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

特許第3565845号

(P3565845)

(45)発行日　平成16年9月15日(2004.9.15)　(24)登録日　平成16年6月18日(2004.6.18)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA
A01H 5/00	A01H	5/00	ZNAA
C12N 1/19	C12N	1/19	
C12N 1/21	C12N	1/21	
//(C12N 1/19	C12N	1/19	

請求項の数 21　(全 42 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-502044
(86)(22)出願日　平成5年6月22日(1993.6.22)
(65)公表番号　特表平7-509123
(43)公表日　平成7年10月12日(1995.10.12)
(86)国際出願番号　PCT/EP1993/001604
(87)国際公開番号　WO1994/000574
(87)国際公開日　平成6年1月6日(1994.1.6)
審査請求日　平成12年5月12日(2000.5.12)
(31)優先権主張番号　P4220759.2
(32)優先日　平成4年6月24日(1992.6.24)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

微生物の受託番号　DSM 7115
微生物の受託番号　DSM 7106
微生物の受託番号　DSM 7105

(73)特許権者
バイエル　クロップサイエンス　ゲゼルシャフト　ミット　ベシュレンクテル　ハフツング
ドイツ連邦共和国　フランクフルト　アム　マイン（番地なし）
(74)代理人
弁理士　矢野　敏雄
(74)代理人
弁理士　山崎　利臣
(74)代理人
弁理士　久野　琢也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】オリゴ糖輸送体を有するＤＮＡ配列，該輸送体を含有するプラスミド，細菌および植物，ならびに該輸送体を同定するための酵母株の製造および形質転換方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
オリゴ糖輸送体のコーディング領域を有するDNAにおいて、
ヌクレオチド配列（Seq－ID　No.1）

```
AAAAACACAC ACCCAAAAAA AAAACACTAC GACTATTTCA AAAAAAACAT TGTTACTAGA  60

AATCTTATT  ATG GCA GGA AGA AAT ATA AAA AAT GGT GAA AAT AAC          105
           Met Ala Gly Arg Asn Ile Lys Asn Gly Glu Asn Asn
           1               5                   10

AAG ATT GCG GGT TCT TCT CTT CAC TTA GAG AAG AAC CCA ACA ACT         150
Lys Ile Ala Gly Ser Ser Leu His Leu Glu Lys Asn Pro Thr Thr
        15                  20                  25

CCC CCC GAC GCC GAG GCT ACC TTA AAG AAG CTC GGC CTC GTG GCT         195
Pro Pro Glu Ala Glu Ala Thr Leu Lys Lys Leu Gly Leu Val Ala
        30                  35                  40

TCA GTA GCG GCC GGG GTT CAG TTC GGG TGG GCT TTA CAG CTC TCC         240
Ser Val Ala Ala Gly Val Gln Phe Gly Trp Ala Leu Gln Leu Ser
        45                  50                  55
```

```
CTA CTG ACC CCG TAC GTC CAA CTA CTG GGC ATT CCC CAC ACT TGG        285
Leu Leu Thr Pro Tyr Val Gln Leu Leu Gly Ile Pro His Thr Trp
        60                  65                  70

GCC GCC TAC ATC TGG TTG TGC GGC CCA ATC TCG GGG ATG ATT GTC        330
Ala Ala Tyr Ile Trp Leu Cys Gly Pro Ile Ser Gly Met Ile Val
        75                  80                  85

CAG CCA TTG GTC GGG TAC TAT AGT GAC CGG TGC ACC TCC CGC TTC        375
Gln Pro Leu Val Gly Tyr Tyr Ser Asp Arg Cys Thr Ser Arg Phe
        90                  95                  100

GGC CGA CGT CGC CCC TTC ATT GCA GCA GGG GCG GCT CTA GTG GCC        420
Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Ala Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala
        105                 110                 115

GTA GCG GTG GGG CTA ATC GGA TTC GCC GCC GAT ATC GGC GCA GCG        465
Val Ala Val Gly Leu Ile Gly Phe Ala Ala Asp Ile Gly Ala Ala
        120                 125                 130

TCG GGT GAT CCA ACG GGA AAC GTG GCA AAA CCC CGG GCC ATC GCG        510
Ser Gly Asp Pro Thr Gly Asn Val Ala Lys Pro Arg Ala Ile Ala
        135                 140                 145

GTG TTT GTG GTC GGG TTT TGG ATC CTC GAC GTG GCT AAC AAC ACC        555
Val Phe Val Val Gly Phe Trp Ile Leu Asp Val Ala Asn Asn Thr
        150                 155                 160

CTG CAA GGC CCA TGC AGG GCG TTG TTA GCA GAC ATG GCC GCC GGG        600
Leu Gln Gly Pro Cys Arg Ala Leu Leu Ala Asp Met Ala Ala Gly
        165                 170                 175
```

```
TCG CAA ACC AAA ACC CGG TAC GCT AAC GCC TTC TTC TCC TTC TTC      645
Ser Gln Thr Lys Thr Arg Tyr Ala Asn Ala Phe Phe Ser Phe Phe
        180                 185                 190

ATG GCG TTA GGA AAC ATC GGA GGG TAC GCC GCC GGT TCA TAC AGC      690
Met Ala Leu Gly Asn Ile Gly Gly Tyr Ala Ala Gly Ser Tyr Ser
        195                 200                 205

CGC CTC TAC ACG GTG TTC CCC TTT ACC AAA ACC GCC GCC TGC GAC      735
Arg Leu Tyr Thr Val Phe Pro Phe Thr Lys Thr Ala Ala Cys Asp
        210                 215                 220
GTC TAC TGC GCC AAT CTA AAA TCC TGC TTC TTC ATC TCC ATC ACA      780
Val Tyr Cys Ala Asn Leu Lys Ser Cys Phe Phe Ile Ser Ile Thr
        225                 230                 235

CTC CTA ATC GTC CTC ACA ATC CTA GCA CTT TCC GTC GTA AAA GAG      825
Leu Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu Ala Leu Ser Val Val Lys Glu
        240                 245                 250

CGT CAA ATC ACA ATC GAC GAA ATC CAA GAA GAA GAA GAC TTA AAA      870
Arg Gln Ile Thr Ile Asp Glu Ile Gln Glu Glu Glu Asp Leu Lys
        255                 260                 265

AAC AGA AAC AAT AGC AGC GGT TGT GCA AGA CTA CCG TTC TTC GGA      915
Asn Arg Asn Asn Ser Ser Gly Cys Ala Arg Leu Pro Phe Phe Gly
        270                 275                 280

CAA TTA ATA GGC GCT CTC AAA GAT CTA CCA AAA CCA ATG CTA ATC      960
Gln Leu Ile Gly Ala Leu Lys Asp Leu Pro Lys Pro Met Leu Ile
        285                 290                 295

CTA TTA CTA GTA ACA GCC CTA AAT TGG ATC GCA TGG TTT CCA TTC     1005
Leu Leu Leu Val Thr Ala Leu Asn Trp Ile Ala Trp Phe Pro Phe
        300                 305                 310
```

```
TTG TTG TTC GAT ACT GAT TGG ATG GGT AAA GAA GTG TAC GGT GGT      1050
Leu Leu Phe Asp Thr Asp Trp Met Gly Lys Glu Val Tyr Gly Gly
        315                 320                 325

ACA GTC GGA GAA GGT AAA TTG TAC GAC CAA GGA GTT CAT GCC GGT      1095
Thr Val Gly Glu Gly Lys Leu Tyr Asp Gln Gly Val His Ala Gly
        330                 335                 340

GCC TTA GGT CTG ATG ATT AAC TCC GTT GTC TTA GGT GTT ATG TCG      1140
Ala Leu Gly Leu Met Ile Asn Ser Val Val Leu Gly Val Met Ser
        345                 350                 355
TTG AGT ATT GAA GGT TTG GCT CGT ATG GTA GGC GGT GCT AAA AGG      1185
Leu Ser Ile Glu Gly Leu Ala Arg Met Val Gly Gly Ala Lys Arg
      360                 365                 370

TTA TGG GGA ATT GTC AAT ATT ATT CTT GCT GTT TGT TTA GCT ATG      1230
Leu Trp Gly Ile Val Asn Ile Ile Leu Ala Val Cys Leu Ala Met
        375                 380                 385

ACG GTG TTA GTT ACT AAG TCC GCC GAA CAC TTC CGT GAT AGC CAC      1275
Thr Val Leu Val Thr Lys Ser Ala Glu His Phe Arg Asp Ser His
        390                 395                 400

CAT ATT ATG GGC TCC GCC GTC CCT CCG CCG CCG CCT GCT GGT GTT      1320
His Ile Met Gly Ser Ala Val Pro Pro Pro Pro Pro Ala Gly Val
        405                 410                 415

AAG GGT GGC GCT TTG GCT ATC TTT GCC GTT CTT GGT ATC CCT CTT      1365
Lys Gly Gly Ala Leu Ala Ile Phe Ala Val Leu Gly Ile Pro Leu
        420                 425                 430

GCG ATC ACT TTC AGT ATT CCT TTG GCC TTG GCG TCA ATC TTT TCA      1410
Ala Ile Thr Phe Ser Ile Pro Phe Ala Leu Ala Ser Ile Phe Ser
        435                 440                 445
```

```
GCA TCT TCC GGT TCA GGA CAA GGT CTT TCT CTA GGA GTT CTC AAC    1455
Ala Ser Ser Gly Ser Gly Gln Gly Leu Ser Leu Gly Val Leu Asn
        450                 455                 460

CTC GCC ATC GTT GTA CCC CAG ATG TTT GTG TCG GTA ACA AGT GGG    1500
Leu Ala Ile Val Val Pro Gln Met Phe Val Ser Val Thr Ser Gly
        465                 470                 475

CCA TGG GAT GCA ATG TTT GGT GGA GGA AAT TTG CCA GCA TTC GTG    1545
Pro Trp Asp Ala Met Phe Gly Gly Gly Asn Leu Pro Ala Phe Val
        480                 485                 490
GTG GGA GCT GTA GCA GCA ACA GCC AGT GCA GTT CTT TCA TTT ACA    1590
Val Gly Ala Val Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ser Phe Thr
        495                 500                 505

TTG TTG CCT TCT CCA CCC CCT GAA GCT AAA ATT GGT GGG TCC ATG    1635
Leu Leu Pro Ser Pro Pro Pro Glu Ala Lys Ile Gly Gly Ser Met
        510                 515                 520

GGT GGT CAT TAAGAAATTT AATACTACTC CGTACAATTT AAACCCAAAT        1684
Gly Gly His
        525

TAAAAATGAA AATGAAAATT TTTAACCCAT GTTCGTTACG TTGTAATTAG        1734

AGAGAAAAAT GATATATTGA ACGAAGCCGT TAATTTATGC TCCGTTCATC        1784

TTGTAATTCT TTTTCTCTCT GCTTTTTTTT TTTTTTTTTA ACGCGACGTG        1834

TTTTTGAGAT AAGGAAGGGC TAGATCGAGG ATGGGGGAAT TGGCAAGAAA        1884

TTGCTCGGGT ATAAATATTT ATCCCTCTTT GTAATTTTCA GTAACATTTA        1934

ATAGCCAGAA ATCAAAAAGT CAAGAAAAAT CGAAA                        1969
```

かまたはヌクレオチド配列（Seq－ID No.2）：

AAAA 4

```
ATG GAG AAT GGT ACA AAA AGA GAA GGT TTA GGG AAA CTT ACA GTT    49
Met Glu Asn Gly Thr Lys Arg Glu Gly Leu Gly Lys Leu Thr Val
 5                  10                  15

TCA TCT TCT CTA CAA GTT GAA CAG CCT TTA GCA CCA TCA AAG CTA    94
Ser Ser Ser Leu Gln Val Glu Gln Pro Leu Ala Pro Ser Lys Leu
            20                  25                  30

TGG AAA ATT ATA GTT GTA GCT TCC ATA GCT GCT GGT GTT CAA TTT   139
Trp Lys Ile Ile Val Val Ala Ser Ile Ala Ala Gly Val Gln Phe
        35                  40                  45

GGT TGG GCT CTT CAG CTC TCT TTG CTT ACA CCT TAT GTT CAA TTG   184
Gly Trp Ala Leu Gln Leu Ser Leu Leu Thr Pro Tyr Val Gln Leu
    50                  55                  60

CTC GGA ATT CCT CAT AAA TTT GCC TCT TTT ATT TGG CTT TGT GGA   229
Leu Gly Ile Pro His Lys Phe Ala Ser Phe Ile Trp Leu Cys Gly
65                  70                  75

CCG ATT TCT GGT ATG ATT GTT CAG CCA GTT GTC GGC TAC TAC AGT   274
Pro Ile Ser Gly Met Ile Val Gln Pro Val Val Gly Tyr Tyr Ser
            80                  85                  90

GAT AAT TGC TCC TCC CGT TTC GGT CGC CGC CGG CCA TTC ATT GCC   319
Asp Asn Cys Ser Ser Arg Phe Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Ala
        95                  100                 105
```

```
GCC GGA GCT GCA CTT GTT ATG ATT GCG GTT TTC CTC ATC GGA TTC   364
Ala Gly Ala Ala Leu Val Met Ile Ala Val Phe Leu Ile Gly Phe
                110                 115                 120

GCC GCC GAC CTT GGT CAC GCC TCC GGT GAC ACT CTC GGA AAA GGA   409
Ala Ala Asp Leu Gly His Ala Ser Gly Asp Thr Leu Gly Lys Gly
                125                 130                 135

TTT AAG CCA CGT GCC ATT GCC GTT TTC GTC GTC GGC TTT TGG ATC   454
Phe Lys Pro Arg Ala Ile Ala Val Phe Val Val Gly Phe Trp Ile
                140                 145                 150

CTT GAT GTT GCT AAC AAC ATG TTA CAG GGC CCA TGC AGA GCA CTA   499
Leu Asp Val Ala Asn Asn Met Leu Gln Gly Pro Cys Arg Ala Leu
                155                 160                 165

CTG GCT GAT CTC TCC GGC GGA AAA TCC GGC AGG ATG AGA ACA GCA   544
Leu Ala Asp Leu Ser Gly Gly Lys Ser Gly Arg Met Arg Thr Ala
                170                 175                 180

AAT GCT TTT TTC TCA TTC TTC ATG GCC GTC GGA AAC ATT CTG GGG   589
Asn Ala Phe Phe Ser Phe Phe Met Ala Val Gly Asn Ile Leu Gly
                185                 190                 195

TAC GCC GCC GGT TCA TAT TCT CAC CTC TTT AAA GTA TTC CCC TTC   634
Tyr Ala Ala Gly Ser Tyr Ser His Leu Phe Lys Val Phe Pro Phe
                200                 205                 210

TCA AAA ACC AAA GCC TGC GAC ATG TAC TGC GCA AAT CTG AAG AGT   679
Ser Lys Thr Lys Ala Cys Asp Met Tyr Cys Ala Asn Leu Lys Ser
                215                 220                 225

TGT TTC TTC ATC GCT ATA TTC CTT TTA CTC AGC TTA ACA ACC ATA   724
Cys Phe Phe Ile Ala Ile Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Thr Ile
                230                 235                 240
```

```
GCC TTA ACC TTA GTC CGG GAA AAC GAG CTC CCG GAG AAA GAC GAG   769
Ala Leu Thr Leu Val Arg Glu Asn Glu Leu Pro Glu Lys Asp Glu
                245                 250                 255

CAA GAA ATC GAC GAG AAA TTA GCC GGC GCC GGA AAA TCG AAA GTA   814
Gln Glu Ile Asp Glu Lys Leu Ala Gly Ala Gly Lys Ser Lys Val
                260                 265                 270

CCG TTT TTC GGT GAA ATT TTT GGG GCT TTG AAA GAA TTA CCT CGA   859
Pro Phe Phe Gly Glu Ile Phe Gly Ala Leu Lys Glu Leu Pro Arg
                275                 280                 285

CCG ATG TGG ATT CTT CTA TTA GTA ACC TGT TTG AAC TGG ATC GCG   904
Pro Met Trp Ile Leu Leu Leu Val Thr Cys Leu Asn Trp Ile Ala
                290                 300                 305

TGG TTT CCC TTT TTC TTA TAC GAT ACA GAT TGG ATG GCT AAG GAG   949
Trp Phe Pro Phe Phe Leu Tyr Asp Thr Asp Trp Met Ala Lys Glu
                310                 315                 320

GTT TTC GGT GGA CAA GTC GGT GAT GCG AGG TTG TAC GAT TTG GGT   994
Val Phe Gly Gly Gln Val Gly Asp Ala Arg Leu Tyr Asp Leu Gly
                325                 330                 335

GTA CGC GCT GGT GCA ATG GGA TTA CTG TTG CAA TCT GTG GTT CTA  1039
Val Arg Ala Gly Ala Met Gly Leu Leu Leu Gln Ser Val Val Leu
                340                 345                 350

GGG TTT ATG TCA CTT GGG GTT GAA TTC TTA GGG AAG AAG ATT GGT  1084
Gly Phe Met Ser Leu Gly Val Glu Phe Leu Gly Lys Lys Ile Gly
                355                 360                 370

GGT GCT AAG AGG TTA TGG GGA ATT TTG AAC TTT GTT TTG GCT ATT  1129
Gly Ala Lys Arg Leu Trp Gly Ile Leu Asn Phe Val Leu Ala Ile
                375                 380                 385
```

```
TGC TTG GCT ATG ACC ATT TTG GTC ACC AAA ATG GCC GAG AAA TCT  1174
Cys Leu Ala Met Thr Ile Leu Val Thr Lys Met Ala Glu Lys Ser
                390                 395                 400

CGC CAG CAC GAC CCC GCC GGC ACA CTT ATG GGG CCG ACG CCT GGT  1219
Arg Gln His Asp Pro Ala Gly Thr Leu Met Gly Pro Thr Pro Gly
                405                 410                 415

GTT AAA ATC GGT GCC TTG CTT CTC TTT GCC GCC CTT GGT ATT CCT  1264
Val Lys Ile Gly Ala Leu Leu Leu Phe Ala Ala Leu Gly Ile Pro
                420                 425                 430

CTT GCG GCA ACT TTT AGT ATT CCA TTT GCT TTG GCA TCT ATA TTT  1309
Leu Ala Ala Thr Phe Ser Ile Pro Phe Ala Leu Ala Ser Ile Phe
                435                 440                 445

TCT AGT AAT CGT GGT TCA GGA CAA GGT TTG TCA CTA GGA GTG CTC  1354
Ser Ser Asn Arg Gly Ser Gly Gln Gly Leu Ser Leu Gly Val Leu
                450                 455                 460

AAT CTT GCA ATT GTT GTA CCA CAG ATG TTG GTG TCA CTA GTA GGA  1399
Asn Leu Ala Ile Val Val Pro Gln Met Leu Val Ser Leu Val Gly
                465                 470                 475

GGG CCA TGG GAT GAT TTG TTT GGA GGA GGA AAC TTG CCT GGA TTT  1444
Gly Pro Trp Asp Asp Leu Phe Gly Gly Gly Asn Leu Pro Gly Phe
                480                 485                 490

GTA GTT GGA GCA GTT GCA GCT GCC GCG AGC GCT GTT TTA GCA CTC  1489
Val Val Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Ser Ala Val Leu Ala Leu
                495                 500                 505

ACA ATG TTG CCA TCT CCA CCT GCT GAT GCT AAG CCA GCA GTC GCC  1534
Thr Met Leu Pro Ser Pro Pro Ala Asp Ala Lys Pro Ala Val Ala
                510                 515                 520
```

```
ATG GGG CTT TCC ATT AAA TAATTACAAA AGAAGGAGAA GAACAACTTT      1582
Met Gly Leu Ser Ile Lys
                525

TTTTTAATAT TAGTACTTCT CTTTTGTAAA CTTTTTTTAT TTTAGAAAAC      1632

AAACATAACA TGGAGGCTAT CTTTACAAGT GGCATGTCCA TGTATCTTCC      1682

TTTTTTCATA AAGCTCTTTA GTGGAAGAAG AATTAGAGGA AGTTTCCTTT      1732

TAATTTCTTC CAAACAAATG GGGTATGTGT AGTTGTTTTC A               1773
```

に含まれている情報が、植物ゲノム中への配列組込みにより、RNAの形成を可能にし、かつこのRNAで植物細胞中への新しいオリゴ糖輸送活性を導入することができるかまたは内在性オリゴ糖輸送体活性を発現することができ、これにより貯蔵物質の形成および輸送が変化することを特徴とするオリゴ糖輸送体のコーディング領域を有するDNA。

【請求項２】

下記のヌクレオチド配列（Seq－ID No.1）

```
AAAAACACAC ACCCAAAAAA AAAACACTAC GACTATTTCA AAAAAAACAT TGTTACTAGA  60

AATCTTATT  ATG GCA GGA AGA AAT ATA AAA AAT GGT GAA AAT AAC          105
           Met Ala Gly Arg Asn Ile Lys Asn Gly Glu Asn Asn
           1               5                   10

AAG ATT GCG GGT TCT TCT CTT CAC TTA GAG AAG AAC CCA ACA ACT        150
Lys Ile Ala Gly Ser Ser Leu His Leu Glu Lys Asn Pro Thr Thr
        15                  20                  25

CCC CCC GAG GCC GAG GCT ACC TTA AAG AAG CTC GGC CTC GTG GCT        195
Pro Pro Glu Ala Glu Ala Thr Leu Lys Lys Leu Gly Leu Val Ala
        30                  35                  40

TCA GTA GCG GCC GGG GTT CAG TTC GGG TGG GCT TTA CAG CTC TCC        240
Ser Val Ala Ala Gly Val Gln Phe Gly Trp Ala Leu Gln Leu Ser
        45                  50                  55
```

```
CTA CTG ACC CCG TAC GTC CAA CTA CTG GGC ATT CCC CAC ACT TGG        285
Leu Leu Thr Pro Tyr Val Gln Leu Leu Gly Ile Pro His Thr Trp
        60                  65                  70

GCC GCC TAC ATC TGG TTG TGC GGC CCA ATC TCG GGG ATG ATT GTC        330
Ala Ala Tyr Ile Trp Leu Cys Gly Pro Ile Ser Gly Met Ile Val
        75                  80                  85

CAG CCA TTG GTC GGG TAC TAT AGT GAC CGG TGC ACC TCC CGC TTC        375
Gln Pro Leu Val Gly Tyr Tyr Ser Asp Arg Cys Thr Ser Arg Phe
        90                  95                  100

GGC CGA CGT CGC CCC TTC ATT GCA GCA GGG GCG GCT CTA GTG GCC        420
Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Ala Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala
        105                 110                 115

GTA GCG GTG GGG CTA ATC GGA TTC GCC GCC GAT ATC GGC GCA GCG        465
Val Ala Val Gly Leu Ile Gly Phe Ala Ala Asp Ile Gly Ala Ala
        120                 125                 130

TCG GGT GAT CCA ACG GGA AAC GTG GCA AAA CCC CGG GCC ATC GCG        510
Ser Gly Asp Pro Thr Gly Asn Val Ala Lys Pro Arg Ala Ile Ala
        135                 140                 145

GTG TTT GTG GTC GGG TTT TGG ATC CTC GAC GTG GCT AAC AAC ACC        555
Val Phe Val Val Gly Phe Trp Ile Leu Asp Val Ala Asn Asn Thr
        150                 155                 160

CTG CAA GGC CCA TGC AGG GCG TTG TTA GCA GAC ATG GCC GCC GGG        600
Leu Gln Gly Pro Cys Arg Ala Leu Leu Ala Asp Met Ala Ala Gly
        165                 170                 175
```

```
TCG CAA ACC AAA ACC CGG TAC GCT AAC GCC TTC TTC TCC TTC TTC      645
Ser Gln Thr Lys Thr Arg Tyr Ala Asn Ala Phe Phe Ser Phe Phe
        180                 185                 190

ATG GCG TTA GGA AAC ATC GGA GGG TAC GCC GCC GGT TCA TAC AGC      690
Met Ala Leu Gly Asn Ile Gly Gly Tyr Ala Ala Gly Ser Tyr Ser
        195                 200                 205

CGC CTC TAC ACG GTG TTC CCC TTT ACC AAA ACC GCC GCC TGC GAC      735
Arg Leu Tyr Thr Val Phe Pro Phe Thr Lys Thr Ala Ala Cys Asp
        210                 215                 220
GTC TAC TGC GCC AAT CTA AAA TCC TGC TTC TTC ATC TCC ATC ACA      780
Val Tyr Cys Ala Asn Leu Lys Ser Cys Phe Phe Ile Ser Ile Thr
        225                 230                 235

CTC CTA ATC GTC CTC ACA ATC CTA GCA CTT TCC GTC GTA AAA GAG      825
Leu Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu Ala Leu Ser Val Val Lys Glu
        240                 245                 250

CGT CAA ATC ACA ATC GAC GAA ATC CAA GAA GAA GAA GAC TTA AAA      870
Arg Gln Ile Thr Ile Asp Glu Ile Gln Glu Glu Glu Asp Leu Lys
        255                 260                 265

AAC AGA AAC AAT AGC AGC GGT TGT GCA AGA CTA CCG TTC TTC GGA      915
Asn Arg Asn Asn Ser Ser Gly Cys Ala Arg Leu Pro Phe Phe Gly
        270                 275                 280

CAA TTA ATA GGC GCT CTC AAA GAT CTA CCA AAA CCA ATG CTA ATC      960
Gln Leu Ile Gly Ala Leu Lys Asp Leu Pro Lys Pro Met Leu Ile
        285                 290                 295

CTA TTA CTA GTA ACA GCC CTA AAT TGG ATC GCA TGG TTT CCA TTC     1005
Leu Leu Leu Val Thr Ala Leu Asn Trp Ile Ala Trp Phe Pro Phe
        300                 305                 310
```

```
TTG TTG TTC GAT ACT GAT TGG ATG GGT AAA GAA GTG TAC GGT GGT      1050
Leu Leu Phe Asp Thr Asp Trp Met Gly Lys Glu Val Tyr Gly Gly
        315                 320                 325

ACA GTC GGA GAA GGT AAA TTG TAC GAC CAA GGA GTT CAT GCC GGT      1095
Thr Val Gly Glu Gly Lys Leu Tyr Asp Gln Gly Val His Ala Gly
        330                 335                 340

GCC TTA GGT CTG ATG ATT AAC TCC GTT GTC TTA GGT GTT ATG TCG      1140
Ala Leu Gly Leu Met Ile Asn Ser Val Val Leu Gly Val Met Ser
        345                 350                 355
TTG AGT ATT GAA GGT TTG GCT CGT ATG GTA GGC GGT GCT AAA AGG      1185
Leu Ser Ile Glu Gly Leu Ala Arg Met Val Gly Gly Ala Lys Arg
      360                 365                 370

TTA TGG GGA ATT GTC AAT ATT ATT CTT GCT GTT TGT TTA GCT ATG      1230
Leu Trp Gly Ile Val Asn Ile Ile Leu Ala Val Cys Leu Ala Met
        375                 380                 385

ACG GTG TTA GTT ACT AAG TCC GCC GAA CAC TTC CGT GAT AGC CAC      1275
Thr Val Leu Val Thr Lys Ser Ala Glu His Phe Arg Asp Ser His
        390                 395                 400

CAT ATT ATG GGC TCC GCC GTC CCT CCG CCG CCG CCT GCT GGT GTT      1320
His Ile Met Gly Ser Ala Val Pro Pro Pro Pro Pro Ala Gly Val
        405                 410                 415

AAG GGT GGC GCT TTG GCT ATC TTT GCC GTT CTT GGT ATC CCT CTT      1365
Lys Gly Gly Ala Leu Ala Ile Phe Ala Val Leu Gly Ile Pro Leu
        420                 425                 430

GCG ATC ACT TTC AGT ATT CCT TTG GCC TTG GCG TCA ATC TTT TCA      1410
Ala Ile Thr Phe Ser Ile Pro Phe Ala Leu Ala Ser Ile Phe Ser
        435                 440                 445
```

```
GCA TCT TCC GGT TCA GGA CAA GGT CTT TCT CTA GGA GTT CTC AAC    1455
Ala Ser Ser Gly Ser Gly Gln Gly Leu Ser Leu Gly Val Leu Asn
        450                 455                 460

CTC GCC ATC GTT GTA CCC CAG ATG TTT GTG TCG GTA ACA AGT GGG    1500
Leu Ala Ile Val Val Pro Gln Met Phe Val Ser Val Thr Ser Gly
        465                 470                 475

CCA TGG GAT GCA ATG TTT GGT GGA GGA AAT TTG CCA GCA TTC GTG    1545
Pro Trp Asp Ala Met Phe Gly Gly Gly Asn Leu Pro Ala Phe Val
        480                 485                 490

GTG GGA GCT GTA GCA GCA ACA GCC AGT GCA GTT CTT TCA TTT ACA    1590
Val Gly Ala Val Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ser Phe Thr
        495                 500                 505

TTG TTG CCT TCT CCA CCC CCT GAA GCT AAA ATT GGT GGG TCC ATG    1635
Leu Leu Pro Ser Pro Pro Pro Glu Ala Lys Ile Gly Gly Ser Met
        510                 515                 520

GGT GGT CAT TAAGAAATTT AATACTACTC CGTACAATTT AAACCCAAAT        1684
Gly Gly His
        525

TAAAAATGAA AATGAAAATT TTTAACCCAT GTTCGTTACG TTGTAATTAG        1734

AGAGAAAAAT GATATATTGA ACGAAGCCGT TAATTTATGC TCCGTTCATC        1784

TTGTAATTCT TTTTCTCTCT GCTTTTTTTT TTTTTTTTTA ACGCGACGTG        1834

TTTTTGAGAT AAGGAAGGGC TAGATCGAGG ATGGGGGAAT TGGCAAGAAA        1884

TTGCTCGGGT ATAAATATTT ATCCCTCTTT GTAATTTTCA GTAACATTTA        1934

ATAGCCAGAA ATCAAAAAGT CAAGAAAAAT CGAAA                        1969
```

を有することを特徴とする請求項１記載のDNA。

【請求項３】

次のヌクレオチド配列（Seq－ID No.2）：

AAAA 4

```
ATG GAG AAT GGT ACA AAA AGA GAA GGT TTA GGG AAA CTT ACA GTT    49
Met Glu Asn Gly Thr Lys Arg Glu Gly Leu Gly Lys Leu Thr Val
                5                  10                  15

TCA TCT TCT CTA CAA GTT GAA CAG CCT TTA GCA CCA TCA AAG CTA    94
Ser Ser Ser Leu Gln Val Glu Gln Pro Leu Ala Pro Ser Lys Leu
            20                  25                  30

TGG AAA ATT ATA GTT GTA GCT TCC ATA GCT GCT GGT GTT CAA TTT   139
Trp Lys Ile Ile Val Val Ala Ser Ile Ala Ala Gly Val Gln Phe
        35                  40                  45

GGT TGG GCT CTT CAG CTC TCT TTG CTT ACA CCT TAT GTT CAA TTG   184
Gly Trp Ala Leu Gln Leu Ser Leu Leu Thr Pro Tyr Val Gln Leu
    50                  55                  60

CTC GGA ATT CCT CAT AAA TTT GCC TCT TTT ATT TGG CTT TGT GGA   229
Leu Gly Ile Pro His Lys Phe Ala Ser Phe Ile Trp Leu Cys Gly
65                  70                  75

CCG ATT TCT GGT ATG ATT GTT CAG CCA GTT GTC GGC TAC TAC AGT   274
Pro Ile Ser Gly Met Ile Val Gln Pro Val Val Gly Tyr Tyr Ser
            80                  85                  90

GAT AAT TGC TCC TCC CGT TTC GGT CGC CGC CGG CCA TTC ATT GCC   319
Asp Asn Cys Ser Ser Arg Phe Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Ala
        95                 100                 105
```

```
GCC GGA GCT GCA CTT GTT ATG ATT GCG GTT TTC CTC ATC GGA TTC   364
Ala Gly Ala Ala Leu Val Met Ile Ala Val Phe Leu Ile Gly Phe
                110                 115                 120

GCC GCC GAC CTT GGT CAC GCC TCC GGT GAC ACT CTC GGA AAA GGA   409
Ala Ala Asp Leu Gly His Ala Ser Gly Asp Thr Leu Gly Lys Gly
                125                 130                 135

TTT AAG CCA CGT GCC ATT GCC GTT TTC GTC GTC GGC TTT TGG ATC   454
Phe Lys Pro Arg Ala Ile Ala Val Phe Val Val Gly Phe Trp Ile
                140                 145                 150

CTT GAT GTT GCT AAC AAC ATG TTA CAG GGC CCA TGC AGA GCA CTA   499
Leu Asp Val Ala Asn Asn Met Leu Gln Gly Pro Cys Arg Ala Leu
                155                 160                 165

CTG GCT GAT CTC TCC GGC GGA AAA TCC GGC AGG ATG AGA ACA GCA   544
Leu Ala Asp Leu Ser Gly Gly Lys Ser Gly Arg Met Arg Thr Ala
                170                 175                 180

AAT GCT TTT TTC TCA TTC TTC ATG GCC GTC GGA AAC ATT CTG GGG   589
Asn Ala Phe Phe Ser Phe Phe Met Ala Val Gly Asn Ile Leu Gly
                185                 190                 195

TAC GCC GCC GGT TCA TAT TCT CAC CTC TTT AAA GTA TTC CCC TTC   634
Tyr Ala Ala Gly Ser Tyr Ser His Leu Phe Lys Val Phe Pro Phe
                200                 205                 210

TCA AAA ACC AAA GCC TGC GAC ATG TAC TGC GCA AAT CTG AAG AGT   679
Ser Lys Thr Lys Ala Cys Asp Met Tyr Cys Ala Asn Leu Lys Ser
                215                 220                 225

TGT TTC TTC ATC GCT ATA TTC CTT TTA CTC AGC TTA ACA ACC ATA   724
Cys Phe Phe Ile Ala Ile Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Thr Ile
                230                 235                 240
```

```
GCC TTA ACC TTA GTC CGG GAA AAC GAG CTC CCG GAG AAA GAC GAG   769
Ala Leu Thr Leu Val Arg Glu Asn Glu Leu Pro Glu Lys Asp Glu
                245                 250                 255

CAA GAA ATC GAC GAG AAA TTA GCC GGC GCC GGA AAA TCG AAA GTA   814
Gln Glu Ile Asp Glu Lys Leu Ala Gly Ala Gly Lys Ser Lys Val
                260                 265                 270

CCG TTT TTC GGT GAA ATT TTT GGG GCT TTG AAA GAA TTA CCT CGA   859
Pro Phe Phe Gly Glu Ile Phe Gly Ala Leu Lys Glu Leu Pro Arg
                275                 280                 285

CCG ATG TGG ATT CTT CTA TTA GTA ACC TGT TTG AAC TGG ATC GCG   904
Pro Met Trp Ile Leu Leu Leu Val Thr Cys Leu Asn Trp Ile Ala
                290                 300                 305

TGG TTT CCC TTT TTC TTA TAC GAT ACA GAT TGG ATG GCT AAG GAG   949
Trp Phe Pro Phe Phe Leu Tyr Asp Thr Asp Trp Met Ala Lys Glu
                310                 315                 320

GTT TTC GGT GGA CAA GTC GGT GAT GCG AGG TTG TAC GAT TTG GGT   994
Val Phe Gly Gly Gln Val Gly Asp Ala Arg Leu Tyr Asp Leu Gly
                325                 330                 335

GTA CGC GCT GGT GCA ATG GGA TTA CTG TTG CAA TCT GTG GTT CTA  1039
Val Arg Ala Gly Ala Met Gly Leu Leu Leu Gln Ser Val Val Leu
                340                 345                 350

GGG TTT ATG TCA CTT GGG GTT GAA TTC TTA GGG AAG AAG ATT GGT  1084
Gly Phe Met Ser Leu Gly Val Glu Phe Leu Gly Lys Lys Ile Gly
                355                 360                 370

GGT GCT AAG AGG TTA TGG GGA ATT TTG AAC TTT GTT TTG GCT ATT  1129
Gly Ala Lys Arg Leu Trp Gly Ile Leu Asn Phe Val Leu Ala Ile
                375                 380                 385
```

```
TGC TTG GCT ATG ACC ATT TTG GTC ACC AAA ATG GCC GAG AAA TCT  1174
Cys Leu Ala Met Thr Ile Leu Val Thr Lys Met Ala Glu Lys Ser
                390                 395                 400

CGC CAG CAC GAC CCC GCC GGC ACA CTT ATG GGG CCG ACG CCT GGT  1219
Arg Gln His Asp Pro Ala Gly Thr Leu Met Gly Pro Thr Pro Gly
                405                 410                 415

GTT AAA ATC GGT GCC TTG CTT CTC TTT GCC GCC CTT GGT ATT CCT  1264
Val Lys Ile Gly Ala Leu Leu Leu Phe Ala Ala Leu Gly Ile Pro
                420                 425                 430

CTT GCG GCA ACT TTT AGT ATT CCA TTT GCT TTG GCA TCT ATA TTT  1309
Leu Ala Ala Thr Phe Ser Ile Pro Phe Ala Leu Ala Ser Ile Phe
                435                 440                 445

TCT AGT AAT CGT GGT TCA GGA CAA GGT TTG TCA CTA GGA GTG CTC  1354
Ser Ser Asn Arg Gly Ser Gly Gln Gly Leu Ser Leu Gly Val Leu
                450                 455                 460

AAT CTT GCA ATT GTT GTA CCA CAG ATG TTG GTG TCA CTA GTA GGA  1399
Asn Leu Ala Ile Val Val Pro Gln Met Leu Val Ser Leu Val Gly
                465                 470                 475

GGG CCA TGG GAT GAT TTG TTT GGA GGA GGA AAC TTG CCT GGA TTT  1444
Gly Pro Trp Asp Asp Leu Phe Gly Gly Gly Asn Leu Pro Gly Phe
                480                 485                 490

GTA GTT GGA GCA GTT GCA GCT GCC GCG AGC GCT GTT TTA GCA CTC  1489
Val Val Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Ser Ala Val Leu Ala Leu
                495                 500                 505

ACA ATG TTG CCA TCT CCA CCT GCT GAT GCT AAG CCA GCA GTC GCC  1534
Thr Met Leu Pro Ser Pro Pro Ala Asp Ala Lys Pro Ala Val Ala
                510                 515                 520
```

```
ATG GGG CTT TCC ATT AAA TAATTACAAA AGAAGGAGAA GAACAACTTT      1582
Met Gly Leu Ser Ile Lys
                525

TTTTTAATAT TAGTACTTCT CTTTTGTAAA CTTTTTTTAT TTTAGAAAAC      1632

AAACATAACA TGGAGGCTAT CTTTACAAGT GGCATGTCCA TGTATCTTCC      1682

TTTTTTCATA AAGCTCTTTA GTGGAAGAAG AATTAGAGGA AGTTTCCTTT      1732

TAATTTCTTC CAAACAAATG GGGTATGTGT AGTTGTTTTC A               1773
```

を有することを特徴とする請求項１記載のDNA。

【請求項４】

請求項１から３までのいずれか１項記載のDNAを有することを特徴とするプラスミド。

【請求項５】

請求項４に記載のプラスミドpSK－S21（DSM7115）。

【請求項６】

原核細胞および真核細胞の形質転換のために、請求項４または５に記載のプラスミドを使用する方法。

【請求項７】

請求項１から３までのいずれか１項記載のDNAを有する双子葉植物。

【請求項８】

請求項１から３までのいずれか１項記載のDNAを有する細菌。

【請求項９】

スクロースを取込むことのできる細菌の製造のために請求項１から３までのいずれか１項記載のDNAを使用する方法。

【請求項１０】

変化した特異性を有する輸送体のDNAの製造のために、請求項１から３までのいずれか１項記載のオリゴ糖輸送体のDNAを使用する方法。

【請求項１１】

植物ゲノムから類似の配列を分離するために、請求項１から３までのいずれか１項記載のオリゴ糖輸送体のDNAを使用する方法。

【請求項１２】

細胞中のスクロース輸送体の合成を可能にする、翻訳可能ｍ－RNAの発現のために、請求項１から３までのいずれか１項記載のオリゴ糖輸送体のDNAを使用する方法。

【請求項１３】

細胞中の内在性スクロース輸送体を妨げる翻訳不可能ｍ－RNAの発現のために、請求項１から３までのいずれか１項記載のオリゴ糖輸送体のDNAを使用する方法。

【請求項１４】

原核細胞中での発現のために、かじ取エレメントと組合せて、請求項１から３までのいずれか１項記載のオリゴ糖輸送体のDNAを使用する方法。

【請求項１５】

植物オリゴ糖輸送体をコードする請求項１から３までのいずれか１項に記載のDNAを同定するための方法において、

ａ）　最初に、欠陥SUC2遺伝子を有する酵母株を、相同組換えにより製造し、次にこれから

ｂ）　植物細胞からのスクロースシンターゼ活性のための遺伝子で形質転換することにより、細胞内スクロースを切断しうる酵母株を抽出し、かつ

ｃ）　この菌株を、酵母細胞の発現ベクター中の植物cDNAライブラリーで形質転換することを特徴とする、植物オリゴ糖輸送体をコードする請求項１から３までのいずれか１項に記載のDNAを同定する方法。
【請求項１６】
植物オリゴ糖輸送体をコードする請求項１から３までのDNAの同定のための酵母株において、
ａ）　最初に、欠陥SUC2遺伝子を有する酵母株を、相同組換えにより製造し、次にこれから
ｂ）　植物細胞からのスクロースシンターゼ活性のための遺伝子で形質転換することにより、細胞内スクロースを切断しうる酵母株を抽出し、かつ
ｃ）　この菌株を、酵母細胞の発現ベクター中の植物cDNAライブラリーで形質転換することにより、製造および形質転換される、植物オリゴ糖輸送体をコードする請求項１から３までのDNAの同定のための酵母株。
【請求項１７】
請求項16に記載の酵母株YSH2.64－1A－SUSY（DSM7106）。
【請求項１８】
請求項16に記載の酵母株YSH2.64－1A－INV（DSM7105）。
【請求項１９】
スクロース輸送体の過剰発現のための双子葉植物の形質転換のために、プラスミドpSK－S21（DSM7115）から製造された、プラスミドpBinAR－S21を使用する方法。
【請求項２０】
スクロース輸送体の発現の“アンチセンス”阻止のための双子葉植物の形質転換のために、プラスミドpSK－P62から製造された、プラスミドpBinAR－P62－antiを使用する方法。
【請求項２１】
双子葉植物中において、貯蔵物質の形成を増加させるような、育種特性を改善する目的での、請求項１から３までのいずれか１項に記載のDNAを使用する方法。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、植物ゲノム中への導入が形質転換植物中の貯蔵物質の生成および輸送を変更するオリゴ糖輸送体のコーティング領域を有するDNA配列、これらDNA配列を有するプラスミド、細菌および植物、本発明の植物オリゴ糖輸送体のDNA配列の同定を可能にする酵母株の製造および形質転換方法、ならびに本発明のDNA配列の使用に関する。
多数の植物、たとえばジャガイモ中の貯蔵エネルギーに対する最も重要な形質転換代謝生成物はスクロースである。他種における他のオリゴ糖もこの役割を果たすことができる。たとえば食用アザミ（japanese　artichokes）においては、スタキオースである。
植物のエネルギー含量におけるオリゴ糖輸送の中心部分は、既に形質転換植物において示されており、該植物においてはインベルターゼの発現によりスクロースが単糖に分解され、その性質のかなりの変化を生じる（ヨーロッパ特許第442592号）。貯蔵物質の生成におけるスクロースの重要性のため、二糖の生合成または代謝の研究において多くの実験が実施された。ドイツ国特許第4213444号から、収穫された部分の貯蔵性の改善は、アポプラストのインベルターゼの発現により、エネルギー富有化合物の生成根のヘテロトロピック部分への伝達が阻止される形質転換ジャガイモにおいて達成することができることは公知である。
多くの努力にも拘らず、貯蔵物質、たとえば植物におけるオリゴ糖の分配機構は明らかにされておらず、それに影響を及ぼすために、光合成を行なう葉において生成されたスクロースがどのようにして植物の篩部の輸送路に到達するかおよび貯蔵器官、たとえばジャガイモの塊茎または種子からどのようにして取込まれるかはまだ未知である。テンサイ（Beta　unlgaris）の分離された葉組織細胞の細胞膜に対して、該膜を通るスクロースの輸送は人工的なpH勾配を設けることによって惹起することができかつ電気化学的電位を設けることによって激化することができることが証明された（Lemoine　&　Delrot（1989年）F

EBSletters 249:129～133）。スクロースの膜通過はミカエルス・メンテン速度論に従い、該速度論におけるスクロース輸送のKm値は約1mMである（Slone & Buckhout、1991年、Planta 183:484～589）。速度論のこの形は、輸送体タンパク質のかかわり合いを指示する。テンサイ、トウゴマ（Ricinus communis）およびシクラメン（Cyclamen persicum）に原形質膜に関する実験は、スクロースの輸送はプロトンの共輸送と関係があることを示した（Buckhout、1989年、Planta 178:393～399;Williams等、1990年、Planta182:540～545;Grimm等、1990年、Planta182:480～485）。共輸送の化学量論は1:1である（Bush.1990年、Planta Physicl 93:1590～1596）。しかし、植物細胞のプラスモジウムを介するスクロース輸送の機構は提案されている（Robards & Lucas、1990年、Ann Rev Planta Physicl 41:369～419）。細胞がスクロースを輸送路に分配させる活性輸送系の存在の認識にも拘らず、この種の性質を有するタンパク質はまだ知られていない。スクロースの存在および不在におけるテンサイの原形質膜のＮ－エチルマレインイミド染色において、ギャレット（Gaiiet）等（1989年、Biochem Biophys Acta 978:56～64）は、大きさ42kDaのタンパク質はスクロースと相互作用しうるという情報を得た。この大きさ範囲の原形質膜タンパク質の画分に対する抗体は、原形質膜を通るスクロースの輸送を阻止することができる（Lemoine等、1989年、Biochem Biophys Acta 978:65～71）。これとは異なり、膜を通るスクロースの輸送における62kDaタンパク質の関与に対する情報が、スクロース類似体、デスオキシアジドヒドロキシベンズアミドスクロースでの大豆タンパク質の光親和性標識によって得られた（Ripp等、1988年、Plant Physiol88:1435～1445）。スクロース輸送体のアミノ酸配列は知られていない。

ところで、オリゴ糖輸送体のコーディング領域を有しかつヌクレオチド配列に含有されているその情報が植物ゲノムへの配列組込みによってRNAの形成を許し、それにより、植物細胞中での新しいオリゴ糖輸送活性を惹起することができるかまたは固有のオリゴ糖輸送活性を発現することのできるDNA配列を記載する。オリゴ糖輸送体なる用語により、たとえばホウレンソウまたはジャガイモのような植物からのスクロース輸送体を表わす。

オリゴ糖輸送体のコーディング領域の同定は、酵母サッカロミセスセレビシェ（Saccharomyces cerevisiae）の特殊な突然変異体における発現により輸送体分子をコードする植物DNA配列の分離を許す方法によって実施される。この方法には、輸送体分子のコーディング領域が植物遺伝子ライブラリーから分離すべき物質を取込むことのできない適当な酵母突然変異体を用意すべきである。酵母突然変異体におけるカリウム輸送欠失の相補性に関する方法は既に公知である（Anderson等、1992年、Proc Natl Acad Sci USA89:3736～3740）。この方法においては、植物mRNAに対する酵母cDNA配列は、発現ベクターの使用により酵母突然変異体に発現される。細胞中へ輸送すべき物質を取込むことのできるこれらの酵母は発現ベクター中の輸送体分子のコーディング領域を含有する。しかし、公知方法は、酵母が突然変異によって遮断することのできる固有のスクロース輸送を有しないので、スクロース輸送体のコーディング領域の同定には有用ではない。酵母は細胞外スクロースを切断して、細胞からヘキソース輸送体を介して取込むことのできる切断インベルターゼをコードする。

植物オリゴ糖輸送体を同定するのに役立つ酵母株の製造および形質転換のためには：

ａ） 第一に、欠陥suc2遺伝子を有する酵母株を相同的組換えにより製造し、次いでこれから

ｂ） 植物細胞からのスクロースシンターゼ活性遺伝子で形質転換することにより、かつ

ｃ） この株を植物cDNAライブラリーで酵母細胞の発現ベクターに形質転換することによって、植物オリゴ糖輸送体をコードするDNA配列を同定する。

この方法から得られる、植物オリゴ糖輸送体同定のための酵母株は、たとえば酵母株YSH2.64－1A－SUSY（DSM7106）およびYSH2.64－1A（DSM7105）である。

酵母株YSH2.64－1A－SUSYを用いると、次の配列を有する植物スクロース輸送体のDNA配列が同定される。

ホウレンソウからのスクロース輸送体（seq.ID No.1）：

```
AAAAACACAC ACCCAAAAAA AAAACACTAC GACTATTTCA AAAAAAACAT TGTTACTAGA   60

AATCTTATT  ATG GCA GGA AGA AAT ATA AAA AAT GGT GAA AAT AAC          105
           Met Ala Gly Arg Asn Ile Lys Asn Gly Glu Asn Asn
           1               5                  10

AAG ATT GCG GGT TCT TCT CTT CAC TTA GAG AAG AAC CCA ACA ACT         150
Lys Ile Ala Gly Ser Ser Leu His Leu Glu Lys Asn Pro Thr Thr
        15                  20                  25

CCC CCC GAG GCC GAG GCT ACC TTA AAG AAG CTC GGC CTC GTG GCT         195
Pro Pro Glu Ala Glu Ala Thr Leu Lys Lys Leu Gly Leu Val Ala
        30                  35                  40

TCA GTA GCG GCC GGG GTT CAG TTC GGG TGG GCT TTA CAG CTC TCC         240
Ser Val Ala Ala Gly Val Gln Phe Gly Trp Ala Leu Gln Leu Ser
        45                  50                  55

CTA CTG ACC CCG TAC GTC CAA CTA CTG GGC ATT CCC CAC ACT TGG         285
Leu Leu Thr Pro Tyr Val Gln Leu Leu Gly Ile Pro His Thr Trp
        60                  65                  70

GCC GCC TAC ATC TGG TTG TGC GGC CCA ATC TCG GGG ATG ATT GTC         330
Ala Ala Tyr Ile Trp Leu Cys Gly Pro Ile Ser Gly Met Ile Val
        75                  80                  85
```

```
CAG CCA TTG GTC GGG TAC TAT AGT GAC CGG TGC ACC TCC CGC TTC        375
Gln Pro Leu Val Gly Tyr Tyr Ser Asp Arg Cys Thr Ser Arg Phe
        90                  95                  100

GGC CGA CGT CGC CCC TTC ATT GCA GCA GGG GCG GCT CTA GTG GCC        420
Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Ala Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala
        105                 110                 115

GTA GCG GTG GGG CTA ATC GGA TTC GCC GCC GAT ATC GGC GCA GCG        465
Val Ala Val Gly Leu Ile Gly Phe Ala Ala Asp Ile Gly Ala Ala
        120                 125                 130

TCG GGT GAT CCA ACG GGA AAC GTG GCA AAA CCC CGG GCC ATC GCG        510
Ser Gly Asp Pro Thr Gly Asn Val Ala Lys Pro Arg Ala Ile Ala
        135                 140                 145

GTG TTT GTG GTC GGG TTT TGG ATC CTC GAC GTG GCT AAC AAC ACC        555
Val Phe Val Val Gly Phe Trp Ile Leu Asp Val Ala Asn Asn Thr
        150                 155                 160

CTG CAA GGC CCA TGC AGG GCG TTG TTA GCA GAC ATG GCC GCC GGG        600
Leu Gln Gly Pro Cys Arg Ala Leu Leu Ala Asp Met Ala Ala Gly
        165                 170                 175

TCG CAA ACC AAA ACC CGG TAC GCT AAC GCC TTC TTC TCC TTC TTC        645
Ser Gln Thr Lys Thr Arg Tyr Ala Asn Ala Phe Phe Ser Phe Phe
        180                 185                 190

ATG GCG TTA GGA AAC ATC GGA GGG TAC GCC GCC GGT TCA TAC AGC        690
Met Ala Leu Gly Asn Ile Gly Gly Tyr Ala Ala Gly Ser Tyr Ser
        195                 200                 205

CGC CTC TAC ACG GTG TTC CCC TTT ACC AAA ACC GCC GCC TGC GAC        735
Arg Leu Tyr Thr Val Phe Pro Phe Thr Lys Thr Ala Ala Cys Asp
        210                 215                 220
```

```
GTC TAC TGC GCC AAT CTA AAA TCC TGC TTC TTC ATC TCC ATC ACA      780
Val Tyr Cys Ala Asn Leu Lys Ser Cys Phe Phe Ile Ser Ile Thr
        225                 230                 235

CTC CTA ATC GTC CTC ACA ATC CTA GCA CTT TCC GTC GTA AAA GAG      825
Leu Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu Ala Leu Ser Val Val Lys Glu
        240                 245                 250

CGT CAA ATC ACA ATC GAC GAA ATC CAA GAA GAA GAA GAC TTA AAA      870
Arg Gln Ile Thr Ile Asp Glu Ile Gln Glu Glu Glu Asp Leu Lys
        255                 260                 265

AAC AGA AAC AAT AGC AGC GGT TGT GCA AGA CTA CCG TTC TTC GGA      915
Asn Arg Asn Asn Ser Ser Gly Cys Ala Arg Leu Pro Phe Phe Gly
        270                 275                 280

CAA TTA ATA GGC GCT CTC AAA GAT CTA CCA AAA CCA ATG CTA ATC      960
Gln Leu Ile Gly Ala Leu Lys Asp Leu Pro Lys Pro Met Leu Ile
        285                 290                 295

CTA TTA CTA GTA ACA GCC CTA AAT TGG ATC GCA TGG TTT CCA TTC     1005
Leu Leu Leu Val Thr Ala Leu Asn Trp Ile Ala Trp Phe Pro Phe
        300                 305                 310

TTG TTG TTC GAT ACT GAT TGG ATG GGT AAA GAA GTG TAC GGT GGT     1050
Leu Leu Phe Asp Thr Asp Trp Met Gly Lys Glu Val Tyr Gly Gly
        315                 320                 325

ACA GTC GGA GAA GGT AAA TTG TAC GAC CAA GGA GTT CAT GCC GGT     1095
Thr Val Gly Glu Gly Lys Leu Tyr Asp Gln Gly Val His Ala Gly
        330                 335                 340

GCC TTA GGT CTG ATG ATT AAC TCC GTT GTC TTA GGT GTT ATG TCG     1140
Ala Leu Gly Leu Met Ile Asn Ser Val Val Leu Gly Val Met Ser
        345                 350                 355
```

```
TTG AGT ATT GAA GGT TTG GCT CGT ATG GTA GGC GGT GCT AAA AGG      1185
Leu Ser Ile Glu Gly Leu Ala Arg Met Val Gly Gly Ala Lys Arg
        360                 365                 370

TTA TGG GGA ATT GTC AAT ATT ATT CTT GCT GTT TGT TTA GCT ATG      1230
Leu Trp Gly Ile Val Asn Ile Ile Leu Ala Val Cys Leu Ala Met
        375                 380                 385

ACG GTG TTA GTT ACT AAG TCC GCC GAA CAC TTC CGT GAT AGC CAC      1275
Thr Val Leu Val Thr Lys Ser Ala Glu His Phe Arg Asp Ser His
        390                 395                 400

CAT ATT ATG GGC TCC GCC GTC CCT CCG CCG CCG CCT GCT GGT GTT      1320
His Ile Met Gly Ser Ala Val Pro Pro Pro Pro Pro Ala Gly Val
        405                 410                 415

AAG GGT GGC GCT TTG GCT ATC TTT GCC GTT CTT GGT ATC CCT CTT      1365
Lys Gly Gly Ala Leu Ala Ile Phe Ala Val Leu Gly Ile Pro Leu
        420                 425                 430

GCG ATC ACT TTC AGT ATT CCT TTG GCC TTG GCG TCA ATC TTT TCA      1410
Ala Ile Thr Phe Ser Ile Pro Phe Ala Leu Ala Ser Ile Phe Ser
        435                 440                 445

GCA TCT TCC GGT TCA GGA CAA GGT CTT TCT CTA GGA GTT CTC AAC      1455
Ala Ser Ser Gly Ser Gly Gln Gly Leu Ser Leu Gly Val Leu Asn
        450                 455                 460

CTC GCC ATC GTT GTA CCC CAG ATG TTT GTG TCG GTA ACA AGT GGG      1500
Leu Ala Ile Val Val Pro Gln Met Phe Val Ser Val Thr Ser Gly
        465                 470                 475

CCA TGG GAT GCA ATG TTT GGT GGA GGA AAT TTG CCA GCA TTC GTG      1545
Pro Trp Asp Ala Met Phe Gly Gly Gly Asn Leu Pro Ala Phe Val
        480                 485                 490
```

```
GTG GGA GCT GTA GCA GCA ACA GCC AGT GCA GTT CTT TCA TTT ACA   1590
Val Gly Ala Val Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ser Phe Thr
        495                 500                 505

TTG TTG CCT TCT CCA CCC CCT GAA GCT AAA ATT GGT GGG TCC ATG   1635
Leu Leu Pro Ser Pro Pro Glu Ala Lys Ile Gly Gly Ser Met
    510                 515                 520

GGT GGT CAT TAAGAAATTT AATACTACTC CGTACAATTT AAACCCAAAT      1684
Gly Gly His
525

TAAAAATGAA AATGAAAATT TTTAACCCAT GTTCGTTACG TTGTAATTAG      1734

AGAGAAAAAT GATATATTGA ACGAAGCCGT TAATTTATGC TCCGTTCATC      1784

TTGTAATTCT TTTTCTCTCT GCTTTTTTTT TTTTTTTTTA ACGCGACGTG      1834

TTTTTTGAGAT AAGGAAGGGC TAGATCGAGG ATGGGGGAAT TGGCAAGAAA     1884

TTGCTCTCGGGT ATAAATATTT ATCCCTCTTT GTAATTTTCA GTAACATTTA     1934

ATAGCCAGAA ATCAAAAAGT CAAGAAAAAT CGAAA                      1969
```

ジャガイモからのスクロース輸送体（Seq－ID No.2）：

```
                                                    AAAA      4

ATG GAG AAT GGT ACA AAA AGA GAA GGT TTA GGG AAA CTT ACA GTT   49
Met Glu Asn Gly Thr Lys Arg Glu Gly Leu Gly Lys Leu Thr Val
  5                  10                  15
```

```
TCA TCT TCT CTA CAA GTT GAA CAG CCT TTA GCA CCA TCA AAG CTA     94
Ser Ser Ser Leu Gln Val Glu Gln Pro Leu Ala Pro Ser Lys Leu
                20                  25                  30

TGG AAA ATT ATA GTT GTA GCT TCC ATA GCT GCT GGT GTT CAA TTT    139
Trp Lys Ile Ile Val Val Ala Ser Ile Ala Ala Gly Val Gln Phe
                35                  40                  45

GGT TGG GCT CTT CAG CTC TCT TTG CTT ACA CCT TAT GTT CAA TTG    184
Gly Trp Ala Leu Gln Leu Ser Leu Leu Thr Pro Tyr Val Gln Leu
                50                  55                  60

CTC GGA ATT CCT CAT AAA TTT GCC TCT TTT ATT TGG CTT TGT GGA    229
Leu Gly Ile Pro His Lys Phe Ala Ser Phe Ile Trp Leu Cys Gly
                65                  70                  75

CCG ATT TCT GGT ATG ATT GTT CAG CCA GTT GTC GGC TAC TAC AGT    274
Pro Ile Ser Gly Met Ile Val Gln Pro Val Val Gly Tyr Tyr Ser
                80                  85                  90

GAT AAT TGC TCC TCC CGT TTC GGT CGC CGC CGG CCA TTC ATT GCC    319
Asp Asn Cys Ser Ser Arg Phe Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Ala
                95                 100                 105

GCC GGA GCT GCA CTT GTT ATG ATT GCG GTT TTC CTC ATC GGA TTC    364
Ala Gly Ala Ala Leu Val Met Ile Ala Val Phe Leu Ile Gly Phe
               110                 115                 120

GCC GCC GAC CTT GGT CAC GCC TCC GGT GAC ACT CTC GGA AAA GGA    409
Ala Ala Asp Leu Gly His Ala Ser Gly Asp Thr Leu Gly Lys Gly
               125                 130                 135

TTT AAG CCA CGT GCC ATT GCC GTT TTC GTC GTC GGC TTT TGG ATC    454
Phe Lys Pro Arg Ala Ile Ala Val Phe Val Val Gly Phe Trp Ile
               140                 145                 150
```

```
CTT GAT GTT GCT AAC AAC ATG TTA CAG GGC CCA TGC AGA GCA CTA   499
Leu Asp Val Ala Asn Asn Met Leu Gln Gly Pro Cys Arg Ala Leu
                155                 160                 165

CTG GCT GAT CTC TCC GGC GGA AAA TCC GGC AGG ATG AGA ACA GCA   544
Leu Ala Asp Leu Ser Gly Gly Lys Ser Gly Arg Met Arg Thr Ala
                170                 175                 180

AAT GCT TTT TTC TCA TTC TTC ATG GCC GTC GGA AAC ATT CTG GGG   589
Asn Ala Phe Phe Ser Phe Phe Met Ala Val Gly Asn Ile Leu Gly
                185                 190                 195

TAC GCC GCC GGT TCA TAT TCT CAC CTC TTT AAA GTA TTC CCC TTC   634
Tyr Ala Ala Gly Ser Tyr Ser His Leu Phe Lys Val Phe Pro Phe
                200                 205                 210

TCA AAA ACC AAA GCC TGC GAC ATG TAC TGC GCA AAT CTG AAG AGT   679
Ser Lys Thr Lys Ala Cys Asp Met Tyr Cys Ala Asn Leu Lys Ser
                215                 220                 225

TGT TTC TTC ATC GCT ATA TTC CTT TTA CTC AGC TTA ACA ACC ATA   724
Cys Phe Phe Ile Ala Ile Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Thr Ile
                230                 235                 240

GCC TTA ACC TTA GTC CGG GAA AAC GAG CTC CCG GAG AAA GAC GAG   769
Ala Leu Thr Leu Val Arg Glu Asn Glu Leu Pro Glu Lys Asp Glu
                245                 250                 255

CAA GAA ATC GAC GAG AAA TTA GCC GGC GCC GGA AAA TCG AAA GTA   814
Gln Glu Ile Asp Glu Lys Leu Ala Gly Ala Gly Lys Ser Lys Val
                260                 265                 270

CCG TTT TTC GGT GAA ATT TTT GGG GCT TTG AAA GAA TTA CCT CGA   859
Pro Phe Phe Gly Glu Ile Phe Gly Ala Leu Lys Glu Leu Pro Arg
                275                 280                 285
```

```
CCG ATG TGG ATT CTT CTA TTA GTA ACC TGT TTG AAC TGG ATC GCG   904
Pro Met Trp Ile Leu Leu Leu Val Thr Cys Leu Asn Trp Ile Ala
                290                 300                 305

TGG TTT CCC TTT TTC TTA TAC GAT ACA GAT TGG ATG GCT AAG GAG   949
Trp Phe Pro Phe Phe Leu Tyr Asp Thr Asp Trp Met Ala Lys Glu
                310                 315                 320

GTT TTC GGT GGA CAA GTC GGT GAT GCG AGG TTG TAC GAT TTG GGT   994
Val Phe Gly Gly Gln Val Gly Asp Ala Arg Leu Tyr Asp Leu Gly
                325                 330                 335

GTA CGC GCT GGT GCA ATG GGA TTA CTG TTG CAA TCT GTG GTT CTA  1039
Val Arg Ala Gly Ala Met Gly Leu Leu Leu Gln Ser Val Val Leu
                340                 345                 350

GGG TTT ATG TCA CTT GGG GTT GAA TTC TTA GGG AAG AAG ATT GGT  1084
Gly Phe Met Ser Leu Gly Val Glu Phe Leu Gly Lys Lys Ile Gly
                355                 360                 370

GGT GCT AAG AGG TTA TGG GGA ATT TTG AAC TTT GTT TTG GCT ATT  1129
Gly Ala Lys Arg Leu Trp Gly Ile Leu Asn Phe Val Leu Ala Ile
                375                 380                 385

TGC TTG GCT ATG ACC ATT TTG GTC ACC AAA ATG GCC GAG AAA TCT  1174
Cys Leu Ala Met Thr Ile Leu Val Thr Lys Met Ala Glu Lys Ser
                390                 395                 400
CGC CAG CAC GAC CCC GCC GGC ACA CTT ATG GGG CCG ACG CCT GGT  1219
Arg Gln His Asp Pro Ala Gly Thr Leu Met Gly Pro Thr Pro Gly
                405                 410                 415

GTT AAA ATC GGT GCC TTG CTT CTC TTT GCC GCC CTT GGT ATT CCT  1264
Val Lys Ile Gly Ala Leu Leu Leu Phe Ala Ala Leu Gly Ile Pro
                420                 425                 430
```

```
CTT GCG GCA ACT TTT AGT ATT CCA TTT GCT TTG GCA TCT ATA TTT  1309
Leu Ala Ala Thr Phe Ser Ile Pro Phe Ala Leu Ala Ser Ile Phe
                435                 440                 445

TCT AGT AAT CGT GGT TCA GGA CAA GGT TTG TCA CTA GGA GTG CTC  1354
Ser Ser Asn Arg Gly Ser Gly Gln Gly Leu Ser Leu Gly Val Leu
                450                 455                 460

AAT CTT GCA ATT GTT GTA CCA CAG ATG TTG GTG TCA CTA GTA GGA  1399
Asn Leu Ala Ile Val Val Pro Gln Met Leu Val Ser Leu Val Gly
                465                 470                 475

GGG CCA TGG GAT GAT TTG TTT GGA GGA GGA AAC TTG CCT GGA TTT  1444
Gly Pro Trp Asp Asp Leu Phe Gly Gly Gly Asn Leu Pro Gly Phe
                480                 485                 490

GTA GTT GGA GCA GTT GCA GCT GCC GCG AGC GCT GTT TTA GCA CTC  1489
Val Val Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Ser Ala Val Leu Ala Leu
                495                 500                 505

ACA ATG TTG CCA TCT CCA CCT GCT GAT GCT AAG CCA GCA GTC GCC  1534
Thr Met Leu Pro Ser Pro Pro Ala Asp Ala Lys Pro Ala Val Ala
                510                 515                 520

ATG GGG CTT TCC ATT AAA TAATTACAAA AGAAGGAGAA GAACAACTTT    1582
Met Gly Leu Ser Ile Lys
                525

TTTTTAATAT TAGTACTTCT CTTTTGTAAA CTTTTTTTAT TTTAGAAAAC      1632

AAACATAACA TGGAGGCTAT CTTTACAAGT GGCATGTCCA TGTATCTTCC      1682

TTTTTTCATA AAGCTCTTTA GTGGAAGAAG AATTAGAGGA AGTTTCCTTT      1732

TAATTTCTTC CAAACAAATG GGGTATGTGT AGTTGTTTTC A               1773
```

同定されたDNA配列はプラスミドに導入し、これにより真核細胞における発現のためのかじ取エレメント（Steering element）と結合することができる（例５参照）。これらのかじ取りエレメントは一方では転写プロモーターであり、他方では転写ターミネーターである。プラスミドに含有されている本発明のDNA配列を用いると、真核細胞を、細胞内でのスクロース輸送体合成を可能にする翻訳可能なmRNA発現の目的でまたは細胞内での固有のスクロース輸送体の合成阻止の目的で、形質転換することができる。オリゴ糖輸送体の発明的配列に相当するRNAの発現によって、植物炭水化物代謝の変更が可能であり、該変更は、収穫された部分における貯蔵物質の分配の改善が農業植物の収量増加を生じる点で重要である。個々の器官における貯蔵物質の取込み強制の可能性により、植物全体の変更

が可能となり、これによって個々の組織、たとえば葉の成長が低下し、収穫される部分の成長が増加する。このため、収穫物の栄養期を延長し、貯蔵物質の形成を増加することを想定することができる。
双子葉および単子葉植物の遺伝変更方法は既に公知である（たとえばGrsser,C,S,Fraley,R.T.、1989年、Science244:1293～1299;Potrykus,1991、Ann Rev Plant Mol Biol Plant Rhysicl 42:205～225参照）。植物における発現のためには、コーディング配列は転写調節エレメントと共役しなければならない。プロモーターと呼ばれるかかるエレメントは公知である（ヨーロッパ特許第375091号）。
さらに、コーディング領域は、該領域を正確に転写することのできる転写終結シグナルを備えていなければならない。かかるエレメントも記載されている（Gielen等、1989年、EMBO J8:23～29）。転写出発領域は、宿主植物に対して天然および／または相同ならびに異種および／または異型の双方であってもよい。必要に応じ、終結領域は相互に交換可能である。転写出発および終結領域は合成により形成するかまたは天然に得ることができるか、または合成および天然DNA成分の混合物から得ることができる。高級植物における異種遺伝子の導入のためには、E.コリの複製シグナルおよび転写された細胞の選択が可能な遺伝標識を含有する多数のクローニングベクターが利用しうる。かかるベクターの例は、pBR322、pUCシリーズ、M13mpシリーズ、pACYC184等である。植物中へ所望の遺伝子を導入する方法に依存して、他のDNA配列も適当である。たとえば植物細胞を形質転換するためにTi－プラスミドまたはRi－プラスミドを使用する場合には、導入される遺伝子に、フランキング領域として、Ti－およびRi－プラスミドＴ－DNAの少なくとも右境界が付着されるが、しばしば右および左境界が付着される。植物細胞の形質転換のためのＴ－DNAの使用は集中的に研究され、ヨーロッパ特許第120516号;Hoekama,In:The Binary Plant Vector System;Offset－drukkerij Kanters B.V.Alblasserdam、（1985年）、Ｖ章;Fraley等,Crit.Rev.Plant Sci.,4:1～46およびAn等（1985年）EMBO J.4:277～287に十分に記載されている。一度、導入されたDNAがゲノム中に組込まれると、一般に安定であり、もとの形質転換された細胞の子孫中にも残留する。通常、選択マーカーを含有し、これがカナマイシンG418、プレオマイシン、ハイグロマイシンまたはホスフィノトリシン等のような生物致死剤または抗生物質に対し形質転換された植物細胞中で耐性を惹起する。従って、使用される個々のマーカーは、導入されたDNAを欠如する細胞から形質転換された細胞の選択が可能である。
植物宿主細胞中へDNAを導入するためには、アグロバクテリウム菌を用いる形質転換のほかに、多数の他の技術が利用しうる。これらの技術は、プロトプラスト、DNAのマイクロ注入およびエレクトロポレーション、ならびにバリスティック法（ballistic met－hods）およびウイルス感染を包含する。形質転換された植物材料から植物全体を、選択のための抗生物質または生物致死剤を含有する適当な培地中で再生することができる。次に、得られた植物は、導入されたDNAの存在を調べることができる。注入およびエレクトロポレーションにおいてプラスミドに対して特殊な要求は加えられない。たとえばpUC誘導体のような簡単なプラスミドを使用することができる。しかし、かかる形質転換された細胞から植物全体を再生する場合には、選択可能なマーカー遺伝子の存在が必要である。形質転換された細胞は植物中で普通に成長する（McCormick等（1986年）Plant Cell Reports 5:81～84参照）。これらの植物は普通に成長しかつ同じかまたは異なる形質転換遺伝子を有する植物と交雑することができる。得られるハイブリッド個体は相応する表現型特性を有する。
本発明のDNA配列はプラスミドに導入することもでき、これにより原核細胞における発現のためにかじ取エレメントと結合することもできる。さらに、細菌からの原核マクロース輸送体の翻訳可能なRNAの形成は、原核生物および真核生物の膜構造における著しい相違にも拘らず、意外にもスクロースを取込みうる原核生物を生じる。これにより、比較的廉価な基質スクロース上で成長しうる工業的に重要な株の生産が可能となる（例５参照）。たとえば細菌アルカリゲネスユートロフス（Alkaligenes eutrophus）中でのポリヒドロキシ酪酸の製造が記載されている（Steinbuechel & Schubert、1989年、Arch Microb

iol153:101～104）。しかし、細菌単独では使用される基質選択が非常に制限される。そゆ故、なかんずくアルカリゲネスユーロフス中でのスクロース輸送体の遺伝子の発現は、極めて重要である。
本発明のDNA配列は、原核または真核系中でのDNA配列の組換えによる配列変更または突然変異誘発を許すプラスミド中へ導入することもできる。こうして、スクロース輸送体の特異性を変更することができる。
標準方法（Sambrook等、1989年、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、２版、Cold Spring Harbor Press、NY,USA）を使用することにより、塩基交換を実施することができるか、または天然または合成配列を加えることができる。DNAフラグメントを互いに結合するためには、該フラグメントに対しアダプターまたはリンカーを導入することができる。さらに、適当な制限切断部位の形成または過剰のDNAまたは制限切断部位を除去する操作を実施することができる。たとえばトランジションおよびトランスバージョンのような挿入、欠失または置換を実施すべき場合には、成体内突然変異誘発、プライマー修復または連結反応を使用することができる。合成方法には、一般に配列分析、制限分析および他の生化学的分子生物学的分析方法を使用することができる。各操作後、使用したDNA配列を切断し、他のDNA配列と結合することができる。各プラスミド配列は、同じかまたは異なるプラスミド中へクローニングすることができる。
本発明のDNA配列およびプラスミドの誘導体または部分は、原核および真核細胞の形質転換のために使用することもできる。さらに、本発明のDNA配列は、スクロースまたは他のオリゴ糖輸送体分子をコードする種々の種の植物のゲノムにおける類似配列を分離する標準方法によって使用することができる。これらの配列を用いると、植物細胞を形質転換するための、形質転換した植物中での輸送法を変更する構築を形成することができる。
関連したDNA配列を特定するためには、まず、植物型の遺伝子中の含量または植物型における遺伝子の発現に代表的な遺伝子ライブラリーを製造しなければならない。前者はゲノムライブラリーであり、後者はcDNAライブラリーである。これから、関連する配列を、プローブとして本発明のDNA配列を使用して分離することができる。いったん関連する遺伝子を確認し、分離すれば、配列の決定およびこの配列からコードされたタンパク質の性質の分析が可能である。
本発明の基礎を形成する実施例を理解するため、これらの試験のために必要で自体公知のすべての方法を列挙する：
1.クローニング法
クローニングのためには、λファージZAP IIならびにベクターpBluescriptsk（Short等、1988年、Nucl Acids Res.16:7583～7600）が使用された。
酵母の形質転換のためにはベクターYIplac128およびYEplac112（Gietz & Sugino、1988年、Gene74:527～534）が使用された。
植物形質転換のためには、２成分ベクターpBinAR（Hoefgen & Willmitzer、1990年、Plant Sci66:221～230）中の遺伝子構築がクローニングされた。
2.細菌および酵母株
pBbluescriptskベクターならびにpBinAR構築のためには、E.コリ菌株XL1blue（Bullock等、1987年、Biotechniques、５、376～378）が使用された。
本発明の酵母株YSH2.64－1A－susy製造のため出発株としては、株YSH2.64－1A（Gozalbo & Hohmann、1990年、Curr Genet17:77～79）が使用された。
ジャガイモ植物中のプラスミドの形質転換は、アグロバクテリウムツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）菌株LBA4404（Bevan（1984年）Nucl Acids Res12:8711～8720）を使用して実施された。
3.アグロバクテリウム ツメファシエンスの形質転換
アグロバクテリウム属菌中でのDNAの伝達は、ヘフゲン（Hoefgen）およびウイルミッツァー（Willmitzer）（1988年、Nucleic Acids Res16:9788）の方法による直接形質転換によって実施された。形質転換されたアグロバクテリウムのプラスミドDNAは、バーンボイム（Birnboim）およびドーリイ（Doly）（（1979年）Nucl Acids Res7:1513～1523）の

方法により分離され、適当な制限切断後、ゲル電気泳動によって分析された。
4.植物形質転換
無菌ジャガイモ栽培の、スカルペル（Scalpel）で傷をつけた小さい葉を、アグロバクテリウム　ツメファシエンス30～50μlを含有する、スクロース２％を有するMS培地10mlに入れ、夜どおし、選択下培養成長させた。３～５分の穏和な振とうの後、葉を、グルコース1.6%、ゼアチンリボース2mg/l、ナフチル酢酸0.02mg/l、ジベレリン酸0.02mg/l、クラホラン（Claforan）500mg/l、カナマイシン50mg/lおよびバクトアガール0.8%のMS培地上に塗布した。25℃、300ルックスで１週間の保温後、培地中のクラホラン濃度は半分に減少した。
寄　託
次のプラスミドおよび酵母株は、1992年６月12日にドイツ国ブラウンシュワイグ在ドイツ微生物収蔵所（Deutsche　Sammlung　vor　Mikroorganismen（DSM）に寄託された（寄託番号）：
プラスミド　pSK－S21（DSM7115）
酵母株　　YSH2.64－1A－SUSY（DSM7106）
酵母株　　YSH2.64－1A－INV（DSM7105）
図面の説明
図　1
酵母細胞中でのスクロース取込みのタイムパターン
“pmol/mg細胞”＝酵母細胞の含湿重量mgに対する、^{14}C標識スクロースの量pmolであり；“112"＝出発株（輸送体なし）を表わし；“＋グルコース”＝10mMグルコースの培地中での細胞の前保温を表わし；“－グルコース”＝細胞の前保温なしを表わし；“2.5μHCCCP"＝濃度2.5μMの阻害剤カルボニルシアニドm－クロロフェニルヒドラゾン（CCCP）との共保温を表わし；“500μMPCMBS"＝濃度500μMの阻害剤ｐ－クロロメルクリベンゼンスルホン酸（PCMBS）との共保温を表わし；“10μMアンチマイシン”＝濃度10μMの阻害剤アンチマイシンとの共保温を表わす。
図　2
プラスミドpMA5－INVのクローニング。pSEYC306－１からの大きさ2.4kbのHing IIIフラグメントのpMA5－10中への挿入を示す。
図　3
プラスミドpBinAR－S21を示す。
図中：
CaMV35sプロモーター：カリフラワーモザイクウイルスの35sRNAの遺伝子のプロモーター
A:ホウレンソウ中のスクロース輸送体のコーディング領域、読取り方向に配向
OCS:アグロバクテリウムツメファシエンスからのオクトピンシンターゼのターミネーター
Sma I.Not I,BamH I:制限酵素の切断位置
図　4:
プラスミドpBinAR－P62－antiを示す。
図中：
CaMV35sプロモーター：カリフラワーモザイクウイルスの遺伝子のプロモーター
OCS:アグロバクテリウムツメファシエンスからのオクトピンシンターゼのターミネーター
Sma I.Not I,BamH I,Xba I:制限酵素の切断位置
図　5:
葉中の種々の炭水化物のBinAR－P62－anti形質転換体の含量
図中：
fru:フルクトース
suc:スクロース
sta:デンプン
control:形質転換されてない出発物質
sp－５～sp－43:個々の数字を有する形質転換体

図　6:
BinAR－P62－anti形質転換体のペチオール（petioles）からの炭水化物の流出
wt:野性型
sp－５ないしsp－43:個々の数字を有する形質転換体
次例は、酵母株の製造、同定ならびに植物スクロース輸送体の機能および用途を記載する。

例　1
酵母株YSH2.64－1A－SUSYおよびYSH2.64－1A－INVの調製
酵母株YSH2.64－1Aは特性suc－２－、malo、leu2、trp1を有する（Gozalbo　&　Hohmann、1990年、Curr　Genet17:77～79）。この株中にスクロース切断酵素活性を導入するために、酵母からのアルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子のプロモーターに融合するように、ジャガイモからのスクロースシンターゼのコーディング領域を含有する組込みプラスミドYIplac128A2－SUSYで形質転換した。プラスミドYIplac128A2－SUSYは次のように製造した。プラスミドYIplac128（Gietz　&　Sugino、1988年、Gene74:527～534）をPst IおよびEcoR Iで切断し、分解および／または突出する１本鎖中へ充填およびポリリンカーの領域中での連結反応によって短かくした。残存Spa I切断位置において、728pbカセットを、プラスミドpVT102U（Vernet等、1987年、Gene52:225～233）からのアルコールデヒドロゲナーゼのプロモーターを用いて挿入した。こうして、YIplac128A2が得られた。スクロースシンターゼのコーディング領域は、オリゴヌクレオチド

ＳＵＳＹ１

（GAGAGAGGATCCTGCAATGGCTGAACGTTTTTGACTCGTG）

および

ＳＵＳＹ２

（GAGAGAGGATCCTTCATTCACTCAGCAGCCAATGGAACAGCT）

とのポリメラーゼ連結反応によってジャガイモからのスクロースシンターゼのλクローンに増幅した（Salanoubat　&　Belliard、1987年、Gene60:47～56）。生成物から、コーディング領域をBamH Iフラグメントとして製造し、カセットのポリリンカーのBamH I切断部位に挿入した。酵母株YSH2.64－1Aは、こうして製造したプラスミドYIplac128A2－SUSYで形質転換した。このプラスミドは２μ領域を有しないので、酵母中で自律複製することはできない。それ故、かかる形質転換細胞だけが、ロイシン栄養要求性を獲得し、プラスミドDNAを少なくとも部分的に染色体的に組込む。
ロイシン独立栄養生物コロニーを、スクロースシンターゼ遺伝子の発現のために分析した。このために5ml液体培養の細胞をガラスモを加え激しく振とうすることにより分解し、次いで遠心分離した後、上澄みからの全タンパク質を、酵素活性測定のために加えた。発現されたスクロースシンターゼの活性は25mU/mgタンパク質を有する。
類似に、インベルターゼ活性を酵母株YSH2.64－1A中へ導入し、この中でプラスミドYIplac128A1－INVの助けにより、サイトゾルの切断不能のインベルターゼの遺伝子を酵母ゲノム中に染色体的に組込んだ。YIplac128A1－INVは、スクロースシンターゼのコーディング領域の代りに、遺伝子産物の輸出のためのシグナル配列を欠如するインベルターゼ遺伝子を含有する。プラスミドの前駆体はプラスミドYIplac128A1であり、このものはYIplac128A2とはアルコールデヒドゲナーゼ遺伝体のプロモーターを有するカセット中のポリリンカーの配向が異なる。このプラスミドのカセットは、プラスミドpVT100U（Vernet等、1987年、Gene52:225～233）から誘導される。このインベルターゼのコーディング領域は、suc2遺伝子のDNAにおいて、オリゴヌクレオチド

ＩＮＶ３

（GAGCTGCAGATGGCAAACGAAACTAGCGATAGACCTTTGGTCACA）

および

ＩＮＶ４

（GAGACTAGTTTATAACCTCTATTTTACTTCCCTTACTTGGAA）

とのポリメラーゼ連鎖反応によって得られた。コーディング領域は、Pst IおよびXba Iを使用して線形化ベクターYIplc128A1den中へ結合した。酵母細胞中に発現したインベルターゼ活性の酵素活性の試験は、酵素細胞からの全タンパク質1mgあたり68mUの酵素活性を生じた。

例　２

cDNA植物スクロース輸送体のクローニング

成長するホウレンソウおよびジャガイモ植物の葉組織からのポリアデニル化RNAから、λファージZAP IIライブラリー中のcDNAのライブラリーを製造した。500000PfuからDNAファージを製造し、塩化セシウムサルコシルグラジェントを使用して精製した。酵素Not IでDNAファージを切断した後、１％アガロースゲル上で上下1.5kbpの大きさ範囲からの挿入体を製造し、発現ベクターYEplc112A1NEのNot I切断部位で結合した。該ベクターは、ベクターYEplc112（Gozalbo　＆　Hohmznn、1990年、Curr　Gent17:77～79）の誘導体であり、それを用いて、例１に記載したように、ポリリンカーをアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターと交換した。カセットのポリリンカーは、再び酵素Pst IおよびXba Iで切断することにより除去し、Not IおよびEcoR I切断部位を導入する２本鎖オリゴヌクレオチドにより置換した
（配列：GATCCGCGGCCGCCCGGAATTCTCTAGACTGCA）。

E.コリ中での形質転換により、下方1.5kbpの大きさ範囲に対し約90000クローンおよび上方1.5kbpの大きさ範囲に対し約40000クローンが得られた。これらから、プラスミドDNAを製造した。２μgDNAを、酵母株YSH2.64－1Asuc－.susy中で14回形質転換した。形質転換細胞をグルコース２％を含有する媒地上で成長させ、それぞれ５～10,000を寒天平板液体培地で洗浄し、スクロース含有培地上に塗布した。急速に成長しえたこれらのクローンをさらに分析した。ベクターYEplac112A1NE中への形質転換体S21またはP62の挿入（YEplac112A1NE－S21）を配列決定した。配列は上記に記載されている。

例　３

スクロース代謝酵母形質転換体の分析

酵母形質転換体YEplac112A1NE－S21（例２において得られたものに一致）を、液体培地中で、培養が対数期に達するまで成長させた。培地を遠心分離した後、細胞を、グルコース含有培地中で５分間前保温し、次いで^{14}C標識スクロース含有培地中に入れた。標識スクロースの取込み量をチリロ（Cirillo）（1989年、Meth　Enzymol174:617～622）により記載された方法により測定した。グルコースとの前保温なしの標識スクロースの取込み量を、阻害剤カルボニルシアニドｍ－クロロフェニルヒドラゾン（CCCP）、ｐ－クロロメルクリベンゼンスルホン酸（PCMBS）およびアンチシアニンと同時保温したものと比較した。時間パターンは図１に示されている。阻害剤によるスクロース取込み量の減少計算値は表Ｉに示されている。標識スクロースの競合体として種々の糖を用いる比較実験（それから輸送体の特異性を読取ることができる）は表IIに示されている。

類似の測定を、酵母株YEplac112A1NE－P62を用いて実施した。

例　４

スクロース輸送体活性の発現のためのDNA配列を有する細菌菌株の形質転換

スクロースを取込み代謝しうるためには、単糖の酵素切断活性を有する細菌細胞が必要で

ある。かかる活性を導入するために、細菌をプラスミドpMA5－INVにより形質転換し、インベルターゼ活性を調べた。プラスミドpMA5－INVは次のように製造した。プラスミドpMA5－10（Stanssens等、1989年、Nucl Acids Res17:4441～4454）を、ポリリンカーのHind III切断部位で線形化した。プラスミドpSEYC306－１（Taussing & Carlson、1983、Nucl Acids Res11:1943～1954）の2.4kb Hind IIIフラグメントを、Hind III切断部位中へクローニングした。プラスミドの相応するカットアウトは表IIに示されている。プラスミドpMA5－INVで形質転換した細菌細胞中のインベルターゼの酵素活性を、ゲル電気泳動活性試験において公知方法で測定した。細菌細胞中での植物cDNAの発現による官能スクロース輸送体形成の可能性を、プラスミドpSK－S21でのE.コリの形質転換によって調べた。該プラスミドは例３に記載されている。pSK－S21での細菌細胞の形質転換後、スクロース取込み量の試験を実施した。

例 ５

スクロース輸送体のコーディング領域の過剰発現のための構築を有する植物の形質転換

ホウレンソウおよび／またはジャガイモからのスクロース輸送体のcDNAを挿入体として、含有するベクターYEplac112A1NE－S21およびYEplac112A1NE－P62（例２および例３参照）から、該挿入体をNot I切断後に分離し、プラスミドpBluescript－SKのNot切断部位に結合した（pSK－S21および／またはpSK－P62）。pSK－S21に対しては、挿入をSac I/Xba Iフラグメントとして行ない、突出する１本鎖DNA中に充填した後、あらかじめ酵素Sma IおよびXba Iで切断したpBinAR（Hoefgen & Willmitzer、1990年、Plant Sci66:221～230）中に“センス（Sense）”配向でクローニングした。得られるプラスミドpBinAR－S21（図３参照）は、スクロース輸送体を過剰発現（over－express）するため、植物の形質転換のために挿入することができる。pSK－P62に対しては、挿入体を1.7kb Not Iフラグメントとして分離し、２成分ベクターpBinARのSma I切断部位中へ“アンチセンス”配向でクローニングした（図４参照）。このプラスミドは、スクロース輸送体発現の“アンチセンス”阻止を目指す植物の形質転換のために適当である。

次いで、形質転換アグロバクテリアを、タバコおよびジャガイモの葉セグメントの感染のために使用した。

独立に得られた形質転換体（この中に組換えられていないもとのキメラタンパク質の存在がサザンブロッティング分析により証明された）を、スクロース、ヘキソースおよびデンプン含量における変化をそれぞれ調べた。

pBinAR－P62－antiからのＴ－DNAを含有する形質転換体は葉におけるデンプン、ヘキソースおよびスクロースの著しく増加した濃度を示した（図５参照）。植物から採取した葉柄からの炭水化物の流出は水性媒体中では著しく減少する（図６参照）。これらのデータから、光合成活性器官からの光同化体の輸送路のスクロース輸送体の有意性は明瞭に認められる。輸送体の活性阻止は炭水化物の輸送路を制限するので、これはたとえばプラスミドpBinAR－S21を用いる過剰発現の場合における貯蔵器官への光同化物の輸送低下から生じる。さらに、pBinAR－S21からのＴ－DNAが組込まれているタバコ植物は減少した頂芽優性を示す、つまり該植物はブシー成長（bushy growth）を示す。かかる表現型変化は、たとえばトマト植物において非常に望ましい。それ故、本発明のDNA配列（Seq ID No.1）を有するプラスミドpBinAR－S21はブシー成長のような重要な育種改善の目的で植物を変更するのに適当である。

表　I

阻害剤	スクロース輸送体*（%）
Control	100
0.5μM CCCP	65
2.5μM CCCP	21
25μM PCMBS	73
100μM PCMBS	21
25μM 2,4－DNP	61
100μM 2,4－DNP	9
1mM ヒ酸ナトリウム	34
10μM antimycin A	59
1m cAMP	102

CCCP＝カルボニルシアニドm－クロロフェニルヒドラゾン

PCMBS＝p－クロロメルクリベンゼンスルホン酸

2,4－DNP＝２，４－ジニトロフェノール

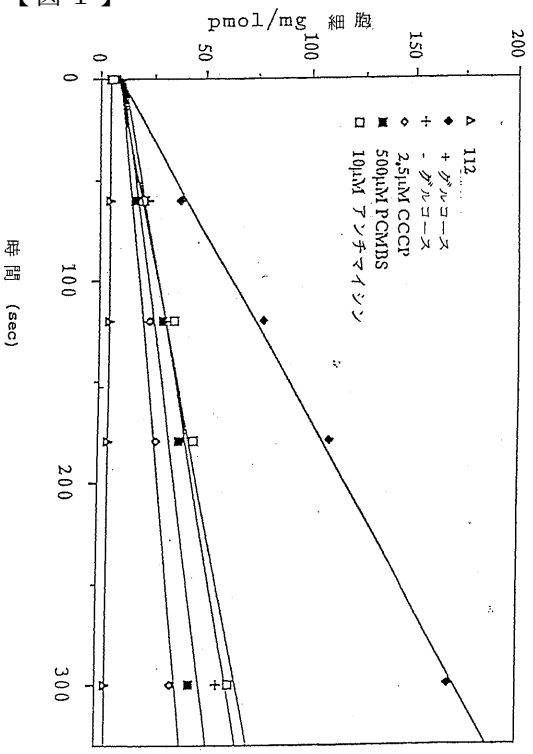
＊＝Y Eplas １１２ ＡＩＮＥ－Ｓ２１に関して（対照）

表　II

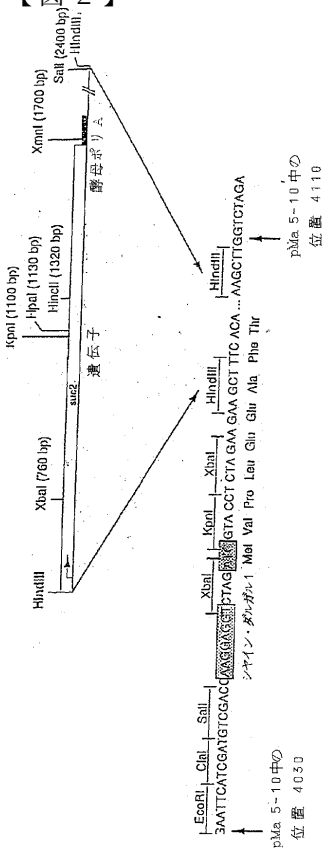
競合体	スクロース輸送*（%）
対　照	100
2mM　スクロース	28
2mM　マルトース	58
10mM　マルトース	37
2mM　フェニルグルコシド	7
2mM　フロリジン	16
2mM　ラクトース	91
10mM　パラチノース	102
10mM　トレハロース	103

* ＝ＹＥplac１１２ＡＩＮＥ－Ｓ２１に関して（対照）

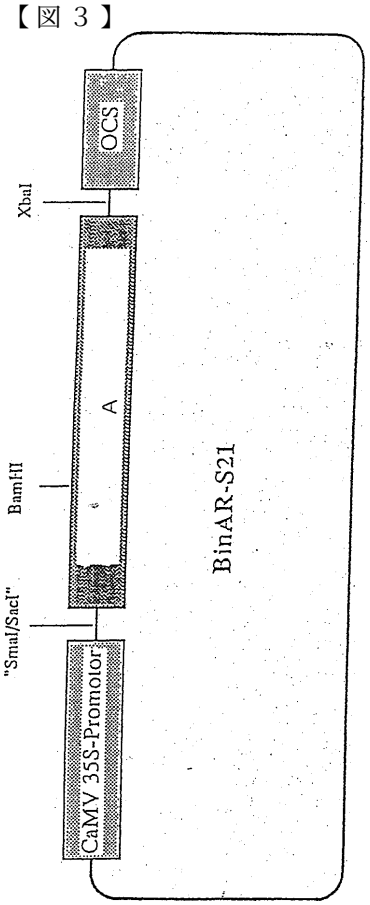
【図１】


pmol/mg 細胞
0
50
100
150
200
時間 (sec)
0
100
200
300
112
+ グルコース
- グルコース
2.5μM CCCP
500μM PCMBS
10μM アンチマイシン

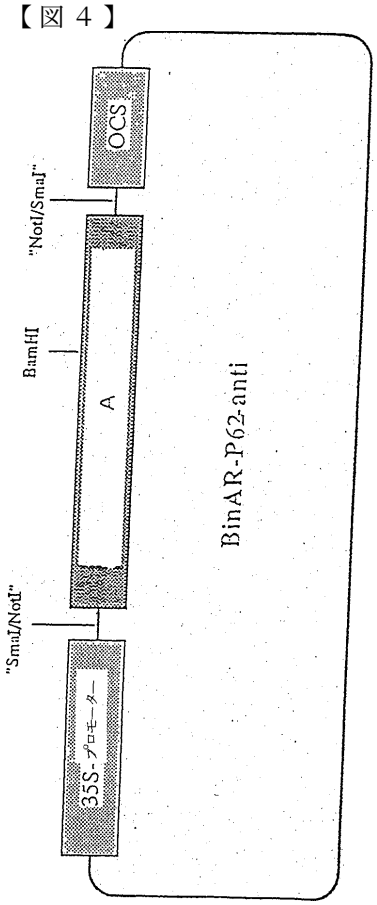
【図２】


Sal (2400 bp)
HindIII
XmaI (1700 bp)
KpnI (1100 bp)
HpaI (1130 bp)
HincII (1320 bp)
XbaI (760 bp)
HindIII
遺伝子
pMa 5-10中の
位置 4110
pMa 5-10中の
位置 4030

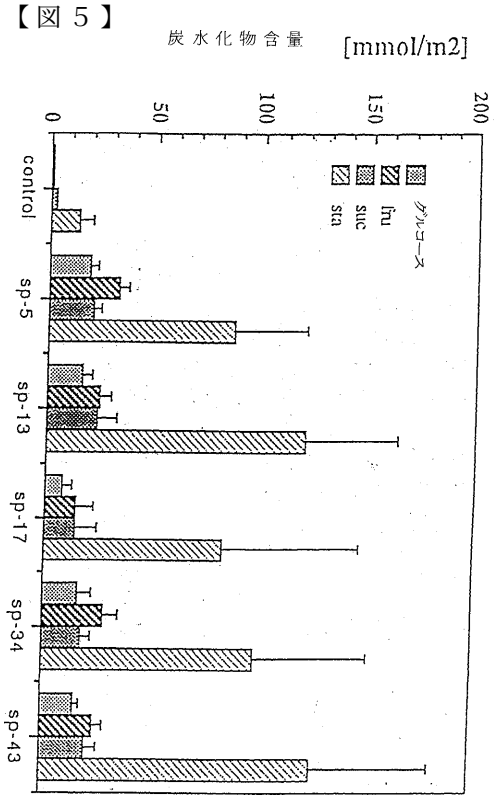
【図３】


OCS
XbaI
BamHI
"SmaI/SacI"
A
CaMV 35S-Promotor
BinAR-S21

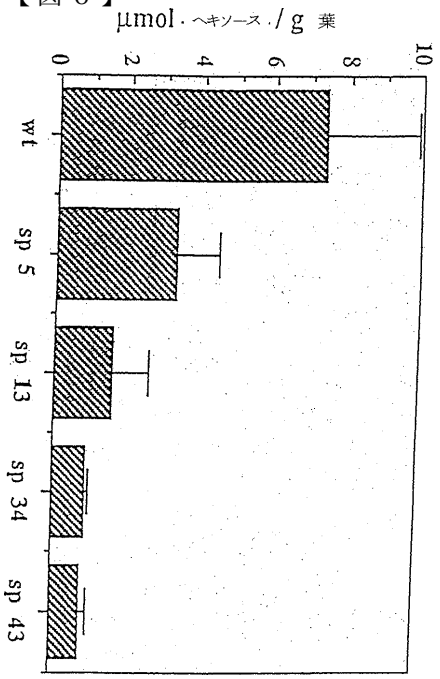
【図４】


OCS
"NotI/SmaI"
BamHI
"SmaI/NotI"
A
35S-プロモーター
BinAR-P62-anti

【図５】


炭水化物含量
[mmol/m2]
0
50
100
150
200
control
sp-5
sp-13
sp-17
sp-34
sp-43
グルコース
fru
suc
sta

【図６】


μmol・ヘキソース・/ g 葉
0
2
4
6
8
10
wt
sp 5
sp 13
sp 34
sp 43

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI	
Ｃ１２Ｒ	1:865)	Ｃ１２Ｒ	1:865
(Ｃ１２Ｎ	1/21	Ｃ１２Ｎ	1/21
Ｃ１２Ｒ	1:01)	Ｃ１２Ｒ	1:01
(Ｃ１２Ｎ	1/21	Ｃ１２Ｎ	1/21
Ｃ１２Ｒ	1:19)	Ｃ１２Ｒ	1:19

(72)発明者 フロマー, ヴォルフベルント
ドイツ連邦共和国 Ｄ－１０００ ベルリン １９ フリートベルクシュトラーセ ４５
(72)発明者 リースマイアー, イェルク
ドイツ連邦共和国 Ｄ－１０００ ベルリン ４１ シルトホルンシュトラーセ ７５

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 Plant Physiol.,Vol.99,No.1suppl.(1992.May)p.84
Plant Physiol.,Vol.89,No.4suppl.(1989)p.155

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)