズする遺伝子が同定および単離された場合、この配列によってコードされるタンパク質の配列の決定および特性の分析は、前記遺伝子が、デンプン合成酵素IIの活性またはグルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質であるかどうかを決定するために、実施されるべきである。

40

【0114】

本発明の脈絡において記載される核酸分子とハイブリダイズする分子は特に、断片、誘導体および対立遺伝子多型を含む。本発明と関連して「誘導体」という用語は、これらの分子の配列が、1つ以上の位置で上述の核酸分子の配列とは異なり、およびこれらの配列

50

との同一性の高い程度を有することを意味する。本発明において、上述の核酸分子に対する差異は、例えば欠失、付加、置換、挿入または組換えによる結果、生じ得る。

【 0 1 1 5 】

デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質および／またはグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする本発明に従った核酸分子の発現のために、前記核酸分子は好ましくは、植物細胞における転写を保証する調節DNA配列へ連結される。これらは、特にプロモーターを含む。一般的に、植物細胞中で活性のあるいずれかのプロモーターが、発現に適している。

【 0 1 1 6 】

本発明において、プロモーターは、発現が、構成的に、または特定の組織中でのみ、植物の発達における特定の時間で、または外部の影響によって決定される時間で生じるよう選択されることが可能である。植物に関してプロモーターは、同種または異種であり、核酸分子に関してプロモーターは、相同意または非相同意であり得る。

【 0 1 1 7 】

適切なプロモーターは、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35S RNAのプロモーターおよびトウモロコシ由来のユビキチンプロモーター、コメ由来のアクチン1遺伝子のプロモーター (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2(2), 163-171)、構成的発現のためのトウモロコシ由来のヒストンプロモーター (WO 99 34005)、ジャガイモにおける塊茎特異的発現のためのパタティング (Patatingen) プロモーター B 3 3 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) または光合成的に活性のある組織においてのみ発現を確実にするプロモーター、例えば ST - L S 1 プロモーター (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947, Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-2451) または胚乳特異的発現のためのコムギ由来のHMGプロモーター、USPプロモーター、ファゼオリンプロモーター、トウモロコシ由来のゼイン遺伝子のプロモーター (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026, Quattroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93)、グルテリンプロモーター (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50, Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366, Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218)、グロブリンプロモーター (Nakase et al., 1996, Gene 170(2), 223-226)、プロラミンプロモーター (Qu and Takaiwa, 2004, Plant Biotechnology Journal 2(2), 113-125) またはシュルンケン1プロモーター (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380) である。しかしながら、外部の影響によって決定される時間でのみ活性化されるプロモーターも使用されることが可能である（例えば、WO 93 07279 参照）。単純な誘導が可能である熱ショックタンパク質のプロモーターも関心対象であり得る。さらに、種子特異的プロモーター、例えば、ソラマメおよび他の植物における種子特異的発現を保証するソラマメ由来のUSPプロモーター等も使用されることが可能である (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679, Baumlein et al., Mol. Genet. 225 (1991), 459-467)。

【 0 1 1 8 】

さらに、転写産物へのポリAテイルの付加のために機能する終止配列（ポリアデニル化シグナル）が存在し得る。ポリAテイルは、転写産物の安定化に機能する。このようなエレメントは、文献 (Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29 参照) 中に記載されており、適宜置換可能である。

【 0 1 1 9 】

プロモーターとコード領域との間のイントロン配列も存在し得る。この種のイントロン配列は、植物における発現の安定性および増大した発現を導く (Callis et al., 1987 Genes Devel. 1, 1183-1200, Luehrs and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93, Rethmeier et al., 1997; Plant Journal. 12(4): 895-899, Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542, Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579, Xu et al., 2003, Science in China Series C Vol. 46 No. 6, 561-569)。適切なイントロン配列は、例えば、トウモロコシ由来の sh1 遺伝子の第一のイントロン、ト

10

20

30

40

50

ウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子 1 の第一のイントロン、コメ由来のEPSPS遺伝子の第一のイントロン、コメ由来のアクチン 1 遺伝子の第一のイントロン (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2(2), 163-171) またはシロイヌナズナ由来の P A T 1 遺伝子の 2 つの第一のイントロンの 1 つである。

【 0 1 2 0 】

本発明のさらなる実施態様は、本発明に従った遺伝的に改変された植物の作出のための方法に関するものであり、

a) 植物細胞は、遺伝的に改変され、遺伝的改変は、遺伝的に改変されていない対応する野生型の植物細胞と比較して、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の増大を導き；

b) 植物が、工程 a) の植物細胞から再生され；

c) 場合により、工程 b) に従った植物を用いてさらなる植物が作出されおよび

d) 工程 b) または c) に従って得られた植物が、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞と比較して、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性の増大を有する植物と交雑される。

【 0 1 2 1 】

本発明のさらなる実施態様は、本発明に従った遺伝的に改変された植物の作出のための方法に関するものであり、

a) 植物細胞は、遺伝的に改変され、遺伝的改変は、遺伝的に改変されていない対応する野生型の植物細胞と比較して、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の酵素活性の増大を導き；

b) 植物が、工程 a) の植物細胞から再生され；

c) 場合により、工程 b) に従った植物を用いてさらなる植物が作出されおよび

d) 工程 b) または c) に従って得られた植物が、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞と比較して、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の酵素活性の増大を有する植物と交雫される。

【 0 1 2 2 】

遺伝的に改変された植物の作出のための最後に記載された 2 つの方法において、工程 a) は、既に上述のように遺伝的に改変されることが可能である。工程 b) に従った植物の再生および工程 c) に従ったさらなる植物の作出は同様に、さらに上述に既に示された。

【 0 1 2 3 】

最後に記載された 2 つの実施態様の工程 d) に従って、工程 b) または c) から得られた植物または植物の子孫と交雫する植物は、対応する野生型植物と比較して、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性またはグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有するいずれかの植物であり得る。本発明において、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質のまたはグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の活性の増大は、対応する植物における問題のタンパク質の活性の増大に至るいずれかの改変によって生じることが可能である。これらの植物は、遺伝子工学方法によって改変された変異体または植物であり得る。変異体は、自発的に（天然に）発生する変異体と、突然変異原の選択的使用（例えば、化学薬品、電離放射線など）または遺伝子工学方法（例えば、トランスポゾン活性化タグ付け、T - D N A 活性化タグ付け、インビオ変異誘発）によって作出された変異体との両者であり得る。好ましくは、遺伝子工学方法によって作出された植物は、挿入変異誘発によって作製された変異体、特に好ましくは、外来核酸分子を発現する遺伝的に改変された植物、特に好ましくは、外来核酸分子が、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質またはグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする遺伝的に改変された植物である。

【 0 1 2 4 】

好ましくは、本発明に従った最後に記載された 2 つの方法における交雫のために、対応する遺伝的に改変されていない野生型植物と比較して、少なくとも 6 倍、好ましくは少なくとも 7 倍、特に好ましくは少なくとも 8 倍、特に好ましくは少なくとも 9 倍および非常

10

20

30

40

50

に特に好ましくは少なくとも 10 倍ほど増大するデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性を有する植物が使用される。

【 0 1 2 5 】

グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物について、本発明に従った最後に記載された 2 つの方法における交雑のために、対応する遺伝的に改変されていない野生型植物と比較して少なくとも 4 倍、特に好ましくは少なくとも 5 倍、特に好ましくは少なくとも 6 倍増大するデンプンリン酸エステル含有量を有するデンプンを合成する植物が好ましくは使用される。

【 0 1 2 6 】

好ましい実施態様において、遺伝的に改変された植物の作出のための本発明に従った方法は、本発明に従った植物のまたは本発明に従った植物の特性を有する植物の作出のために使用される。 10

【 0 1 2 7 】

本発明は、本発明に従った方法によって得られることのできる植物にも関する。

【 0 1 2 8 】

デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性およびグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する、本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物が、改変されたデンプンを合成することが驚くべきことに発見された。特に、本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物によって合成されるデンプンが、増大した熱湯膨潤力を有するという事実は驚くべきことであった。本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物から単離可能なデンプンの増大した熱湯膨潤力は、特定の適用について従来のデンプンよりも良好に適する特性をデンプンに付与する。デンプンが、例えば増粘剤として採用される場合、デンプンの増大した熱湯膨潤力は、同一の増粘力に到達するために使用されなければならないデンプンのはっきりとした減少を導く。このことは、例えば、デンプンで増粘された食物のカロリー含有量が低下する結果を有する。 20

【 0 1 2 9 】

本発明のさらなる対象は、増大した熱湯膨潤力を有する改変されたデンプンに関する。特に好ましくは、本発明に従った改変されたデンプンの熱湯膨潤力は、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞から単離されたまたは遺伝的に改変されていない対応する野生型植物から単離されたデンプンと比較して、少なくとも係数 2 ほど、特に少なくとも係数 3 ほどおよび非常に特に好ましくは少なくとも係数 4 ほど増大する。 30

【 0 1 3 0 】

熱湯膨潤力の測定のための方法は、当業者に公知であり、文献（例えば、Leach et al., 1959, Cereal Chemistry 36, 534-544）中に記載される。好ましくは本発明と関連して、熱湯膨潤力の測定のために使用される方法は、一般的な方法の第 1 項に記載される。

【 0 1 3 1 】

好ましくは、本発明は、少なくとも 110 g/g、好ましくは少なくとも 115 g/g、特に好ましくは少なくとも 120 g/g および特に好ましくは少なくとも 125 g/g の熱湯膨潤力を有する改変されたデンプンに関する。好ましくは、改変されたデンプンは、せいぜい 350 g/g、特に好ましくはせいぜい 300 g/g、特に好ましくはせいぜい 250 g/g および特に好ましくはせいぜい 200 g/g の熱湯膨潤力を有する。 40

【 0 1 3 2 】

本発明のさらなる対象は、単子葉植物細胞からまたは単子葉植物から単離される改変されたデンプンに関するものであり、少なくとも 60 g/g、好ましくは少なくとも 75 g/g、特に好ましくは少なくとも 90 g/g、特に好ましくは少なくとも 105 g/g および特に好ましくは少なくとも 120 g/g の熱湯膨潤力を有する。好ましくは、単子葉植物細胞または単子葉植物から単離される改変されたデンプンは、せいぜい 250 g/g、特に好ましくはせいぜい 200 g/g、特に好ましくはせいぜい 175 g/g および特に好ましくはせいぜい 150 g/g の熱湯膨潤力を有する。 50

【0133】

本発明のさらなる対象は、コメ植物細胞またはコメ植物から単離される改変されたデンプンに関するものであり、少なくとも65g/g、好ましくは少なくとも80g/g、特に好ましくは少なくとも100g/g、特に好ましくは少なくとも115g/gおよび特に好ましくは少なくとも125g/gの熱湯膨潤力を有する。好ましくは、コメ植物細胞またはコメ植物から単離される改変されたデンプンは、せいぜい1250g/g、特に好ましくはせいぜい200g/g、特に好ましくはせいぜい175g/gおよび特に好ましくはせいぜい150g/gの熱湯膨潤力を有する。

【0134】

本発明のさらなる好ましい対象は、トウモロコシ植物細胞またはトウモロコシ植物から単離される改変されたデンプンに関するものであり、少なくとも40g/g、好ましくは少なくとも42g/g、より好ましくは少なくとも45g/gおよび最も好ましくは少なくとも55g/gの熱湯膨潤力を有する。

10

【0135】

本発明のさらに好ましい対象は、コムギ植物細胞またはコムギ植物から単離される改変されたデンプンに関するものであり、少なくとも35g/g、好ましくは少なくとも50g/gの熱湯膨潤力を有する。

【0136】

本発明に従った遺伝的に改変された植物細胞または本発明に従った遺伝的に改変された植物から合成されるデンプンは好ましくは、増大したデンプンリン酸エステル含有量を有する。本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物から単離されるデンプンのデンプンリン酸エステル含有量は、本発明において、問題の親植物のリン酸含有量の合計から、交雑後に期待されるであろうデンプンリン酸エステル含有量よりもはっきりと高い。

20

【0137】

したがって、本発明の好ましい対象は、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞または遺伝的に改変されていない対応する野生型植物から単離されるデンプンと比較して、増大したデンプンリン酸エステル含有量を有する本発明に従った改変されたデンプンに関する。好ましくは、本発明に従ったデンプンのデンプンリン酸エステル含有量は、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物細胞から単離されたまたは遺伝的に改変されていない対応する野生型植物から単離されたデンプンと比較して、少なくとも10倍、特に好ましくは少なくとも15倍、特に好ましくは少なくとも20倍および非常に特に好ましくは少なくとも25倍増大する。

30

【0138】

好ましくは、本発明に従った改変されたデンプンは、対応する野生型植物細胞から単離されたまたは対応する野生型植物から単離されたデンプンよりもデンプンのグルコース分子のC6位において少なくとも10倍以上、特に好ましくは少なくとも15倍以上、特に好ましくは少なくとも20倍以上および非常に特に好ましくは少なくとも25倍以上のデンプンリン酸エステルを有する。

【0139】

グルコース分子のC6位において結合したデンプンリン酸エステルの量は、例えば、結合した酵素的検査による分光法で、またはKasemusuwan and Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707)において記載される方法に従った³¹P-NMRによってなど、当業者に公知の方法を使用して測定されることが可能である。好ましくは、本発明と関連して、グルコース分子のC6位において結合したデンプンリン酸エステルの量は、一般的な方法の第2項に記載される方法を使用して測定される。

40

【0140】

本発明のさらに好ましい対象は、本発明に従って改変されたデンプンに関するものであり、单子葉植物細胞からまたは单子葉植物から単離され、デンプン1mgあたり少なくとも11nmolの、特に好ましくはデンプン1mgあたり少なくとも12nmolの、デンプンのグルコース分子のC6位において結合したデンプンリン酸エステル含有量を有する。特に、本

50

発明に従ったこの改変されたデンプンは、好ましくはトウモロコシ、コメまたはコムギのデンプンである。

【0141】

本発明のさらなる実施態様において、本発明に従って改変されたデンプンは、未変性デンプンである。

【0142】

本発明と関連して、「未変性デンプン」という用語は、デンプンが、本発明に従った植物、本発明に従った収穫可能な植物の部分、本発明に従ったデンプン保存部分または本発明に従った植物の繁殖材料から、当業者に公知の方法に従って単離されることを意味する。

10

【0143】

本発明は、本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物から、本発明に従った繁殖材料からまたは本発明に従った収穫可能な植物の部分から得られることの可能な、または遺伝的に改変された植物の作出のために本発明に従った方法を使用して作出された植物から得られることの可能な本発明に従った改変されたデンプンにも関する。

【0144】

本発明は、本発明に従った改変されたデンプンを合成する植物細胞または植物にも関する。

【0145】

本発明はさらに、本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物から、このタイプの植物の本発明に従った繁殖材料からおよび／または本発明に従ったこのような植物の収穫可能な植物の部分から、好ましくは本発明に従ったこのような植物のデンプン貯蔵部分からデンプンを抽出する工程を含む、改変されたデンプンの製造のための方法に関する。好ましくは、このタイプの方法は、デンプンの抽出前に栽培された植物または植物の部分のおよび／またはこれらの植物の繁殖材料の収穫の工程も含み、特に好ましくは、収穫前に本発明に従った植物の栽培の工程をさらに含む。

20

【0146】

植物からのまたは植物のデンプン貯蔵部分からのデンプンの抽出のための方法は、当業者に公知である。さらに、多様なデンプン貯蔵植物からデンプンを抽出するための方法が、例えば、Starch: Chemistry and Technology (ed.: Whistler, BeMiller and Paschall (1994), 2nd edition, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; 例えは、chapter XII, page 412-468: Corn and Sorghum Starches: Production; by Watson; chapter XIII, page 469-479: Tapioca, Arrowroot and Sago Starches: Production; by Corbishley and Miller; chapter XIV, page 479-490; Potato Starch: Production and Uses; by Mitch; chapter XV, page 491 to 506; Wheat Starch: Production, Modification and Uses; by Knight and Oson; and chapter XVI, page 507 to 528: Rice Starch: Production and Uses; by Rohmer and Klem; Corn Starch: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57参照。産業規模のトウモロコシデンプンの抽出は、「湿式粉碎」によって通常達成される)に記載されている。植物材料からデンプンを抽出するための方法において通常使用される装置は、分離装置、デカンター、ハイドロサイクロン、スプレー乾燥機、流動層乾燥機である。

30

【0147】

「デンプン貯蔵部分」という用語は、本発明と関連して、デンプンが、一過性の葉のデンプンとは異なり、より長期の多年生育のための貯蔵所として貯蔵される植物のデンプン貯蔵部分を意味するものとして理解されるべきである。好ましいデンプン貯蔵植物部分は例えば、塊茎、貯蔵根および子実であり、胚乳を含む子実は、特に好ましく、トウモロコシ、コメまたはコムギの植物由来の胚乳を含む子実は、特に好ましい。

【0148】

好ましい実施態様において、改変されたデンプンの製造のための本発明に従った方法は、本発明に従ったデンプンの製造のために使用される。

40

50

【 0 1 4 9 】

同様に、本発明は、改変されたデンプンの製造のための本発明に従った方法によって得られることの可能な改変されたデンプンに関する。

【 0 1 5 0 】

本発明はさらに、改変されたデンプンの製造のための本発明に従った植物細胞または本発明に従った植物の使用に関する。

【 0 1 5 1 】

デンプンの特性が、例えば温熱性の、化学的、酵素的または機械的誘導体化によって変化することが可能であることは、当業者に公知である。誘導体化されたデンプンは、食品および／または非食品領域における多様な応用に特に適している。本発明に従ったデンプンは、例えばデンプンリン酸エステルのより高い含有量により、反応性機能基のより高い含有量を有するので、誘導体化されたデンプンの製造のための出発物質として、従来のデンプンよりも良好に適している。さらに、誘導体化は、本発明に従ったデンプンの増大した熱湯膨潤力の理由で、この最中にデンプン顆粒構造を有意に破壊することなく、より高温で実施されることが可能である。10

【 0 1 5 2 】

したがって、本発明は、本発明に従った改変されたデンプンが、その後誘導体化される、誘導体化されたデンプンの製造のための方法にも関する。

【 0 1 5 3 】

「誘導体化されたデンプン」という用語は、本発明と関連して、植物細胞からの単離後の特性が、化学的、酵素的、温熱性のまたは機械的方法を用いて変化した、本発明に従った改変されたデンプンを意味するものとして理解されるべきである。20

【 0 1 5 4 】

本発明のさらなる実施態様において、本発明に従った誘導体化されたデンプンとは、熱および／または酸で処理されたデンプンである。

【 0 1 5 5 】

さらなる実施態様において、誘導体化されたデンプンとは、デンプンエーテルであり、特にデンプンアルキルエーテル、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、窒素含有デンプンエーテル、リン酸含有デンプンエーテルまたは硫黄含有デンプンエーテルである。30

【 0 1 5 6 】

さらなる実施態様において、誘導体化されたデンプンとは、架橋されたデンプンである。。

【 0 1 5 7 】

さらなる実施態様において、誘導体化されたデンプンとは、デンプングラフトポリマーである。

【 0 1 5 8 】

さらなる実施態様において、誘導体化されたデンプンとは、酸化されたデンプンである。。

【 0 1 5 9 】

さらなる実施態様において、誘導体化されたデンプンとは、デンプンエステルであり、特に、有機酸を使用してデンプンへと導入されたデンプンエステルである。誘導体化されたデンプンとは、特に好ましくは「リン酸エステル」、「硝酸エステル」、「硫酸エステル」、「キサントゲン酸エステル」、「酢酸エステル」または「クエン酸エステル」デンプンである。40

【 0 1 6 0 】

本発明に従った誘導体化されたデンプンは、医薬産業においてならびに食品および／または非食品分野において多様な用途に適している。本発明に従った誘導体化されたデンプンの製造のための方法は、当業者に公知であり、一般的な文献において適切に記載されている。誘導体化されたデンプンの製造の要約は、例えば、Orthoefer (Corn, Chemistry a50

nd Technology, 1987, eds. Watson and Ramstad, chapter 16, 479-499)において見出される。

【0161】

同様に、本発明は、誘導体化されたデンプンの製造のための本発明に従った方法によって得られることの可能な誘導体化されたデンプンに関する。

【0162】

本発明はさらに、誘導体化されたデンプンの製造のための本発明に従った改变されたデンプンの使用に関する。

【0163】

植物のデンプン貯蔵部分はしばしば、粉末を生じるために加工される。粉末が製造されることの可能な植物の部分の例は、例えば、ジャガイモ植物由来の塊茎および子実植物由来の子実である。子実植物由来の粉末の製造のために、これらの植物の胚乳含有子実が、すりつぶされおよび篩過される。デンプンは、胚乳の主要構成体である。しかし、胚乳を含有しないが、例えば塊茎または根等の他のデンプン貯蔵部分を含有する他の植物において、粉末はしばしば、問題の貯蔵器官の粉碎、乾燥およびその後のすりつぶしによって製造される。胚乳のデンプンまたは植物のデンプン貯蔵部分中に含有されるデンプンは、問題の植物の部分から製造される粉末の本質的な部分である。したがって、粉末の特性は、問題の粉末中に存在するデンプンによって影響される。本発明に従った植物細胞および本発明に従った植物は、対応する遺伝的に変更されていない野生型植物細胞または遺伝的に変更されていない野生型植物と比較して、変化したデンプンを合成する。それゆえ、本発明に従った植物細胞、本発明に従った植物、本発明に従った繁殖材料または本発明に従った収穫可能な部分は、変化した特性を有する。粉末の特性は、デンプンを粉末と混合することによってまたは異なる特性を有する粉末を混合することによっても影響され得る。10

【0164】

したがって、本発明のさらなる対象は、本発明に従ったデンプンを含む粉末に関する。

【0165】

本発明のさらなる対象は、本発明に従った植物細胞、本発明に従った植物、本発明に従った植物のデンプン貯蔵部分から、本発明に従った繁殖材料からまたは本発明に従った収穫可能な植物の部分から製造されることが可能である粉末に関する。粉末の製造のための本発明に従った植物の好ましいデンプン貯蔵部分は、塊茎、貯蔵根および胚乳を含有する子実である。本発明と関連して、(系統的な)イネ科の植物由来の子実は、特に好ましく、トウモロコシ、コメまたはコムギの植物由来の子実は、特に好ましい。30

【0166】

「粉末」という用語は、本発明と関連して、植物の部分をすりつぶすことによって得られる粉末を意味するものとして理解されるべきである。場合により、植物の部分は、すりつぶす前に乾燥され、すりつぶした後に粉碎されおよび/または篩過される。

【0167】

本発明に従った粉末は、前記粉末中に存在する本発明に従ったデンプンをベースとして、前記粉末が、変化したリン酸含有量および/または増大した熱湯膨潤力を有するという事実によって区別される。このことは、例えば、多くの応用のための食品産業における粉末の加工において、特に焼き上げられた製品の製造において望まれる。40

【0168】

本発明の好ましい対象は、単子葉植物の子実から製造される粉末に関するものであり、少なくとも2.8g/g、好ましくは少なくとも3.3g/g、特に好ましくは少なくとも3.8g/gおよび特に好ましくは少なくとも4.3g/gの熱湯膨潤力を有する。

【0169】

粉末の熱湯膨潤力の測定は、本発明において、デンプンの熱湯膨潤力の測定に関して既に記載されている方法と同様に実施され、本発明において穀粉がデンプンの代わりに使用されるという違いを伴う。粉末の熱湯膨潤力の測定についての好ましい方法は、一般的な方法の第1項に記載される。50

【0170】

本発明のさらなる対象は、本発明に従った植物細胞、本発明に従った植物、本発明に従った植物の部分、本発明に従った植物のデンプン貯蔵部分、本発明に従った繁殖材料または本発明に従った収穫可能な材料のすりつぶしの工程を含む、粉末の製造のための方法である。

【0171】

粉末は、本発明に従った植物のデンプン貯蔵部分をすりつぶすことによって製造されることが可能である。粉末を製造する方法は、当業者に公知である。好ましくは、粉末の製造のための方法は、すりつぶす前に、栽培された植物または植物の部分および／または繁殖材料またはこれらの植物のデンプン貯蔵部分を収穫する工程も含み、特に好ましくは、収穫前の本発明に従った植物の栽培の工程をさらに含む。10

【0172】

本発明のさらなる実施態様において、粉末の製造のための方法は、本発明に従った植物の、本発明に従った植物のデンプン貯蔵部分の、本発明に従った繁殖材料のまたは本発明に従った収穫可能な材料のすりつぶす前の加工を含む。

【0173】

本発明において、前記加工は例えば、熱処理および／または乾燥であり得る。熱処理後の熱処理された材料の乾燥は、例えば、すりつぶしが実施される前の例えばジャガイモ塊茎等の貯蔵根または塊茎からの粉末の製造において使用される。本発明に従った植物の、本発明に従った植物のデンプン貯蔵部分の、本発明に従った繁殖材料の、または本発明に従った収穫可能な材料のすりつぶし前の粉碎は同様に、本発明の意図内での加工であり得る。すりつぶし前の植物組織の除去、例えば子実からの糊殻などの除去も、本発明の意図内でのすりつぶし前の加工である。20

【0174】

本発明のさらなる実施態様において、粉末の製造のための加工は、すりつぶし後の製粉用穀物の加工を含む。

【0175】

本発明において、製粉用穀物は、例えば粉末の多様な種類を製造するために、例えばすりつぶし後に篩過されることが可能である。

【0176】

本発明のさらなる対象は、本発明に従った遺伝的に変更された植物の部分、本発明に従った植物、本発明に従った植物の部分、本発明に従った植物のデンプン貯蔵部分、本発明に従った繁殖材料または本発明に従った収穫可能な材料の、粉末の製造のための使用である。30

【0177】**配列の記載**

配列番号1：ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) 由来のグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列。

配列番号2：ジャガイモ由来のグルカン - 水ジキナーゼの活性を有する配列番号1によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列。40

配列番号3：ウコン (*Curcuma longa*) 由来のグルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列。

配列番号4：ウコン由来のグルカン - 水ジキナーゼの活性を有する配列番号3によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列。

配列番号5：コムギ (*Triticum aestivum*) 由来のデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸配列。

配列番号6：コムギ由来のデンプン合成酵素IIの活性を有する配列番号3によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列。

【図面の簡単な説明】**【0178】**

10

20

30

40

50

【図1】図1は、野生型と比較したデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の測定のための酵素電気泳動像を示す。野生型植物(WT)の未成熟な(開花開始15日後)子実のタンパク質全体の抽出物および発現ベクターAH32-191を使用するトランスフォーメーションから互いに独立して生じる遺伝的に改変された3つの植物(oe-SSII-O.s.-5、oe-SSII-O.s.-12、oe-SSII-O.s.-19)のタンパク質全体の抽出物を使用した。WTおよびpur(非希釈)のトラックにおいて、個々の抽出物のタンパク質の等量を各場合において適用する。遺伝的に改変された植物のタンパク質抽出物を連続希釈し(1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、1:20または1:100)、これらの希釈物を同様に、電気泳動で互いに分離した。野生型植物由来のタンパク質抽出物のルゴール溶液による染色後の酵素電気泳動像中に存在するデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質によって改変される特異的産物の強度(矢印によって標識)を、問題の遺伝的に変化した植物由来のタンパク質抽出物のバンドの強度と比較することによって、野生型植物と比較したデンプン合成酵素IIの活性の増大が測定されることが可能である。等価の強度は、本発明において、等価の活性を意味する。

【図2】図2は、遺伝的に改変されていない野生型植物(WT)と比較して、コメ系oe-SSII-O.s.-19、oe-SSII-O.s.-20、oe-SSII-O.s.-21、oe-SSII-O.s.-22、oe-SSII-O.s.-23の未成熟のT1種子のノザンプロット分析のオートラジオグラムを示す。このために、発現ベクターAH32-191を使用するトランスフォーメーションとは独立して生じた系の各場合において3個の種子からRNAを抽出し、一般的な方法の第8項に記載される方法に従って分析した。コムギ由来のデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする標識された核酸プローブを使用してハイブリダイズしたバンドをSSIIによって印付ける。

【図3】図3は、ルゴール溶液で染色した後の、遺伝的に改変されていない野生型植物(WT)の種子と比較したコメ系oe-SSII-O.s.-8、oe-SSII-O.s.-19、oe-SSII-O.s.-23の未成熟なT1種子のタンパク質抽出物の酵素電気泳動像を示す。系あたり2つ(oe-SSII-O.s.-8)または3つ(oe-SSII-O.s.-19、oe-SSII-O.s.-23)の異なる子実のタンパク質抽出物を分析した。本発明において、一般的な方法の第9項に記載される方法に従って、酵素電気泳動像による分析を実施した。デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質に特異的な酵素電気泳動像におけるバンドをSSIIにより印付ける。

【図4】図4は、プラスミドpJH77のマップを示す。

【図5】図5は、野生型植物(WT)の未成熟なトウモロコシカーネル由来のおよびデンプン合成酵素II(SS2)の活性を有するタンパク質の増大した活性を有するトランスジェニック系(TG)由来のタンパク質抽出物の酵素電気泳動像を示す。示されているのは、提供されたタンパク質量である。

【図6】図6は、プラスミドpHN3のマップを示す。

【0179】

一般的な方法

本発明に従った方法を実施するために使用されることが可能である方法が、以下に記載されている。これらの方法は、本発明の実際の実施態様であるが、これらの方法に本発明を制限するわけではない。記載されている方法の改変によって、および/または方法の個々の部分を方法の代替的な部分によって置換することによって、同一の様式で本発明を実施することが可能であることは、当業者に公知である。引用されるすべての刊行物の内容は、参照により本願の明細書中にさらに含まれる。

【0180】

1. 熱湯膨潤力(SP)の測定

試料(デンプンまたは粉末)100mgを水6mL中に懸濁した後、92.5で20分間膨潤させる。92.5での試料のインキュベーション中に試料の容器を360°注意深く回転させることによって、(最初の2分間連続して、3、4、5、10、15または25分後に)懸濁液を繰り返し混合する。92.5での合計30分間のインキュベーションの後、懸濁液を氷水中で約1分間冷却した後、25で5分間のインキュベーションを実施する。遠心分離(室温、1000×g、15分間)後、得られた上清をゼラチン状沈

10

20

30

40

50

降物から注意深く引き抜き、沈降物の重量を測定する。熱湯膨潤力を、次式に従って算出する：

$S P = (\text{ゼラチン状沈降物の重量}) / ((\text{粉末またはデンプン}) \text{ 中で秤量された試料の重量})$

【0181】

2. デンプンリン酸エステルの含有量の測定

a) グルコース分子のC6位におけるリン酸含有量の測定

デンプン中で、グルコース単位のC2、C3およびC6の位置が、リン酸化可能である。
(Nielsen et al., 1994, Plant Physiol. 105: 111-117に従った改変された) デンプンのまたは粉末のC6P含有量の測定のために、コメ/トウモロコシ粉末またはコメ/トウモロコシデンプン50mgを0.7M HCl 500μL中で95℃で4時間、連続振盪しながら加水分解した。その後、バッヂを15,500 rpmで10分間遠心分離し、懸濁された物質および濁度から、フィルターメンブレン(0.45μM)によって上清を精製した。透明な加水分解産物20μLをイミダゾール緩衝液180μL(300mMイミダゾール、pH 7.4; 7.5mM MgCl₂、1mM EDTAおよび0.4mM NADP)と混合し、光度計で試料を340nmで測定した。基礎吸収測定後、グルコース6リン酸脱水素酵素(ロイコノストク・メセンテロイデス(Leuconostoc mesenteroides)由来、Boehringer Mannheim)各2単位を添加することによって、酵素反応を開始した。測定された変化(OD)は、6-ホスホグルコナートおよびNADPHを生じるためのグルコース6リン酸およびNADPの等モル反応をベースとしており、NADPHの形成は、上述の波長で測定される。終点に到達するまで、反応をモニターした。加水分解産物中のグルコース6リン酸の含有量は、この測定の結果から算出されることが可能である：

【0182】

【数1】

$$\text{FW1mgあたりのグルコース6リン酸のnmol} = \frac{\text{OD} \times \text{測定された容積 (200 μl)}}{\frac{\times \text{加水分解産物の容積 (500 μl)}}{\text{励起係数}} \times \frac{\times \text{測定された試料の容積 (20 μl)}}{\times \text{秤量された試料のmg (50 mg)}}$$

10

20

30

30

【0183】

秤量された材料(粉末またはデンプン)中のデンプンの不完全な加水分解による誤った結果を得ないために、その後、加水分解の程度を測定した。このために、グルコース6リン酸について測定された個々の加水分解産物から加水分解産物10μLを採取し、0.7M NaOH 10μLで中和し、水で2mLの最終容積にし、水で1:100に希釈した。この希釈液4μLを測定緩衝液(100mMイミダゾールpH 6.9; 5mM MgCl₂、1mM ATP、0.4mM NADP)196μLで処理し、グルコース含有量の光度計による測定のために使用した。340nmでの基礎吸収の測定後、酵素混合物(測定緩衝液中のヘキソキナーゼ1:10; 酵母由来のグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ1:10)2μLの添加によって、終点に到達するまで光度計(340nm)で反応をモニターした。測定原理は、第一の反応に相当する。得られた測定結果から、グルコースの量を個々の試料について算出することが可能である：

【0184】

40

【数2】

$$FW1gあたりのグルコースのmmol = \frac{OD \times \text{測定された容積} (200 \mu\text{l})}{\frac{\times \text{加水分解産物の容積} (500 \mu\text{l})}{\frac{\times \text{希釀液の容積全体} (2 \text{ ml})}{\text{励起係数}}}} \\ \times \frac{\times \text{測定された試料の容積} (20 \mu\text{l})}{\frac{\times \text{希釀のために使用される容積} (10 \mu\text{l})}{\times \text{秤量された試料のmg} (50 \text{ mg})}}$$

10

【0185】

検出された個々の試料のグルコースの量は、本発明において、C6リン酸測定のために利用可能なデンプンの比に対応する。簡素化のため、グルコース含有量は、さらなる計算においてデンプン含有量に変換される。

【0186】

【数3】

$$\text{デンプン含有量 (\%)} = \frac{\text{グルコース含有量 (mmol g FW)} \times \text{デンプン中のグルコースの分子量 (162 g/mol)}}{\frac{\times \text{変換係数 (\% = 100)}}{\text{変換係数 (mmolからmolへ = 1000)}}}$$

20

【0187】

その後、加水分解されたデンプン 1 mgあたりのグルコース 6 リン酸の含有量を表すために、グルコース 6 リン酸の測定結果を、対応する試料のデンプン含有量と関連付ける：

【0188】

【数4】

$$\text{デンプン1mgあたりのグルコース6リン酸のnmol} = \frac{\text{秤量された試料1mgあたりのグルコース 6リン酸のnmol} \times 100}{\frac{\text{デンプン含有量(秤量された試料100mgあたりのデンプンのmg)}}{}}$$

30

【0189】

この計算様式によって、試料（粉末またはデンプン）の秤量された重量におけるグルコース 6 リン酸の量に関する以外に、グルコース 6 リン酸の量を、グルコースへ完全に加水分解されたデンプンの部分と関連付けるのみである。

【0190】

b) リン酸全体の含有量に関する測定

Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118) の方法に従って、リン酸全体の含有量の測定を実施した。

【0191】

デンプン約 50 mgを硝酸マグネシウム-エタノール溶液 30 μLで処理し、マッフル炉中で混合物を 500 で 3 時間焼却処分する。残留物を 0.5 M HCl 1300 μLで処理し、60 で 30 分間インキュベートする。その後、一定分量を 0.5 M HCl で 300 μLにし、2 M 硫酸中の 10 %強度のアスコルビン酸 100 μLと 0.42 %モリブデン酸アンモニウム 600 μLとの混合物へ添加し、45 で 20 分間インキュベートする。

【0192】

3. コメ植物のトランスフォーメーション

Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) によって記載された方法に従って

40

50

、コメ植物をトランスフォームした。

【0193】

4 . コムギ植物のトランスフォーメーション

Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) によって記載された方法に従って、コムギ植物をトランスフォームした。

【0194】

5 . トウモロコシ植物のトランスフォーメーション

A188系のトウモロコシ植物の未成熟な胚を、Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) によって記載された方法に従ってトランスフォームした。

【0195】

6 . コメ子実の加工およびコメ粉末の製造

研究材料の適切な量の製造のために、温室内でコメ植物を栽培し、完全な成熟度に到達した後、収穫した。さらなる乾燥のために、成熟したコメ子実を37℃で3~7日間貯蔵した。その後、デハスカー (Laboratory Paddy sheller, Grainman, Miami, Florida, USA) によって外皮から子実を取り出し、得られた褐色のコメを1分間研磨することによって加工し (Pearlest Rice Polisher, Kett, Villa Park, CA, USA) 、白色のコメを付与した。子実の組成およびデンプンの特性の研究のために、実験用ミル (Cyclotec, Sample mill, Foss, Denmark) によって白色子実をすりつぶして「コメ粉末」を付与した。

【0196】

7 . コメ粉末からのコメデンプンの抽出

コメ粉末からのコメデンプンの抽出を、Wang and Wang (2004; Journal of Cereal Science 39: 291-296) において記載される方法に従って実施した。

【0197】

コメ粉末約10gを0.05%(w/v)NaOH 40mLとともに、振盪器上で室温で16~18時間インキュベートした。その後、消化を完全にするために懸濁液をWaringブレンダーへと移し、低速で15秒間の後高速で45秒間完全に混合した。より大きな構成体(例えば、細胞壁)の分離のために、125μmおよび63μmのメッシュ幅を有する篩に懸濁液を連続して通過させた。1500rpmで15分間遠心分離後 (Microfuge 3.0R; Heraeus) 、上清を捨て、沈殿物の表面上にあるタンパク質層を、スパチュラを使用して除去した。得られた沈殿物を0.05%(w/v)NaOH中に再度懸濁し、上述の方法を反復した。その後、沈殿物を水中で再懸濁し、HClを使用して懸濁液のpHを6.5~7に調整した。得られたコメデンプンを水で合計3回洗浄し、各洗浄工程は、沈降(1500rpm、15分、室温で遠心分離)、上清の廃棄および新鮮な水中での沈殿物の再懸濁を含んだ。最後の洗浄工程の前にpHを再度チェックし、場合によりHClを使用してpH7に調整した。最後の洗浄工程の沈殿物をアセトン中に再懸濁し、沈降させ、上清を廃棄した。沈殿物をアセトン中に再懸濁した後、懸濁液をペトリ皿中に注ぎ、フード下で室温で少なくとも18時間乾燥させた。

【0198】

最後の工程において、このように得られたコメデンプンを、乳鉢中ですりつぶすことによって細かな粉末へと変換し、それをさらなる研究のために直接使用することが可能である。

【0199】

8 . ノザンプロットによるタンパク質の発現レベルの分析

タンパク質をコードする核酸の発現をノザンプロット分析によって研究した。このために、トランスフォーメーションによって得られた各独立した植物について、3つの未成熟なコメ子実を収穫し(開花約15日後)、液体窒素中で凍結した。ホモジナイゼーションのために、96穴マイクロタイタープレート中の凍結したコメ子実を、Retschミル (MM300モデル) 中の4.5mmスチール球を使用して、30Hzの周波数で30秒間粉砕した。その後、製造元の説明書に従ったPromega RNA抽出キット (SV 96 Total RNA Isolation System、注文番号Z3505、Promega, Mannheim) によって、RNAを単離した。個々の

10

20

30

40

50

試料中のRNA濃度を、260nmでの吸収の光度計による測定によって測定した。

【0200】

1試料につき、各場合にRNA 2μgを均一の容積にし、RNA試料緩衝液(65%(v/v)ホルムアミド、8%ホルムアルデヒド、13%(v/v)ゲル緩衝液(上述参照)、50μg/mL臭化工チジウム)の同一容積で処理した。加熱(65°、10分間)および氷上の即時冷却の後、RNA溶出緩衝液(20mM MOPS pH 8.0、5mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA)を使用して、50~80mAの定常電流強度で約2時間、1.2%(w/v)アガロースゲル(20mM MOPS pH 8.0、5mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA、6%(v/v)ホルムアルデヒド)上でRNAを分離した。その後、10_{0×SSC(1.5M NaCl、150mMクエン酸ナトリウムpH 7.0)}を使用する拡散プロットによってRNAをHybond-Nメンブレンへと転移させ、紫外線照射によってメンブレン上にRNAを固定した。

【0201】

デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードする核酸分子の発現の検出のためのノザンプロットのハイブリダイゼーションのために、コムギ由来のデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質をコードするcDNAの5'領域を含むプラスミドAH32-191(4568~5686塩基対)の約1kbのSpeI/BspHI断片を使用した。製造元の説明書に従って、32P-dCTPを使用するRocheのRandom primed DNA標識キット(注文番号1004760)によって、DNA断片の放射性標識を実施した。

【0202】

ハイブリダイゼーション緩衝液(250mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.2、1mM EDTA、6%(w/v)SDS、1%(w/v)BSA)を含有する水槽中で穏やかに振盪しながら、転移したRNAを含むナイロンメンブレンを60°で4時間インキュベートした後、放射性標識したDNAをハイブリダイゼーション緩衝液に添加した。16時間のインキュベーション後、ハイブリダイゼーション緩衝液を除去し、非特異的に結合したDNA分子の除去のために、水槽中で穏やかに振盪しながら、60°で、メンブレンを3×SSCで1回、2×SSC(上述参照)で1回、連続して洗浄した。

【0203】

標識されたRNAの検出のために、ナイロンメンブレンのオートラジオグラフィーをX線フィルム上で、-70°で1~3日間実施した。

【0204】

9.活性ゲル(酵素電気泳動像)によるデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の測定

未変性条件下でポリアクリルアミドゲル中でタンパク質抽出物を分離した後、適切な基質と共にインキュベートする活性ゲル(酵素電気泳動像)によって、未成熟なコメ子実におけるデンプン合成酵素の活性を有するタンパク質の活性の検出を実施した。得られた反応産物(グルカン)をルゴール溶液によってゲル中で染色した。

【0205】

個々の未成熟なコメ子実(開花約15日後)を液体窒素中で凍結し、冷却抽出緩衝液(50mMトリス/HCl pH 7.6、2.5mM EDTA、2mM DTT、4mM PMSF、0.1%(w/v)グリコーゲン、10%(v/v)グリセロール)150~200μL中でホモジナイズした。遠心分離(4°、13,000g、15分間)後、透明な上清を清潔な反応容器へ移し、抽出物の一定分量を使用して、Bradford(1976, Anal Biochem 72: 248-254)に従ったタンパク質含有量を測定した。

【0206】

単一濃度の溶出緩衝液(25mMトリス/HCl、192mMグリシン)を使用する連続的7.5%ポリアクリルアミドゲル(7.5%アクリルアミド:ビスアクリルアミド37.5:1、25mMトリス/HCl pH 7.6、192mMグリシン、0.1%(w/v)APS、0.05%(v/v)TEMED)によって、タンパク質抽出物の分離を実施した。各試料について、タンパク質15μgに相当する量を使用し、電気泳動を4°で2~2.5

10

20

30

40

50

時間実施した。その後、連続振盪しながら、インキュベーション緩衝液（0.5 mM クエン酸ナトリウム pH 7.0、25 mM 酢酸カリウム、2 mM EDTA、2 mM DTT、0.1% (w/v) アミロペクチン、50 mM トリシン / NaOH pH 8.5、1 mM ADP-グルコース）15 mL 中で室温で一晩ゲルをインキュベートした。ルゴール溶液によって、形成されたデンプンの染色を実施した。

【0207】

デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性が、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物との比較で何倍ほど増大するかを決定するために、遺伝的に改変された系のタンパク質抽出物を各場合において連続希釀し、上述の方法に従って電気泳動で分離した。既に上述に記載されるとおり、さらなる工程を実施した。ルゴール溶液による酵素電気泳動像を染色した後、遺伝的に改変された植物のタンパク質抽出物の多様な希釀についてのデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質によって生じる染色された産物（図1における矢印によって標識）の強度の、希釀されていない問題の野生型タンパク質の産物との視覚的な比較を実施した。産物の染色強度が、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性と直接相関するため、等強度を有する産物のバンドは、同一の活性を有する。希釀されたタンパク質抽出物におけるデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の産物のバンドが、問題の野生型植物由来の対応する希釀されていないタンパク質抽出物の産物のバンドと同一の強度を有する場合、希釀係数は、問題の遺伝的に改変された植物における活性の増大の程度に相当する（これについては図1を比較）。

【0208】

10. コメ胚（胚救出）による植物の作出

種子を穂から分離し、糊殻を除去する。小刀を使用して胚から胚乳を分離し、適切な分析のために使用する。湿潤可能性を改良するために、胚を70%エタノールで簡潔に処理した後、10%NaOCl および滅菌用の市販の洗剤1滴を含む溶液中に20分間インキュベートする。

【0209】

その後、滅菌溶液をできるだけ完全に除去し、各場合において胚を滅菌脱塩水で1分間1回洗浄した後、10分間2回洗浄する。MS培地（Murashige-Skoog培地）の塩濃度の1/4 および4%ショ糖種子を含むアガーレを使用して凝固させた培地上でペトリ皿中に種子を置く。その後、ペトリ皿をパラフィルムで密封し、暗所で23℃でインキュベートする。発芽後（胚を置いた約5～7日後）、ペトリ皿を明所へ転移する。実生の胚軸が、約2 cm の長さに到達した場合、2%ショ糖を含有するアガーレを使用して凝固させたMS培地を含むガラススポットへ、植物を転移する。適切な根の形成後、植物を土壤中に植えることが可能である。

【0210】

11. トウモロコシカーネルの加工

十分な材料の作出のため、トウモロコシ植物を温室条件下で生育させた。完全に熟したトウモロコシの穂を収穫し、37℃で3～7日間貯蔵してさらに乾燥させた後、カーネル（Kernel）を穂から摘出した。

【0211】

12. トウモロコシデンプンの抽出

「Corn Refiners Association」(<http://www.corn.org>) によって記載される湿式製粉方法に従って、トウモロコシデンプンを抽出した。10～50 g のトウモロコシカーネルを、硫酸の過剰量中で50℃で3日間インキュベートして、タンパク質マトリックスを放置した。その後、カーネルを水で洗浄し、簡単に乾燥した。2 mm のメッシュ幅を有する篩を備えた超遠心製粉機（retsch, Germany, ZM100）中でカーネルの製粉を実施した。製粉した材料をガラスピーカーに移し、20%NaCl 溶液中で少なくとも30分間インキュベートし、デンプン顆粒の沈降および上部相中での脂質体の浮遊を生じさせた。胚を含む上部相をデカントし、沈降物を残余溶液中で再度懸濁した。以下において、多様な篩い分け工程によって、デンプン顆粒のさらなる精製を達成した。500 μm の篩（DIN 4188）

10

20

30

40

50

、その後、 $200\text{ }\mu\text{m}$ の篩(DIN 4188)および $125\text{ }\mu\text{m}$ の篩(ISO 3310-1)を使用し、それにより、篩の下の滴が、デンプン顆粒をこれ以上含有しなくなるまで、噴霧器の使用によって篩を 20% NaCl($2\sim3\text{ L}$)で洗浄した。回収したデンプンを室温で一晩沈降させ、沈降したデンプン上の上清約 5 mm が留まる方法で、上清をデカントした。その後、デンプンを遠心チューブに移し、再度、Heraeus Variofuge中で 3500 rpm で 10 分間沈降させた。遠心分離後、(異なる色を有することによってしばしば認識される)沈降の上部のデンプン-タンパク質層をスパチュラで除去し、廃棄した。得られたデンプンを再度、 0.2 M 酢酸ナトリウムで数回懸濁し、遠心分離し(5分間、残りのパラメータは上述参照)、各回に、沈降物の上部のデンプン-タンパク質層を上述のとおり除去した。以下において、得られたデンプンを、 0.2 M 酢酸ナトリウム、pH 4.6、 1% プロメラインおよび 1% ペシン(pesin)を含む溶液中で、定常回転の下で1時間消化した後、遠心分離した(3000 rpm 、他のパラメータは上述参照)。沈降物の上部にあるデンプン-タンパク質層を上述のとおり再度除去し、得られた沈降物を水中で懸濁し、再度遠心分離した後、沈降物の上部にあるタンパク質層を上述のとおり除去した。この洗浄工程を合計5回反復した後、得られたデンプンを 80% エタノール中に懸濁し、遠心分離した(3000 rpm 、他のパラメータは上述参照)。この工程を4回反復した。最後に、得られたデンプンをアセトン中で1回洗浄し、脂質を除去した。その後、デンプンを室温で乾燥させた。

【0212】

13. トウモロコシ植物の栽培

植物材料 トウモロコシ(Zea mays)、品種 A 188

温室中の栽培条件:

土壤: 80%白色ピート

20%褐色ピート

100 kg/m^3 ガラス砂

40 kg/m^3 粘土

構造: 細かい

pH 5.3~6.1

基礎肥料: 2 kg/m^3 12-12-17(+2)および 100 g/m^3 Radigen (Theradion GmbH, Isrlohn, Germany)

植木鉢: 10L容器

密度: 最大6苗/ m^2

施肥: 四葉段階において 1 TAB Plantosan 4g (20-10-15+6)

さらに3週間後、1 TAB Plantosan(上述)

温度: 昼22~25 / 夜16

照明: 18時間、 $350\sim400\text{ }\mu\text{Aインシュタイン/秒/m}$

湿度: 50%相対値

【0213】

実施例

1. デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質のためのコード配列を含む植物発現ベクターAH32-191の調製

コムギ由来のデンプン合成酵素II(T.a.-SSII)の活性を有するタンパク質の完全なコード配列を、制限エンドヌクレアーゼEclI136AおよびXholによって(名称pTaSS1の下でWO 97 45545に記載される)プラスミドpCF31から切り出し、制限エンドヌクレアーゼEcoRVおよびXholを使用して開裂したプラスミドIR103-123にクローニングした。得られた発現ベクターは、AH32-191と名づけられた。植物発現ベクターIR103-123は、コメ由来のグロブリンプロモーターの調節下で標的遺伝子の胚乳特異的発現のために機能した。植物発現ベクターIR103-123はさらに、植物のトランスフォーメーションのための選択マークとして使用されたCaMV35Sプロモーターの調節下でbar遺伝子を含有する。

【0214】

10

20

30

40

50

2. デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を有するコメ植物の作出

Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) に記載される方法を使用して、プラスミドAH32-191を含むアグロバクテリウムによって、コメ植物 (M202種) をトランスフォームした。得られた植物に、名称oe-SSII-O.s.-Xを付与し、Xは、トランスフォーメーションから作出される独立した植物を指定する。

【0215】

3. グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有するコメ植物の作出

Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) に記載される方法を使用して、(WO05095619において記載される) プラスミドpML82を含むアグロバクテリウムによって、コメ植物 (M202種) をトランスフォームした。得られた植物に、名称oe-GWD-O.s.-Xを付与し、Xは、トランスフォーメーションから作出される独立した植物を指定する。

【0216】

4. 発現ベクターAH32-191を使用してトランスフォームされたコメ植物の分析

名称oe-SSII-O.s.-Xを有する系の発現ベクターAH32-191によるトランスフォーメーションから作出されたコメ植物 (T0植物) を、温室中の土壤中で栽培した。名称oe-SSII-O.s.-Xを有する多様な系の未成熟な子実 (T1種子) からRNAを単離し、一般的な方法の第8項に記載される方法に従って、ノザンプロット分析を実施した。対応する遺伝的に改変されていない野生型植物と比較して、コムギ由来のデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した発現を有する多くの系を同定することは可能であった (図2の典型的な表示参照)。

【0217】

多様な系oe-SSII-O.s.-Xの未成熟なT1種子におけるデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を、酵素電気泳動によってさらに検出した (図1および図2の典型的な表示参照)。酵素電気泳動による分析を、一般的な方法の第9項に記載される方法に従って実施した。

【0218】

5. 発現ベクターpML82を使用してトランスフォームされたコメ植物の分析

名称oe-GWD-O.s.-Xを有する系の発現ベクターpML82によるトランスフォーメーションから作出されたコメ植物 (T0植物) を、温室中の土壤中で栽培した。名称oe-GWD-O.s.-Xを有する多様な系の個々の成熟した子実 (T1種子) から粉末を製造した。このために、個々の子実を細かく微粉碎し、すりつぶした材料をその後ボールミル (Retsch, model MM 300) 中で30Hzの周波数で30秒間粉末状にした。その後、粉末のグルコース分子のC6位におけるデンプンリン酸エステル含有量の測定を、一般的な方法の第2項に記載される方法に従って実施した。

【0219】

選択された植物について、以下の結果を得た：

【0220】

【表1】

植物の名称	種子の新鮮重量 1 mgあたりの C6 リン酸の nmol
oe-GWD-O.s.-2	1.68
oe-GWD-O.s.-4	1.70
oe-GWD-O.s.-9	1.47
WT	0.30

【0221】

10

20

30

40

50

表1：遺伝的に改変されていない品種M202の対応する野生型植物（WT）の種子から製造された粉末と比較した、名称oe-GWD-O.s.-Xを有する異なる系の個々のT1種子から製造された粉末におけるグルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量。

【0222】

表1から明らかなように、遺伝的に改変されていない対応する野生型植物と比較して、粉末におけるグルコース分子のC6位において結合したリン酸の増大した含有量を有したトランスフォーメーションから、発現ベクターpML82を使用して作製された独立した系を同定することは可能であった。グルカン-水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した発現を有する植物細胞が、対応する遺伝的に改変されていない野生型植物と比較してより高いデンプンリン酸エステル含有量を有するデンプンを合成することが公知であるため、名称oe-GWD-O.s.-Xを有する系におけるリン酸含有量の増大は、グルカン-水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性に起因すると考えられるべきである。
10

【0223】

6. デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性およびグルカン-水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物の作出

名称Oe-SSII-O.s.-Xを有する多様な系のまたはOe-GWD-O.s.-X系の植物の各場合における30個のT1種子を温室中で再度栽培し、問題の植物に0.5%Basta（登録商標）（Bayer CropScience）を含む溶液を噴霧した。oe-SSII-O.s.-19、oe-GWD-O.s.-2、oe-GWD-O.s.-4およびoe-GWD-O.s.-9の系の処理された植物の約1/4は、Basta（登録商標）による処理に対して感度よく反応し、そのことによって、前記植物が、Basta（登録商標）に対するbar遺伝子介性抵抗性を含有せず、発現ベクターのT-DNAが、ゲノムの一部位でまたは互いに密接に位置することにより分離しないゲノムにおける部位で組み込まれたと結論付けられた。Basta（登録商標）による処理に対して抵抗性のあるこれらの系のT1植物のT2種子を、温室中に再度置き、Basta（登録商標）による処理をちょうど記載されたように実施した。その後、Basta（登録商標）による同一の処理を、これらの系のT3植物で実施した。すべての植物がBasta（登録商標）に対して抵抗性のあるoe-GWD-O.s.-19、oe-GWD-O.s.-2、oe-GWD-O.s.-4およびoe-GWD-O.s.-9の系の多様なT3植物を同定することが可能であった。このことによって、問題のT3種子が生じるT2植物が、組み込まれたT-DNAについてホモ接合性であると結論付けられた。oe-SSII-O.s.-19、oe-GWD-O.s.-2、oe-GWD-O.s.-4およびoe-GWD-O.s.-9の系の花粉をまぶした。そこから得られる交雑する子孫を、oe-SSII/GWD-O.s.-1（oe-SSII-O.s.-19 × oe-GWD-O.s.-2）、oe-SSII/GWD-O.s.-2（oe-SSII-O.s.-19 × oe-GWD-O.s.-4）およびoe-SSII/GWD-O.s.-3（oe-SSII-O.s.-19 × oe-GWD-O.s.-9）と命名した。
20
30

【0224】

7. デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性およびグルカン-水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物の分析

交雫から生じたoe-SSII/GWD-O.s.-1、oe-SSII/GWD-O.s.-2、oe-SSII/GWD-O.s.-3の系およびホモ接合性の親植物（oe-SSII-O.s.-19、oe-GWD-O.s.-2、oe-GWD-O.s.-4およびoe-GWD-O.s.-9）の個々のF1種子を各場合において収穫し、胚を分離し、室温で貯蔵した。一般的な方法の第6項に記載される方法を使用して、各個々のF1種子の残りの胚乳から得られる粉末を、グルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量について研究した。以下の結果が得られた。
40

【0225】

【表2】

植物の名称	F1 種子の番号	デンプン 1 mgあたりの C6 リン酸の nmol	
oe-SSII/GWD-O.s.-1	1	6.5	10
	2	2.8	
	3	2.6	
	4	2.5	
	5	2.6	
oe-SSII/GWD-O.s.-2	1	7.9	20
	2	7.2	
	3	7.1	
	4	8.4	
	5	6.9	
oe-SSII/GWD-O.s.-3	1	6.7	30
	2	6.0	
	3	7.7	
	4	7.5	
	5	7.0	
oe-SSII-O.s.-19 (母)	1	1.5	
	2	1.4	
oe-GWD-O.s.-2 (父1)	1	3.6	
oe-GWD-O.s.-4 (父2)	1	3.5	
oe-GWD-O.s.-9 (父3)	1	4.1	
WT	1	0.5	
	2	0.5	

【0226】

表2：遺伝的に改変されていない品種M202の対応する野生型植物（WT）の種子から製造された粉末と比較した、名称oe-SSII/GWD-O.s.-Xを有する系の個々のF1種子から製造された粉末におけるグルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量。親の系の個々のホモ接合性種子から製造された粉末におけるグルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量を同様に示す。

【0227】

粉末が、デンプン1mgあたり少なくとも6.0nmolのC6リン酸であるグルコース分子のC6位に結合したリン酸含有量を有するoe-SSII/GWD-O.s.-Xの系の種子の胚を、一般的な方法の第10項に記載された方法によって出芽させた後、F2種子の產生のために温室中で栽培した。デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を仲介しましたはグルカン-水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を仲介する2つの組み込まれたT-DNAに関してホモ接合性である子孫の同定のために、F1種子についてちょうど記載された方法を、F2種子で反復した。その後、順に、粉末が、種子の新鮮重量1mgあたり少なくとも6.0nmolのC6リン酸であるグルコース分子のC6位の結合したリン酸含有量を有する種子の胚を出芽させ、F3種子の产生のために温室中で栽培した。各場合においてF2植物から生じる個々のF3種子について、以下の結果が得られた：

40

50

【0228】

【表3】

植物の名称	F3 種子の番号	デンプン 1 mgあたりの C6 リン酸の nmol	
oe-SSII/GWD-O.s.-1	1	9.7	10
	2	9.7	
	3	10.0	
	4	9.7	
	5	9.8	
	6	9.1	
	7	8.4	
	8	9.7	
	9	9.9	
	10	10.0	
	11	9.8	
	12	9.8	20
oe-SSII/GWD-O.s.-2	1	10.4	
	2	9.8	
	3	10.9	
	4	10.1	
	5	11.2	
	6	10.0	
	7	11.0	
	8	9.7	
	9	10.4	
	10	10.5	
	11	11.9	
	12	10.6	30

oe-SSII/GWD-O.s.-3	1	12.5	10
	2	11.5	
	3	11.3	
	4	11.4	
	5	11.0	
	6	11.6	
	7	11.5	
	8	11.5	
	9	12.1	
	10	10.0	
	11	11.5	
	12	10.6	
oe-SSII-O.s.-19 (母)	1	1.5	20
	2	1.7	
	3	2.2	
	4	1.9	
oe-GWD-O.s.-9 (父 3)	1	3.3	
	2	2.9	
	3	3.3	
	4	3.3	
WT	1	0.5	
	2	0.9	

【 0 2 2 9 】

表 3 : 遺伝的に改変されていないM202品種の対応する野生型植物 (WT) の個々の種子から製造される粉末と比較した、oe-SSII-O.s.-19の親系 (母) をoe-GWD-O.s.-Xの系 (父) と交雑することによって調製された名称oe-SSII/GWD-O.s.-Xを有する系の個々のF3種子から製造された粉末におけるグルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量。個々の親の系の個々のホモ接合性種子から製造された粉末におけるグルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量を同様に示す。

【 0 2 3 0 】

問題の系のF2植物から各場合において生じた個々のF3種子から製造された粉末におけるグルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量が、ほぼ同一であったという事実は、問題のF2植物が、組み込まれた2つのT-DNAについてホモ接合性であるという事実を示した。

【 0 2 3 1 】

デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を仲介したまたはグルカン-水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を仲介する組み込まれた2つのT-DNAについてホモ接合性であるoe-SSII/GWD-O.s.-1、oe-SSII/GWD-O.s.-2、oe-SSII/GWD-O.s.-3の系のF2植物のF3種子を加工して、一般的な方法の第6項に記載される方法に従って粉末にした。一般的な方法の第7項に記載される方法に従って、この粉末の一部からデンプンを単離した。その後、グルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量を、粉末およびデンプンにおいて測定した。以下の結果が得られた：

【 0 2 3 2 】

30

40

50

【表4】

植物の名称	デンプン 1 mgあたりの C6 リン酸の nmol	デンプン 1 mgあたりの C6 リン酸の nmol
oe-SSII/GWD-O.s.-1	12.9	11.5
oe-SSII/GWD-O.s.-2	13.4	12.6
oe-SSII/GWD-O.s.-3	13.0	12.4
oe-SSII-O.s.-19 (母)	1.5	1.2
oe-GWD-O.s.-2 (父 1)	3.9	3.3
oe-GWD-O.s.-4 (父 2)	3.9	3.5
oe-GWD-O.s.-9 (父 3)	3.9	3.5
WT	1.1	0.4

10

【0233】

表4 : oe-SSII-O.s.-19 (母) およびoe-GWD-O.s.-X (父) の親の系またはM202品種の野生型植物 (WT) の種子から製造された粉末またはデンプンと比較した、交雑によって生じた名称oe-SSII/GWD-O.s.-Xを有する系のホモ接合性植物の種子から製造された粉末またはデンプンにおけるグルコース分子のC6位において結合したリン酸の含有量。

20

【0234】

Oe-SSII-O.s.-19およびoe-GWD-O.s.-Xの系のホモ接合性植物のおよび野生型植物のT-DNA組込みに関してoe-SSII/GWD-O.s.-Xの系のF3種子から製造された粉末またはデンプンの熱湯膨潤力の測定を、一般的な方法の第1項に記載された方法に従って実施した。これらの系とともに一般的な方法の第1項に記載された水の量を使用する場合、膨潤した物質の水性上清からの分離が認識できないため、oe-SSII/GWD-O.s.-Xの系については、一般的な方法の第1項に記載された方法とは異なって、粉末またはデンプンの量に基づいた水の量の2倍を使用した。以下の結果が得られた :

30

【0235】

【表5】

植物の名称	粉末の膨潤力 [g/g]	粉末の膨潤力 [g/g]
oe-SSIIGWD-O.s.-1	42.8	95.2
oe-SSIIGWD-O.s.-2	41.1	128.3
oe-SSIIGWD-O.s.-3	34.1	91.4
oe-SSII-O.s.-19 (母)	22.6	36.2
oe-GWD-O.s.-2 (父 1)	20.1	30.8
oe-GWD-O.s.-4 (父 2)	20.0	36.5
oe-GWD-O.s.-9 (父 3)	17.4	34.0
WT	16.3	27.7

40

【0236】

表5 : oe-SSII-O.s.-19 (母) およびoe-GWD-O.s.-X (父) の親の系またはM202品種の野生型植物 (WT) の種子から製造された粉末またはデンプンと比較した、交雑によって生じた名称oe-SSII/GWD-O.s.-Xを有する系のホモ接合性植物の種子から製造された粉末またはデンプンの熱湯膨潤力。

50

【 0 2 3 7 】

8 . デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質のためのコード配列を含む植物発現ベクターpJH77の調製

【 0 2 3 8 】

コムギ由来のデンプン合成酵素II (T.a.-SSII) の活性を有するタンパク質の完全なコード配列をサブクローニングした。得られたプラスミドは、pJH77と命名され(図4参照)、以下の機能的要素を含む：

【 0 2 3 9 】

【表6】

ヌクレオチド位置	向き	由来	
6600-6623		RB: アグロバクテリウム・ツメファシエンス (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の右ボーダーT-DNA (Zambryski, 1988)	10
6624-6909		右ボーダーと隣接する pTiAch5 の残余 TL-DNA (Gielen et al., 1984)	
6910-7285	反時計回り	3'nos: プラスミド pTiT37 の T-DNA 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域を含む配列 (Depicker et al., 1982)	
7286-9685	反時計回り	ss2aTa: コムギ (<i>Triticum aestivum</i>) 由来のデンプン合成酵素 II (T.a.-SSII) の活性を有するタンパク質のコード配列 (配列番号 5)	
9686-10437	反時計回り	イントロン 1 ubi1 Zm: トウモロコシ (<i>Zea mays</i>) 由来のユビキチン 1 遺伝子(<i>ubi1</i>) の第一のイントロン (Christensen et al., 1992).	
10438-11478	反時計回り	PglobulinOs: イネ (<i>Oryza sativa</i>) (コメ) 由来のグロブリン 1 遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (Hwang et al. (2002))	
11479-13261	時計回り	Pact1Os: イネ (コメ) 由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (Mc Elroy et al., 1990).	
13262-13739	時計回り	イントロン act1 Os: イネ (コメ) 由来のアクチン 1 遺伝子の第一のイントロン (Mc Elroy et al., 1990).	
13740-14291	時計回り	bar: ストレプトマイセス・ヒグロスコピクス (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) のホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のコード配列 (Thompson et al. (1987))	
14292-14561	時計回り	3'nos: プラスミド pTiT37 の T-DNA 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域を含む配列 (Depicker et al., 1982)	
14562-296		左ボーダーと隣接する pTiAch5 の残余 TL-DNA (Gielen et al., 1984) (Gielen et al., 1984)	40
297-320		LB: アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の左ボーダーT-DNA (Zambryski, 1988)	

【0240】

表6：プラスミドpJH77の遺伝的要素。

【0241】

【表7】

Christensen A. H., Sharrock R.A., Quail P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Molecular Biology, 18 , 675-689.	
Depicker A., Stachel S., Dhaese P., Zambryski P., Goodman H.M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics, 1 , 561-573.	10
Gielen J.; De Beuckeleer M.; Seurinck J.; De Boeck F.; De Greve H.; Lemmers M.; Van Montagu M.; Schell J. (1984). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. The EMBO journal, 3 , 835-846	
Hwang Y.-S., Yang D., McCullar C., Wu L., Chen L., Pham P., Nandi S., Huang N. (2002). Analysis of the rice-endosperm-specific globulin promoter in transformed rice cells. Plant Cell Rep 20 , 842-847.	20
Leroux B., Pelissier B., Lebrun M. (1996). Chimeric herbicide resistance gene. US Patent US5559024 (24-SEPT-1996), RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR).	
Mc Elroy D., Zhang W., Cao J., Wu R. (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. The Plant Cell, 2 , 163-171.	30
Thompson C.J., Rao Movva N., Tizard R., Crameri R., Davies J., Lauwereys M., Botterman J. (1987). Characterization of the herbicide resistance gene <i>bar</i> from <i>Streptomyces hygroscopicus</i> . The EMBO Journal, 6 , 2519-2523.	
Zambryski P. (1988). Basic processes underlying <i>Agrobacterium</i> -mediated DNA transfer to plant cells. Annual Review of Genetics, 22 , 1-30.	

【0242】

40

表7：表6において引用される参考文献。

【0243】

9. デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を有するトウモロコシ植物の作出および同定

一般的な方法の第5項に記載の方法に従って、トウモロコシ植物（品種A188）をプラスミドpJH77でトランスフォームした。名称JH77-Xを、得られた植物に付与した。Xが、トランスフォーメーションから作出された独立した植物を指定する。プラスミドJH77によるトランスフォーメーションから生じた植物（T0植物）を温室中で生育させ、野生型植物（品種A188）由来の花粉を受粉させた。

【0244】

50

プラスミドpJH77によるトランスフォーメーションおよび野生型による他家受粉後に得られた独立した植物由来の単一の未成熟な（受粉約15日後）カーネル（T1カーネル）から、トランスフォームされていない野生型植物（A188）由来と同様に、タンパク質を抽出した。一般的な方法の第9項に記載される方法に従って、多様な植物の個々のタンパク質抽出物を酵素電気泳動において分析した。SSIIの活性を有するタンパク質の活性の増大の定量化のために、トランスジェニック系由来のタンパク質抽出物を連続希釈した。このような分析の結果を図5によって具現化する。いくつもの植物は、野生型植物（A188）との比較で、3～5の係数のデンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の増大を示した。

【0245】

10

10. グルカン・水ジキナーゼの活性を有するタンパク質のためのコード配列を含む植物発現ベクターpHN3の調製

ベクターpHN3（図7）は、pRPA-BL150-A 2（欧州特許第0337899号）由来である。ベクター主鎖は、以下の遺伝的要素を含有する：

【0246】

【表 8】

ヌクレオチド位置	向き	由来	
6600-6623		RB: アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の T-DNA 由来の右ボーダーの反復 (Zambryski, 1988)	10
6624-6909		pTiAch5 の TL-DNA (Gielen et al., 1984)	
6910-6934		attB2: エシェリキア・コリ (<i>Escherichia coli</i>) の認識配列 attB の変異形 (Hartley et al., 2000)	
6935-7254	反時計回り	3'nos: pTiT37 の T-DNA 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域を含む配列 (Depicker et al., 1982)	
7255-11984	反時計回り	r1St: ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>) の r1 遺伝子のコード配列 (Lorberth et al., 1998)	
11985-12504	反時計回り	ubi1Zm(イントロン): トウモロコシ由来のユビキチン 1 遺伝子の第一のイントロン (Christensen et al., 1992)	
12505-13537	反時計回り	PubiZm: Christensen et al., 1992 によって記載されたトウモロコシのユビキチン 1 遺伝子のプロモーター領域を含む配列	
13538-13562		attB1: エシェリキア・コリの認識配列 attB の変異形 (Hartley et al., 2000)	
13563-15337	時計回り	Pact1Os: イネのアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (McElroy et al., 1990)	
15338-15815	時計回り	act1Os(イントロン): イネのアクチン 1 遺伝子のイントロンを含む配列 (McElroy et al., 1990)	
15816-16367	時計回り	bar: Thompson et al. (1987) によって記載されたストレプトマイセス・ヒグロスコピクスのホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のコード配列	30
16368-16638	時計回り	3'nos: pTiT37 の T-DNA 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域を含む配列 (Depicker et al., 1982)	
16639-296		pTiAch5 の TL-DNA (Gielen et al., 1984)	
297-320		LB: アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の T-DNA 由来の左ボーダーの反復 (Zambryski, 1988)	

【0 2 4 7】

表 8 : プラスマミド pHN3 の遺伝的要素。

【0 2 4 8】

40

【表9】

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J., Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. <i>Gene</i> , 2 , 95-113.	
Christensen,A.H., Sharrock,R.A. ,Quail,P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. <i>Plant Mol. Biol.</i> 18 (4), 675-689.	10
Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. <i>Journal of Molecular and Applied Genetics</i> , 1 , 561-573.	
Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M., Schell, J. (1984). The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the <i>Agrobacterium tumefaciens</i> plasmid pTiAch5. <i>The EMBO Journal</i> , 3 , 835-846.	
Hartley J., Temple G., Brasch M. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. <i>Genome Research</i> , 10 , 1788-1795.	20
Lorberth R, Ritte G, Willmitzer L, Kossmann J (1998). Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. <i>Nature Biotechnology</i> 16 , 473-477.	
McElroy,D., Zhang,W., Cao,J., Wu,R. (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. <i>Plant Cell</i> 2 (2), 163-171.	
Rhone Poulenc Agro EP0337899 B1	30
Thompson, C.J., Rao Movva, N., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J., Lauwereys, M., Bottermann, J. (1987). Characterization of the herbicide resistance gene <i>bar</i> from <i>Streptomyces hygroscopicus</i> . <i>EMBO J.</i> , 6 , 2519-2523.	
Wohlleben W, Arnold W, Bissonnette L, Pelletier A, Tanguay A, Roy PH, Gamboa GC, Barry GF, Aubert E, Davies J, (1989). On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (aacC1) for gentamicin acetyltransferase-3-I(AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. <i>Mol Gen Genet.</i> 217 (2-3), 202-208.	40
Zambryski P. (1988). Basic processes underlying <i>Agrobacterium</i> -mediated DNA transfer to plant cells. <i>Ann. Rev. Genet.</i> 22 : 1-30.	

【0249】

表9：表8において引用される参考文献。

【0250】

11. グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有するトウモロコシ植物の作出および同定

一般的な方法の第5項に記載の方法に従って、トウモロコシ植物（品種A188）をプラス

ミドpHN3でトランスフォームした。名称HN3-Xを、得られた植物に付与した。Xが、トランスフォーメーションから作出された独立した植物を指定する。

【0251】

プラスミドpHN3によるトランスフォーメーションから生じた植物（T0植物）を温室中で生育させ、野生型植物（品種A188）由来の花粉を受粉させた。結果として生じたT1世代の植物を温室中で生育させ、三つ葉状態において、0.5%Basta（登録商標）を含有する溶液を噴霧した。プラスミドpHN3の関連T-DNAの組込みが、ゲノム中の単一座に存在するものであるため、Basta（登録商標）溶液による噴霧後に各場合において30苗の栽培された植物の約25%が死滅したT1植物の群のみをさらに追隨した。Basta（登録商標）溶液による噴霧を生き残った植物の約75%由来の葉材料からゲノムDNAを単離し、Invader（登録商標）技術によって存在するコピー数について各場合において研究した（Pielberg et al. 2003, Genome Res.;13, 2171-2177）。Invader（登録商標）技術による分析において同一のT0植物の残りの子孫の約2倍強いシグナルを示したT0植物の子孫の一群内でのT1植物は、プラスミドT-DNAが組み込まれる座に関してホモ接合性である。Basta（登録商標）溶液による処理を生き残ったT0植物の子孫の約30%が、Invader技術による分析において、同一のT0植物の子孫の残り約70%と比較して約2倍強いシグナルを示す場合、このことは、T-DNAの組込みが単一座にあるというさらなる表れである。10

【0252】

ちょうど記載されるように選択された植物から収穫されたカーネルから単離されたデンプンにおいて、一般的な方法の第2a項に記載される方法に従って、デンプンリン酸エステル含有量を測定した。HN3-101系から単離されたデンプンは、デンプン1mgあたり4.6nmolのC6位におけるデンプンリン酸エステル含有量を有した。20

【0253】

12. デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性およびグルカン-水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有するトウモロコシ植物の作出および同定

デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の活性の増大において異なる程度を示すいくつもの独立した系（JH77-X）を、プラスミドpHN3由来のT-DNAの組込みに関してホモ接合性であるHN3-101系由来の植物との交雑のために使用した。HN3-101と命名された植物を花粉ドナー（雄性の交雑パートナー）として使用し、JH77-Xの系の植物を雌性の交雑パートナーとして使用した。これらの交雑から生じるF1植物を温室中で生育させ、DNAを葉から抽出した。両者のトランス遺伝子を有する多様なF1植物は、PCRを用いて選択されることが可能であった。これらの各植物由来の多様なF2植物を温室中で生育させ、ゲノムDNAを葉材料から単離し、Invader（登録商標）技術によって両トランス遺伝子に関して存在するコピー数について各場合において研究した（Pielberg et al. 2003, Genome Res.;13, 2171-2177）。Invader（登録商標）技術による分析において同一のF1植物の残りの子孫の約2倍強いシグナルを示したF1植物の子孫の一群内でのF2植物は、両プラスミドのT-DNAが組み込まれる個々の座に関してホモ接合性であることが理解されるべきである。3040

【0254】

以下の表は、ちょうど記載されたように選択された植物の由来を示す：

【0255】

【表10】

雄性の交雫パートナー	雌性の交雫パートナー	選択されたF2植物の命名された名称
HN3-101	JH77-01903	Cross-13
HN3-101	JH77-02101	Cross-49

【0256】

表10：HN3-101およびJH77-Xの系由来の植物を交雑させた後に得られた植物の由来。

【0257】

13. デンプン合成酵素IIおよび グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物由来のデンプンの分析

Cross-13およびCross-49と命名された植物由来の成熟した穂を収穫し、さらに、一般的な方法の第11項に記載されるように乾燥させた。一般的な方法の第12項に記載されるようにカーネルからデンプンを抽出した。これらのデンプン中のデンプンリン酸エステル含有量を、一般的な方法の第2a)項に記載された方法に従って分析し、一般的な方法の第1項に記載されるとおり、熱湯膨潤力を分析した。以下の結果が得られた：

10

【0258】

【表11】

植物の名称	デンプン 1 mgあたりの C6 リン酸の nmol	デンプンの膨潤力 [g/g]
A188-105	0.34	28.2
A188-114	0.13	30.8
JH77-01903	0.16	22.0
JH77-02101	0.16	22.2
HN3-101	4.70	42.3
Cross-13	6.49	48.6
Cross-49	5.97	47.4

20

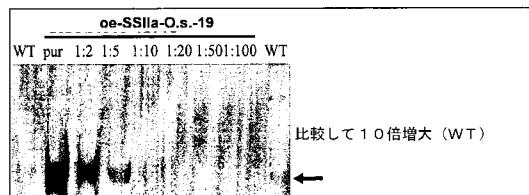
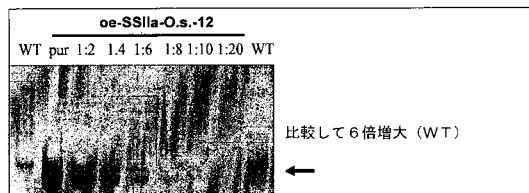
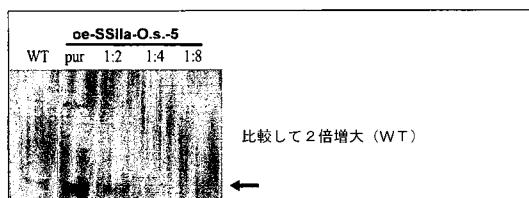
【0259】

表11：野生型植物（A188-105、A188-114）と比較した、デンプン合成酵素IIの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物（JH77-01903、JH77-02101）、グルカン - 水ジキナーゼの活性を有するタンパク質の増大した活性を有する植物（HN3-101）または両タンパク質の増大した活性を有する植物（Cross-13、Cross-49）から単離されたデンプンのデンプンリン酸エステル含有量および膨潤力。

30

【図1】

遺伝子導入系におけるSSII活性の測定



【図2】

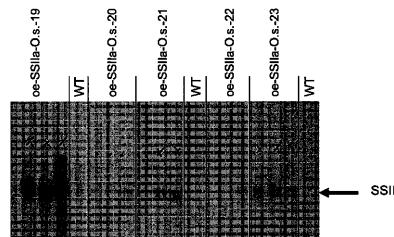


Fig. 2

【図3】

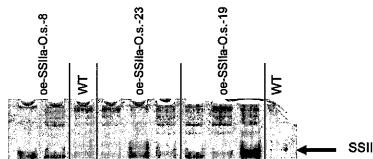
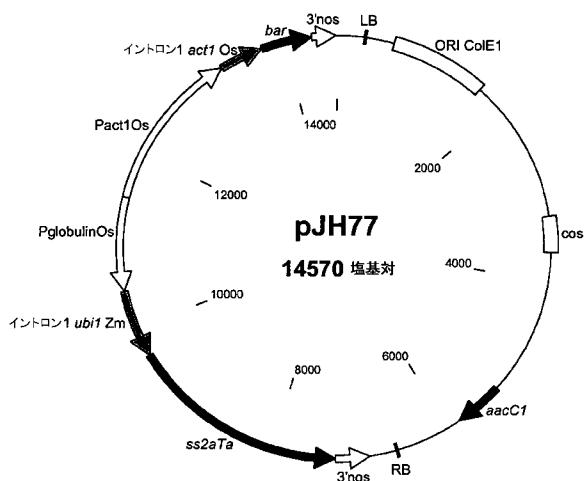
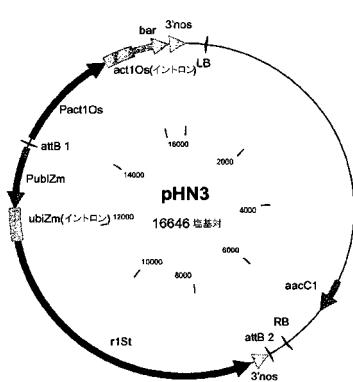


Fig. 3

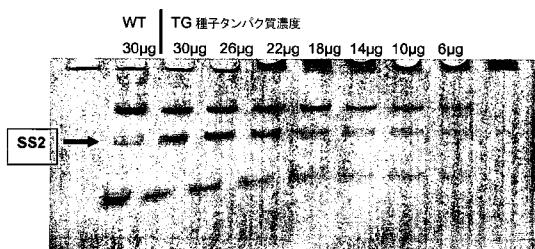
【図4】



【図6】



【図5】



【配列表】

0005284261000001.app

フロントページの続き

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 国際公開第2005/095617 (WO, A2)
国際公開第2004/056999 (WO, A1)
国際公開第2005/002359 (WO, A2)
特表平11-512286 (JP, A)
BLENNOW, INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, 英国, BUTTERWORTH&CO., 2005年 8月, V36 N3, P159-168
MIKKELSEN R, BIOCHEMICAL JOURNAL, 英国, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, 2004年 1月15日, V377 N2, P525-532
KOETTING O, PLANT PHYSIOLOGY, 米国, AMERICAN SOCIETY OF PLANT BIOLOGISTS, 2005年 1月, V137 N1, P242-252
MORELL M K, THE PLANT JOURNAL, 英国, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, 2003年 4月, V34 N2, P173-185
WADUGE, FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, 英国, ELSEVIER APPLIED SCIENCE, 2006年 1月, V39 N1, P59-77
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002年 5月14日, Vol. 99, No. 10, p. 7166-7171

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 5 / 10
A 01 H 1 / 00
C 08 B 30 / 00
C 12 N 15 / 09
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
P u b M e d
B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / W P I X (S T N)
C i N i i