



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I657141 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：102137008

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 05 月 07 日

(51)Int. Cl. : C12N15/05 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

(30)優先權：2006/09/13 世界智慧財產權組織 PCT/IB2006/04043

(71)申請人：22世紀有限公司(美國) 22ND CENTURY LIMITED, LLC (US)

美國

(72)發明人：橋本隆 HASHIMOTO, TAKASHI (JP)；梶川正孝 KAJIKAWA, MASTAKA (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2006/109197A2

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：21 共 102 頁

(54)名稱

菸鹼性生物鹼含量的增加

INCREASING LEVELS OF NICOTINIC ALKALOIDS

(57)摘要

可調整四種基因，A622、NBB1、PMT 及 QPT，以增加菸草(Nicotiana)植物中之菸鹼性生物鹼含量，以及在不產生菸鹼之植物及細胞中合成菸鹼性生物鹼。詳言之，使 A622、NBB1、PMT 及 QPT 中之一或多者過度表現可用來增加煙草植物中之菸鹼及菸鹼性生物鹼含量。不產生菸鹼之細胞可經遺傳工程處理以藉由過度表現 A622 及 NBB1 來產生菸鹼及相關化合物。

Four genes, A622, NBB1, PMT, and QPT, can be influenced for increasing nicotinic alkaloid levels in Nicotiana plants, as well as for synthesizing nicotinic alkaloids in non-nicotine producing plants and cells. In particular, overexpressing one or more of A622, NBB1, PMT, and QPT may be used to increase nicotine and nicotinic alkaloid levels in tobacco plants. Non-nicotine producing cells can be engineered to produce nicotine and related compounds by overexpressing A622 and NBB1.

指定代表圖：

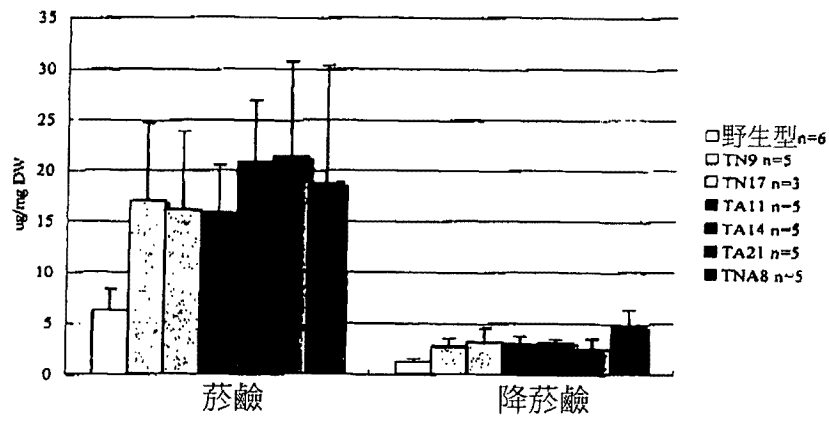


圖 6

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

菸鹼性生物鹼含量的增加

INCREASING LEVELS OF NICOTINIC ALKALOIDS

【技術領域】

本發明係關於分子生物學領域及調節菸鹼性生物鹼合成。因此，本發明尤其係關於用於增加煙草植物中之菸鹼性生物鹼含量之方法及構築體，且係關於經遺傳工程處理以產生菸鹼性生物鹼及相關化合物之細胞(當該等細胞另外並不產生菸鹼性生物鹼及相關化合物時)。

【先前技術】

目前，已知若干菸鹼生物合成酶。舉例而言，已選殖煙草喹啉酸磷酸核糖基轉移酶(QPT)基因，參見美國專利第6,423,520號及Sinclair等人，Plant Mol. Biol. 44: 603-17 (2000)，且抑制其提供在基因轉殖煙草植物中菸鹼顯著減少。Xie等人，Recent Advances in Tobacco Science 30: 17-37 (2004)。同樣地，已顯示抑制內源性腐胺甲基轉移酶(PMT)序列降低菸鹼含量但使新煙草鹼含量增加約2至6倍。Hibi等人，Plant Cell 6: 723-35 (1994)；Chintapakorn及Hamill, Plant Mol. Biol. 53:87-105 (2003)；Steppuhn等人PLoS Biol 2:8:e217:1074-1080 (2004)。

儘管先前研究工作已集中於使用菸鹼生物合成酶用於減少植物中之菸鹼，但極少研究已致力於菸鹼生物合成酶在增加菸鹼性生物鹼合成中的作用。此上調資料缺乏可歸因於過度表現已知菸鹼性生物鹼生物合成基因(諸如PMT或QPT)未必會增加植物產生次級代謝物及次

級代謝物集聚。亦即，其未必遵循：由於下調菸鹼性生物鹼生物合成基因減少生物鹼產生及集聚，因此過度表現相同菸鹼性生物鹼生物合成基因將增加菸鹼性生物鹼產生及集聚。

歸因於研究的貧乏性，對鑑別增加菸鹼生物合成及集聚之基因存在需要。舉例而言，由於菸鹼性生物鹼在保護植物抗昆蟲及草食動物中起重要作用，其可能有利地增加宿主植物中之菸鹼性生物鹼合成。就食草作用前景而言，菸鹼合成及集聚增加將提供環境上可接受之方法用於介導植物-害蟲相互作用。

就香煙工業前景而言，其中菸鹼為香煙中之身體上及心理上有活性之組份，可有利地藉由遺傳工程增加煙草中之菸鹼含量。調查研究證明當補充菸鹼自外部來源物理性添加至捲煙用煙草中時，吸煙者吸入更少之更有害的煙組份(諸如焦油及一氧化碳)。參見Armitage等人，*Psychopharmacology* 96: 447-53 (1988), Fagerström, *Psychopharmacology* 77: 164-67 (1982), Russell, *Nicotine and Public Health* 15: 265-84 (2000)；及Woodman等人，*European Journal of Respiratory Disease* 70; 316-21 (1987)。同樣地，由美國醫學研究所(Institute of Medicine of the U.S.)對潛在暴露減少產品(PREP)之報導得出結論 "使菸鹼保持於舒適或成癮的含量下同時減少煙草之更具毒性組份為用於減少損害的另一常規策略"。參見CLEARING THE SMOKE, ASSESSING THE SCIENCE BASE FOR TOBACCO HARM REDUCTION, IOM第29頁(2001)；通常稱為煙草工業之"IOM報導"。

除用於增加菸鹼產品(諸如香煙及其他煙草產品)之更傳統應用以外，新近藥理學研究表明菸鹼及相關化合物之治療作用。舉例而言，若干研究組目前正研究靶向菸鹼受體作為用於治療諸如阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、精神分裂症及年齡相關記憶喪失之認知障礙之方式的藥物。Singer, "The Upside to Nicotine," *Technology Review*

(2006年7月28日)。已證明乙醯膽鹼受體配位體(諸如菸鹼)對注意力、認知、食慾、物質濫用、記憶力、錐體外功能、心血管功能、疼痛及胃腸動力及功能具有作用。美國專利第5,852,041號。因此，菸鹼及相關化合物有治療效益，且由此對用於產生其之改良方法存在需要。

因此，對鑑別其他基因存在持續需要，可影響該等其他基因之表現以增加植物中之菸鹼性生物鹼含量、尤其普通煙草(*N. tabacum*)植物中之菸鹼，以及在不產生菸鹼之細胞中產生菸鹼及相關化合物。

【發明內容】

可調整四個基因(A622、NBB1、PMT及QPT)用於增加煙草植物中之菸鹼性生物鹼含量，以及在不產生菸鹼之細胞中合成菸鹼性生物鹼及相關化合物。

在一態樣中，本發明提供藉由相對於對照植物過度表現A622及NBB1中之至少一者來增加煙草植物中之菸鹼性生物鹼(諸如菸鹼)之方法。在一實施例中，過度表現A622。在另一實施例中，過度表現NBB1。在另一實施例中，過度表現A622及NBB1。在又一實施例中，過度表現A622及NBB1且過度表現QPT及PMT中之至少一者。在再一實施例中，過度表現QPT及A622。

在另一實施例中，菸鹼增加之植物及其產品係由過度表現A622、NBB1、PMT及QPT中之一或多者之任何方法來產生。在又一實施例中，產品係選自由香煙、藥品及保健食品組成之群。

在另一態樣中，本發明提供用於產生菸鹼性生物鹼之方法，其包含在另外並不產生菸鹼性生物鹼之植物或細胞中異源性表現NBB1及A622。在一實施例中，NBB1及A622表現在選自由細菌、酵母、絲狀真菌、海藻、哺乳動物及昆蟲細胞組成之群的細胞中發生。

在另一實施例中，菸鹼性生物鹼增加之植物係藉由在另外並不產生菸鹼性生物鹼之植物或細胞中異源性表現NBB1及A622來產生。

在另一實施例中，菸鹼性生物鹼產物係藉由在另外並不產生菸鹼性生物鹼之植物或細胞中異源性表現NBB1及A622來產生。

在另一態樣中，提供用於商業生產菸鹼性生物鹼之方法，其包含(a)提供複數個表現A622及NBB1之細胞及(b)自該複數個細胞獲得該菸鹼性生物鹼。

在另一態樣中，本發明提供用於增加植物中之菸鹼之方法，其包含相對於對照植物過度表現PMT及QPT。在一實施例中，產生菸鹼增加之植物。在另一實施例中，產生菸鹼增加之產物。

在另一態樣中，本發明提供產生NBB1酶之方法，其包含以編碼NBB1之經分離核酸分子使細胞轉型且使經轉型之細胞在藉以產生NBB1酶之條件下生長。在一實施例中，該經轉型之細胞係選自由細菌、酵母、絲狀真菌、海藻、綠色植物及哺乳動物細胞組成之群。

在另一態樣中，本發明提供用於增加煙草植物中之菸鹼及產量之方法，其包含：a)使菸鹼增加之煙草植物與高產煙草植物雜交；及b)選擇菸鹼及產量增加之煙草子代植物。在一實施例中，產生菸鹼及產量增加之植物。

在一實施例中，由以下步驟產生菸鹼增加之植物：a)以構築體使煙草植物轉型，該構築體在5'至3'方向上包含可操作地連接編碼增加菸鹼合成之酶之異源性核酸的啓動子；b)自該經轉型之植物再生基因轉殖煙草植物；及c)選擇相對於對照植物具有增加之菸鹼含量的基因轉殖煙草植物。在又一實施例中，核酸係選自由QPT、PMT、A622及NBB1組成之群。

在另一態樣中，本發明提供用於增加煙草植物中之菸鹼及產量之方法，其包含：(a)以(i)在5'至3'方向上包含可操作地連接編碼增加菸鹼合成之酶之異源性核酸之啓動子的第一構築體；及(ii)在5'至3'方向上包含可操作地連接編碼增加產量之酶之異源性核酸之啓動子的第

二構築體使煙草植物轉型；(b)自該經轉型之植物再生基因轉殖煙草植物；及(c)選擇相對於對照植物具有增加之菸鹼含量及增加之產量的基因轉殖煙草植物。

在一實施例中，第一構築體包含編碼選自由QPT、PMT、A622及NBB1組成之群之酶的核酸。在另一實施例中，產生菸鹼及產量增加之植物。

在另一態樣中，本發明提供用於增加普通煙草中之菸鹼之方法，其包含相對於對照植物過度表現PMT。

【實施方式】

本發明係關於增加煙草植物中之菸鹼性生物鹼，以及在另外並不產生菸鹼性生物鹼之細胞中產生菸鹼性生物鹼。如下所述，本發明者瞭解可調整四個基因(A622、NBB1、QPT及PMT)以達成煙草植物中菸鹼性生物鹼含量的增加。亦即，過度表現此等四個基因中之任一者增加煙草菸鹼性生物鹼。進一步增加煙草菸鹼性生物鹼可藉由同時過度表現四個基因中之至少兩者(諸如QPT及PMT)來達成。

可將A622及NBB1引入不產生菸鹼之植物或細胞中，進而實現菸鹼或相關化合物的產生。

除提供用於增加煙草中之菸鹼性生物鹼之方法以外，本發明亦提供同時增加煙草中之菸鹼性生物鹼及產量。按照本發明之此態樣，菸鹼性生物鹼及產量的增加可由遺傳工程技術及習知育種之組合來達成。

本說明書中所使用之所有技術術語通常在生物化學、分子生物學及農學中使用；因此，其為熟習本發明所屬之領域的技術者所瞭解。彼等技術術語可見於(例如)：MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL，第3版，第1-3卷，編者Sambrook及Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001；

CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY，編者Ausubel等人，Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1988(定期更新)；SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY: A COMPENDIUM OF METHODS FROM CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY，第5版，第1-2卷，編者Ausubel等人，John Wiley & Sons, Inc., 2002；GENOME ANALYSIS: A LABORATORY MANUAL，第1-2卷，編者Green等人，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997；PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D.L. Davis及M.T. Nielson (編)Coresta, 1999(通常稱為"IOM報導")中。

涉及植物生物學技術之方法在此描述且亦詳細描述於論文中，諸如METHODS IN PLANT MOLEULAR BIOLOGY: A LABORATORY COURSE MANUAL，編者Maliga等人，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1995。使用PCR之各種技術描述於(例如)Innis等人，PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO NETHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, San Diego, 1990中及於Dieffenbach及Dveksler, PCR PRIMER: A LABORATORY MANUAL，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2003中。PCR引子對可由諸如使用為彼目的設計之電腦程式的已知技術而來源於已知序列，該等電腦程式例如Primer，版本0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA。用於化學合成核酸之方法論述於(例如)Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-62 (1981)及Matteucci & Caruthers, J. Am.Chem.Soc. 103: 3185(1981)中。

限制酶消化、磷酸化、連接及轉型係如Sambrook等人，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL，第2版(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press中所述來完成。除非另外列出，

否則用於生長及維持細菌細胞的所有試劑及物質皆獲自Aldrich Chemicals(Milwaukee, Wis.)、DIFCO Laboratories(Detroit, Mich.)、Invitrogen (Gaithersburg, Md.)或Sigma Chemical Company(St. Louis, Mo.)。

術語"編碼"係指以下過程：基因經轉錄及轉譯機制提供細胞之資訊，自該資訊可將一系列胺基酸裝配成特異性胺基酸序列以產生活性酶。由於遺傳密碼簡併，因此DNA序列中之某些鹼基變化並不改變蛋白質之胺基酸序列。由此應瞭解，涵蓋大體上並不影響任一酶之功能特性的分別編碼A622及NBB1之DNA序列的修飾。

I. 藉由過度表現A622及NBB1中之至少一者增加煙草中之菸鹼性生物鹼

儘管先前鑑別A622及NBB1，但在本發明之前，此領域完全不瞭解過度表現煙草植物中之A622或NBB1中之至少一者增加菸鹼性生物鹼含量。因此，本發明涵蓋藉由過度表現A622或NBB1中之至少一者增加煙草植物中之菸鹼酸生物鹼含量的方法與構築體。過度表現A622與NBB1進一步增加煙草植物中之菸鹼性生物鹼含量。

在本說明書中，"生物鹼"為見於植物中且由次級代謝產生之含氮鹼性化合物。"菸鹼性生物鹼"為菸鹼或結構上與菸鹼相關之生物鹼。在煙草的狀況下，菸鹼性生物鹼含量及總生物鹼含量同義使用。

說明性主要煙草菸鹼性生物鹼包括(但不限於)：菸鹼、降菸鹼、新煙草鹼及毒藜鹼。說明性次要煙草生物鹼包括(但不限於)：anatailline(2,4-二(3-吡啶基)哌啶)、N-甲基新煙草鹼、N-甲基毒藜鹼、麥斯明煙草鹼(myosmine)、anabaseine(2,4-二甲氧基亞苳基)、N'-甲醯基降菸鹼、二烯菸鹼及可鐵寧(cotinine)。煙草中之其他次要菸鹼性生物鹼報導於(例如)Hecht, S.S.等人，Accounts of Chemical Research 12: 92-98 (1979)；Tso, T.C., PRODUCTION, PHYSIOLOGY AND

BIOCHEMISTRY OF TOBACCO PLANT, Ideals Inc.(Beltsville, MD), 1990中。

降菸鹼、新煙草鹼及毒藜鹼之許多其他吡啶基鹼基加上許多衍生物為已經報導存在於煙草中之菸鹼性生物鹼且出於本發明之目的應包括於次要煙草生物鹼內。多數此等所謂次要菸鹼性生物鹼以小於50 µg/g(以乾重計)存在且許多其他者以奈克量存在。Bush, L.P., 等人, "Biosynthesis and metabolism in nicotine and related alkaloids" 於 NICOTINE AND RELATED ALKALOIDS 中, J.W. Gorrod及J. Wahren (編)Chapman及Hall, London (1993); Bush, L. P., 等人, "Alkaloid Biosynthesis" 於 TOBACCO PRODUCTION 中, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D.L. Davis及M.T. Nielson(編)Coresta, 1999。若干菸鹼性生物鹼之化學結構呈現於(例如)Felpin等人, J. Org. Chem. 66: 6305-312 (2001)中。

菸鹼為普通煙草中之主要生物鹼，為其他煙草種類之50%至60%。視品種而定，普通煙草中之約85至約95%之總生物鹼為菸鹼。Bush等人(1999)，前述；Hoffmann等人，Journal of Toxicology and Environmental Health 41: 1-52 (1994)。基於葉中之生物鹼集聚，降菸鹼、新煙草鹼及毒藜鹼為普通煙草中之其他主要生物鹼。新煙草鹼通常並非任何煙草種類中之主要生物鹼，但在三個種類中集聚成相對較高量；毒藜鹼為四個種類中之主要生物鹼。降菸鹼為主要生物鹼，其為煙草種類之30%至40%。

在本說明書中，"表現"表示由核苷酸序列編碼之蛋白質產物之產生。"過度表現"係指在基因轉殖生物中蛋白質產物之產量超過在正常或未經遺傳工程處理之生物中之產生量。如此項技術中所習知，核苷酸序列由斜體字表示(例如PMT)，而多肽序列不為斜體(例如PMT)。

• A622

已報導A622顯示如PMT之相同表現模式。Shoji等人，*Plant Cell Physiol.* 41: 1072-76 (2000a)；及*Plant Mol. Biol.* 50: 427-40 (2002)。A622與PMT在根中特定表現，尤其在根及根毛之頂端部分的皮層及內皮中。此外，A622及PMT回應NIC調節及茉莉酮酸甲酯刺激具有普通表現模式。回應氣生組織受創，在普通煙草之根中誘導A622。Cane等人，*Func. Plant Biol.* 32: 305-20 (2005)。在粉藍煙草(*N. glauca*)中，在使QPT產生之條件下在受創之葉中誘導A622。Sinclair等人，*Func. Plant Biol.* 31: 721-29 (2004)。

NIC1及NIC2基因座為普通煙草中之兩個獨立遺傳基因座，先前被指定為A及B。突變`nic1`及`nic2`降低菸鹼生物合成酶之表現量及菸鹼含量，一般而言，野生型之菸鹼含量>同型`nic2`>同型`nic1`>同型`nic1`及同型`nic2`植物。Legg及Collins, *Can. J. Cyto.* 13: 287 (1971)；Hibi等人，*Plant Cell* 6: 723-35 (1994)；Reed及Jelesko, *Plant Science* 167: 1123 (2004)。在本說明書中，"`nic1nic2`"表示對於`nic1`及`nic2`突變為同型之煙草基因型。

已確定A662(SEQ ID NO: 3)之核酸序列。Hibi等人(1994)，前述。由此核酸序列編碼之蛋白質A622(SEQ ID NO: 4)類似於異黃酮還原酶(IFR)且含有NADPH結合基元。A622顯示與TP7同源，該TP7為涉及木質素生物合成之煙草苯基香豆滿苯甲基醚還原酶(PCBER)。Shoji等人(2002)，前述。然而，當用兩個不同受質檢定在大腸桿菌(*E. coli*)中表現之A622時，未觀測到PCBER活性。

基於A622及PMT的共同調節及A622與IFR的相似性，建議A622充當菸鹼性生物鹼合成之最終步驟中的還原酶。Hibi等人(1994)；Shoji，等人(2000a)。然而，當在細菌(*id.*)中表現蛋白質時，未觀測到IFR活性。迄今尚未瞭解過度表現A622增加菸鹼含量。

"A622表現"係指由SEQ ID NO: 3編碼之基因產物的生物合成。

"A622過度表現"表示A622表現的增加。A622過度表現影響發生過度表現之植物或細胞之菸鹼性生物鹼含量的增加。A622過度表現包括由以下各物編碼之基因產物的生物合成：Hibi等人(1994)，前述中所揭示之全長A622核酸序列(SEQ ID NO: 3)、SEQ ID NO: 3B，及所有A622聚核苷酸變異體。

• NBB1

NBB1序列經鑑別為按照Kato等人，Proc. Japan Acad. 79 (Ser. B): 151-54 (2003)之方案，自來源於美花煙草(*nicotiana sylvestris*)之cDNA庫所製備之cDNA。如A622，NBB1由菸鹼生物合成調節基因座(NIC1及NIC2)控制。NBB1及PMT在煙草植物中具有相同表現模式。NBB1涉及菸鹼生物合成係由NBB1如PMT及A622處於NIC基因的控制下且顯示類似表現模式來指示。

已確定NBB1(SEQ ID NO: 1)之核酸序列且其編碼SEQ ID NO: 2中所列出之多肽序列。"NBB1表現"係指由SEQ ID NO: 1編碼之基因產物的生物合成。"NBB1過度表現"表示NBB1表現的增加。NBB1過度表現影響發生過度表現之植物或細胞之菸鹼性生物鹼含量的增加。NBB1過度表現包括由以下各物編碼之基因產物的生物合成：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 1B，及所有NBB1聚核苷酸變異體。

II. 藉由過度表現PMT增加普通煙草中之菸鹼性生物鹼

證明在任何煙草種類中過度表現菸鹼生物合成基因之唯一先前報導為美花煙草(*N. sylvestris*)，其中PMT過度表現使葉菸鹼適度增加40%。Sato等人，Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98: 367-72 (2001)。儘管在一種植物種類(諸如美花煙草)中過度表現菸鹼性生物鹼生物合成基因使次級代謝物集聚增加，但未必遵循次級代謝物的類似集聚將在相關種類(諸如普通煙草)中發生。Saitoh等人，Phytochemistry 24: 477-80 (1985)。其尤其與PMT過度表現相關，此係由於普通煙草含有五個

經表現之PMT基因且美花煙草含有三個經表現之PMT基因。Hashimoto等人，*Plant Mol. Biol.* 37: 25-37 (1998)；Reichers及Timko，*Plant Mol. Biol.* 41: 387-401 (1999)。確實，當在澳茄(*Duboisia*)髮狀根培養物中過度表現來自普通煙草之PMT基因時，菸鹼、莨菪素及莨菪鹼之含量並不顯著增加。Moyano等人，*Phytochemistry* 59, 697-702 (2002)。同樣地，在顛茄(*Atropa belladonna*)之基因轉殖植物及髮狀根培養物中過度表現相同PMT基因並不影響莨菪素及莨菪鹼含量。Sato等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 98: 367-72 (2001)；Rothe等人，*J. Exp. Bot.* 54: 2065-070 (2003)。

在茄屬(*Solanaceous*)種類(諸如煙草)中，似乎兩個相關植物種類中之相同生物鹼生物合成路徑可不同地加以調節且過度表現特定基因未必產生次級代謝物的類似集聚模式。Moyano等人，*J. Exp. Bot.* 54: 203-11 (2003)。舉例而言，當分析六十種煙草種類時，在該等種類之間總生物鹼含量及生物鹼分布存在相當大的變化。Saitoh等人，*Phytochemistry* 24: 477-80 (1985)。舉例而言，宿根煙草(*N. alata*)含有20 $\mu\text{g/g}$ 或0.002%之最低含量，而美花煙草具有29,600 $\mu\text{g/g}$ 或2.96%之最高乾重含量之總生物鹼(菸鹼、降菸鹼、毒藜鹼及新煙草鹼之和)。美花煙草葉中之菸鹼與總生物鹼之比對於普通煙草(同作者)為約80%比約95%。又，美花煙草葉中之降菸鹼與總生物鹼之比對於普通煙草(同作者)為約19.1%比約3%。基於六十種煙草種類之間的此等大變化，Saitoh等人得出結論："存在於植物中之全部及個別生物鹼之量及比率視種類而定。生物鹼模式與煙草屬分類之間似乎不存在明確相關性。"(同作者)，第477頁。

因此，本發明提供藉由過度表現PMT增加普通煙草中之菸鹼性生物鹼之方法及構築體。

已確定PMT(SEQ ID NO: 7)之核酸序列且其編碼SEQ ID NO: 8中

所列出之多肽序列。"PMT表現"係指由SEQ ID NO: 7編碼之基因產物的生物合成。"PMT過度表現"表示PMT表現的增加。PMT過度表現影響發生過度表現之植物或細胞之菸鹼性生物鹼含量的增加。PMT過度表現包括由以下各物編碼之基因產物的生物合成：Hibi等人(1994)，前述中所揭示之全長PMT核酸序列(SEQ ID NO: 7)、SEQ ID NO: 7B，及所有PMT聚核苷酸變異體。

III. 藉由過度表現QPT及PMT增加煙草中之菸鹼性生物鹼

迄今尚未瞭解過度表現QPT及PMT協同增加菸鹼性生物鹼。亦即，如與過度表現單獨QPT或PMT相比，藉由過度表現QPT及PMT可達成菸鹼含量的進一步增加。按照本發明之此態樣，將包含QPT與PMT之核酸構築體引入煙草植物細胞中。

已確定QPT(SEQ ID NO: 5)之核酸序列且其編碼SEQ ID NO: 6中所列出之多肽序列。"QPT表現"係指由SEQ ID NO: 5編碼之基因產物的生物合成。"QPT過度表現"表示QPT表現的增加。QPT過度表現影響發生過度表現之植物或細胞之菸鹼性生物鹼含量的增加。QPT過度表現包括由以下各物編碼之基因產物的生物合成：美國專利第6,423,520號中所揭示之全長QPT核酸序列(SEQ ID NO: 5)、SEQ ID NO: 5B，及所有QPT聚核苷酸變異體。

IV. 藉由過度表現A622、NBB1、QPT及PMT中之至少兩者或兩者以上增加煙草中之菸鹼性生物鹼

儘管充分瞭解QPT在菸鹼生物合成中起作用(參見WO 98/56923)，但本發明涵蓋藉由在煙草中過度表現A622、NBB1、QPT及PMT中之至少兩者或兩者以上來進一步增加菸鹼合成。按照本發明之此態樣，將包含A622、NBB1、QPT及PMT中之至少兩者的核酸構築體引入煙草植物細胞中。說明性核酸構築體可包含QPT與A622。

V. 增加煙草菸鹼性生物鹼及產量

如由 Wernsman 等人於 2 PRINCIPLES OF CULTIVAR DEVELOPMENT: CROP SPECIES(Macmillan 1997)中所述，可由習知育種或雜交產生本發明之菸鹼增加之植物。舉例而言，自含有合適基因轉殖之煙草物質再生之經遺傳工程處理之穩定轉型體用於將高菸鹼性狀種質滲入所需商業上可接受之遺傳背景中，進而獲得將高菸鹼含量與該所需背景組合之煙草栽培品種或變種。

類似地，舉例而言，藉由將過度表現QPT之基因轉殖植物與過度表現A622之基因轉殖植物雜交可產生過度表現QPT及A622之經遺傳工程處理之植物。在連續數輪雜交及選擇後，可選擇過度表現QPT及A622之經遺傳工程處理之植物。

儘管可將任何所需基因種質滲入高菸鹼變種中，但關鍵需要將高菸鹼性狀引入高產煙草背景中。若干研究指示："產量改良已受與菸鹼濃度一起存在之負相關所阻礙。"PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D.L. Davis及M.T. Nielson(編)Coresta第46頁(1999)。在其反映煙草育種中，Earl Wernsman博士確定："繼續單獨選擇產量不久會產生乾葉中之菸鹼濃度低至使得煙草對工業化而言不可接受的群體"Wernsman, Recent Advances in Tobacco Science 25: 5-35(1999)。其假設"可需要上調菸鹼合成之遺傳方法以使生產能力再增加同時維持菸鹼濃度"(同作者)。

因此，本發明提供藉由在高產煙草植物中過度表現編碼菸鹼生物合成酶之基因來校正煙草植物中之產量與菸鹼含量之間的"負相關"。例示性菸鹼生物合成酶包括(但不限於)：QPTase、PMTase、A622、NBB1、精胺酸脫羧酶(ADC)、甲基腐胺氧化酶(MPO)、NADH脫氫酶、鳥胺酸脫羧酶(ODC)及S-腺苷甲硫胺酸合成酶(SAMS)。接著將自其產生之菸鹼增加之植物與維持高產之任何所需商業上可接受之遺傳背景雜交。合適之高產煙草植物包括(但不限於)：普通煙草栽培

品種K326、NC71、NC72及RG81。在連續數輪雜交及選擇後，由此產生具有增加之菸鹼及增加之產量的經遺傳工程處理之植物。

本發明之另一態樣提供將菸鹼增加之植物與產量增加之植物雜交作為打破菸鹼含量與產量之間的負相關之另一策略。

"產量增加之基因"涵蓋其表現與如由以下各者所反映之生產能力增加相關的任何基因：例如，與野生型對照植物相比，光合同化物產生增加、生長速率增加、長勢改良、產量提高、CO₂固定增強、生物質量增強、種子產生增加、儲存改良、產量提高、耐病性增加、耐蟲性增加、耐水分脅迫性增加、甜度增強、澱粉組合物改良、蔗糖集聚及輸出改良，及對氧化應力之回應改良。

同樣地，"產量增加之植物"係指過度表現"產量增加之基因"的植物或其任何部分且顯示如由以下各者所反映之生產能力增加：例如，與野生型對照植物相比，光合同化物產生增加、生長速率增加、長勢改良、產量提高、CO₂固定增強、生物質量增強、種子產生增加、儲存改良、產量提高、耐病性增加、耐蟲性增加、耐水分脅迫性增加、甜度增強、澱粉組合物改良、蔗糖集聚及輸出改良，及對氧化應力之回應改良。

舉例而言且決不限制本發明，產量增加之植物可藉由過度表現病程相關(PR)基因來產生。已顯示在煙草中過度表現玉米PRms基因產生具有增強之生物質量及種子產生的基因轉殖煙草植物。Murillo等人，Plant J. 36: 330-41 (2003)。同樣地，產量增加之植物可藉由過度表現編碼克耳文環酶(Calvin cycle enzyme)之基因來產生。Tamoi等人 Plant Cell Physiol. 47(3)380-390 (2006)。與野生型煙草相比，過度表現(例如)藍藻細菌果糖-1,6-/景天庚酮糖-1,7-雙磷酸酶之煙草植物顯示光合效率及生長效率增強。Miyagawa等人，Nature Biotech. 19: 965-69(2001)。

本發明亦涵蓋藉由在相同植物或細胞中過度表現編碼菸鹼生物合成酶(諸如QPT、PMT、A622或NBB1)之基因及過度表現產量增加之基因(諸如PRms、果糖-1,6-/景天庚酮糖-1,7-雙磷酸酶、果糖-1,6-雙磷酸酶及景天庚酮糖-1,7-雙磷酸酶、景天庚酮糖-1,7-雙磷酸酶)來產生具有增加之產量及增加之菸鹼的植物。

VI. 在不產生菸鹼之細胞中產生菸鹼性生物鹼及相關化合物

可將A622及NBB1引入不產生菸鹼之植物或細胞中，進而在另外並不產生此等化合物之生物或細胞中產生菸鹼或相關化合物。可自此等經遺傳工程處理之生物及細胞產生多種產物，包括菸鹼、菸鹼類似物及菸鹼生物合成酶。

"不產生菸鹼之植物"係指不產生菸鹼或相關菸鹼性生物鹼之任何植物。說明性不產生菸鹼之植物包括(但不限於)：顛茄及擬南芥。

"不產生菸鹼之細胞"係指來自不產生菸鹼或相關菸鹼性生物鹼之生物的細胞。說明性細胞包括(但不限於)：植物細胞(諸如顛茄、擬南芥)，以及昆蟲、哺乳動物、酵母、真菌、海藻或細菌細胞。

"菸鹼類似物"具有菸鹼之基本結構但可(例如)具有不同環取代基。舉例而言，菸鹼類似物可用氫(-H)取代甲基 (-CH₃)，進而產生降菸鹼，其為菸鹼類似物。除與菸鹼共用類似結構以外，菸鹼類似物可提供類似生理效應。舉例而言，已列舉可鐵寧對改良濃度及記憶力的正面作用且由此其為菸鹼類似物。因此，菸鹼類似物被廣泛定義為涵蓋具有與菸鹼類似之結構及功能活性的任何及所有化合物。

VII. 使用新穎酶合成化合物

近來，已極大關注於合成靶向菸鹼受體且對神經退化性疾病及認知障礙提供治療作用的菸鹼類似物。舉例而言，Targacept(自R.J. Reynolds Tobacco Company派生形成之藥品公司)試圖基於神經元菸鹼性乙醯膽鹼受體(NNR)的選擇性活化開發菸鹼類似物藥物且使其商品

化。由於本發明提供新穎菸鹼生物合成酶，因此對於使用單獨NBB1，或NBB1及A622用於開發新穎菸鹼類似物可存在價值。舉例而言，使用本發明方法及構築體，可藉由將菸鹼類似物前驅體提供於細胞培養系統中產生菸鹼性生物鹼類似物。

另外，本發明酶可用於活體外合成菸鹼及相關化合物。亦即，重組A622及NBB1可用於合成或部分合成菸鹼性生物鹼及菸鹼性生物鹼類似物。

菸鹼性生物鹼生物合成序列

已在以煙草植物例示之若干植物種類中鑑別菸鹼性生物鹼生物合成基因。因此，本發明涵蓋增加煙草菸鹼性生物鹼生物合成之自植物種類之基因組分離或以合成方法產生的任何核酸、基因、聚核苷酸、DNA、RNA、mRNA或cDNA分子。另外，該菸鹼性生物鹼生物合成序列的表現在不產生菸鹼之細胞(諸如昆蟲細胞)中產生菸鹼性生物鹼。DNA或RNA可為雙鏈或單鏈。單鏈DNA可為編碼鏈，亦稱作有義鏈；或其可為非編碼鏈，亦稱作反義鏈。

當然，NBB1、A622、QPT及PMT包括SEQ ID NO: 1、1B、3、3B、5、5B、7及7B中分別列出之序列，以及包含具有一或多個鹼基缺失、取代、插入或添加之SEQ ID NO: 1、1B、3、3B、5、5B、7及7B之變異體的核酸分子，該變異體編碼具有菸鹼性生物鹼生物合成活性之多肽。因此，具有"具有一或多個鹼基缺失、取代、插入或添加之鹼基序列"的序列甚至當經編碼之胺基酸序列具有一或多個胺基酸取代、缺失、插入或添加時仍保持生理活性。另外，A622、NBB1、QPTase及PMTase之多個形式可存在，其可歸因於基因產物的轉譯後修飾或個別PMT、QPT、A622或NBB1基因之多個形式。具有該等修飾且編碼菸鹼性生物鹼生物合成酶之核苷酸序列包括於本發明之範疇內。

舉例而言，聚A尾或5'或3'末端非轉譯區可缺失，且鹼基可缺失至使胺基酸缺失之程度。只要不產生框架移位，亦可取代鹼基。亦可"添加"鹼基至使胺基酸增加之程度。然而，必要的是任何該修飾不引起菸鹼性生物鹼生物合成酶活性的損失。在此情形中，可藉由修飾本發明之DNA鹼基序列使得藉由(例如)位點特異性突變使特定位點處之胺基酸得以取代、缺失、插入或添加來獲得經修飾之DNA。Zoller及Smith, *Nucleic Acid Res.* 10: 6487-500(1982)。

可自適當鹼基從頭開始合成菸鹼性生物鹼生物合成序列，例如藉由使用本文中所揭示之適當蛋白質序列作引導以產生DNA分子，該DNA分子儘管不同於原生DNA序列，但使產生具有相同或類似胺基酸序列之蛋白質。當將DNA序列引入非植物細胞中，編碼反映不同(非植物)密碼子選擇頻率之異源性蛋白質時此類型之合成DNA分子為有用的，且若未經修飾而使用，則由宿主細胞可導致無效轉譯。

"經分離"核酸分子意謂已自其原生環境移除之核酸分子、DNA或RNA。舉例而言，為達成本發明之目的，含於DNA構築體中之重組DNA分子視為經分離。經分離DNA分子之其他實例包括維持於異源性宿主細胞中之重組DNA分子或在溶液中部分或大體上純化之DNA分子。經分離RNA分子包括本發明之DNA分子之活體外RNA轉錄物。根據本發明，經分離核酸分子進一步包括以合成方法產生之該等分子。

"外源性核酸"係指經由人類努力已引入細胞(或細胞之祖系體)中之核酸、DNA或RNA。該外源性核酸可為天然見於其所引入之細胞中之序列或其片段的複本。

相反，"內源性核酸"係指存在於有待經遺傳工程處理之植物或生物之基因組中之核酸、基因、聚核苷酸、DNA、RNA、mRNA或cDNA分子。內源性序列為"原生的"，亦即對有待經遺傳工程處理之

植物或生物而言爲固有的。

"異源性核酸"係指已引入細胞(或細胞之祖系體)中之核酸、DNA或RNA，其並非天然見於其所引入之細胞中之序列的複本。該異源性核酸可包含爲天然見於其已引入之細胞中之序列或其片段之複本的區段。

"嵌合核酸"包含連接轉錄起始區之編碼序列或其片段，該轉錄起始區不同於在天然產生編碼序列之細胞中之與之相關的轉錄起始區。

除非另外指出，否則由定序本文中之DNA分子所確定之所有核苷酸序列係使用自動DNA序列器(諸如來自Applied Biosystems, Inc.之Model 373)來確定。因此，如此項技術中對於由此自動方法所確定之任何DNA序列所知，本文中所確定之任何核苷酸序列可能含有一些錯誤。由自動化確定之核苷酸序列與經定序之DNA分子之實際核苷酸序列通常至少約95%一致、更通常至少約96%至至少約99.9%一致。實際序列可由包括此項技術中所熟知之手動DNA定序法的其他方法來更精確地確定。如此項技術中亦知，與實際序列相比，經確定之核苷酸序列中之單一插入或缺失將在核苷酸序列轉譯中引起框架移位使得由經確定之核苷酸序列編碼之預測胺基酸序列自該插入或缺失之處起始可完全不同於由該經定序之DNA分子實際編碼之胺基酸序列。

爲達成本發明之目的，當在6xSSC、0.5% SDS、5xDenhardt氏溶液及100 μ g非特異性載體DNA之雜交溶液中兩個序列形成雙鏈複合物時，該兩個序列雜交。參見Ausubel等人，前述，第2.9節，增刊27(1994)。序列可在"中等嚴格"下雜交，該"中等嚴格"定義爲60°C之溫度下在6xSSC、0.5% SDS、5xDenhardt氏溶液及100 μ g非特異性載體DNA之雜交溶液中。對於"高度嚴格"雜交而言，溫度升至68°C。在中等嚴格雜交反應後，將核苷酸在2xSSC加上0.05% SDS之溶液中在室溫下洗滌五次，隨後用0.1xSSC加上0.1% SDS在60°C下洗滌1 h。對於

高度嚴格而言，洗滌溫度升至68℃。為達成本發明之目的，經雜交之核苷酸為使用具有10,000 cpm/ng之比放射性之1 ng經放射性標記之探針所偵測的彼等經雜交之核苷酸，其中該等經雜交之核苷酸在-70℃下暴露於X光膠片不超過72小時後清晰可見。

本申請案係針對與SEQ ID NO: 1、1B、3、3B、5、5B、7及7B中之任一者所述之核酸序列至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該等核酸分子。較佳者為與SEQ ID NO: 1、1B、3、3B、5、5B、7及7B中之任一者所示之核酸序列至少95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的核酸分子。兩個核酸序列之間的差異可出現於參考核苷酸序列之5'或3'末端位置處或在個別散布於參考序列中之核苷酸當中或散布於參考序列內之一或多個鄰近基團中之彼等末端位置之間的任何地方。

作為實際問題，任何特定核酸分子是否與參考核苷酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致係指使用此項技術中所熟知之標準演算法在兩個分子之間所進行的比較且可常規使用公開可用之電腦程式(諸如BLASTN演算法)來判定。參見Altschul等人，Nucleic Acids Res. 25: 3389-402 (1997)。

本發明進一步提供分別包含SEQ ID NO: 1、1B、3、3B、5、5B、7及7B之核苷酸序列的核酸分子，其編碼活性菸鹼生物合成酶，其中該酶具有分別對應於SEQ ID NO: 2、4、6及8之胺基酸序列，且其中本發明之蛋白質涵蓋不改變菸鹼生物合成酶功能之胺基酸取代、添加及缺失。

"變異體"為偏離特定基因或蛋白質之標準或特定核苷酸或胺基酸序列的核苷酸或胺基酸序列。術語"同功異型物"、"同型"及"類似物"亦指代核苷酸或胺基酸序列之"變異"形式。藉由添加、移除或取代一或多個胺基酸所改變之胺基酸序列或核苷酸序列中之變化可視為"變

異"序列。變異體可具有"保守"變化，其中經取代之胺基酸具有類似結構或化學特性，例如以異白胺酸替代白胺酸。變異體可具有"非保守"變化，例如以色胺酸替代甘胺酸。類似次要變異亦可包括胺基酸缺失或插入，或二者。判定哪個胺基酸殘基可取代、插入或缺失的引導可使用此項技術中所熟知之電腦程式(諸如 Vector NTI Suite(InforMax, MD)軟體)發現。"變異體"亦可指代"經改組之基因"，諸如Maxygen讓渡之專利中所述之彼等"經改組之基因"。

核酸構築體

根據本發明之一態樣，將增加菸鹼性生物鹼生物合成之序列併入適合於植物或細胞轉型之核酸構築體中。因此，該核酸構築體可用於在植物中過度表現A622、NBB1、PMT及QPT中之至少一者，以及在(例如)不產生菸鹼之細胞中表現A622及NBB1。

重組核酸構築體可使用標準技術製成。舉例而言，用於轉錄之DNA序列可藉由用限制酶處理含有該序列之載體以切出適當片段來獲得。用於轉錄之DNA序列亦可藉由黏接及接合合成寡核苷酸或藉由在聚合酶鏈反應(PCR)中使用合成寡核苷酸以在每個末端處得到合適之限制位點來產生。接著將DNA序列選殖至含有合適之調節元件(諸如上游啟動子及下游終止子序列)的載體中。

本發明之一重要態樣為核酸構築體之用途，其中菸鹼性生物鹼生物合成編碼序列可操作地連接一或多個調節序列，該或該等調節序列驅動菸鹼性生物鹼生物合成編碼序列在某些細胞類型、器官或組織中表現而不過度影響正常發展或生理機能。

"啟動子"意謂涉及RNA聚合酶及其他蛋白質的辨識及結合以引發轉錄之來自轉錄起始之上游DNA區。"組成性啟動子"為在整個植物生命中及在多數環境條件下具活性之一者。組織特異性、組織較佳、細胞類型特異性及誘導性啟動子構成"非組成性啟動子"之類別。"可操

作地連接"係指介於啓動子序列與第二序列之間的功能連接，其中該啓動子序列引發及介導對應於第二序列之DNA序列的轉錄。一般而言，"可操作地連接"意謂所連接之核酸序列爲鄰近的。

適用於表現引入細胞中之核酸序列以增加A622、NBB1、PMTase或QPTase表現之啓動子可爲組成性啓動子，諸如花椰菜嵌紋病毒(CaMV)35S啓動子或組織特異性、組織較佳、細胞類型特異性及誘導性啓動子。較佳之啓動子包括：在根部組織中具活性之啓動子，諸如煙草RB7啓動子(Hsu等人 *Pestic. Sci.* 44: 9-19 (1995)；美國專利第5,459,252號)；玉米啓動子 CRWAQ81(美國公開專利申請案 20050097633)；芥菜 ARSK1啓動子(Hwang及Goodman, *Plant J* 8:37-43 (1995))；玉米MR7啓動子(美國專利第5,837,848號)；玉米ZRP2啓動子(美國專利第5,633,363號)；玉米MTL啓動子(美國專利第5,466,785號及第6,018,099號)；玉米MRS1、MRS2、MRS3及MRS4啓動子(美國專利申請案 20050010974)；芥菜隱性啓動子(美國專利申請案 20030106105)；及在使涉及菸鹼生物合成之酶的表現增加之條件下活化之啓動子，諸如煙草RD2啓動子(美國專利第5,837,876號)、PMT啓動子(Shoji T.等人，*Plant Cell Physiol.* 41: 831-39 (2000b)；WO 2002/038588)或A622啓動子(Shoji T.等人，*Plant Mol Biol.* 50: 427-40 (2002))。

本發明之載體亦可含有終止序列，其位於本發明之核酸分子之下游使得mRNA轉錄得以終止且添加多聚A序列。例示性之該等終止子爲花椰菜嵌紋病毒(CaMV)35S終止子及胭脂鹼合成酶基因(Tnos)終止子。表現載體亦可含有強化子、起始密碼子、剪接信號序列及靶向序列。

本發明之表現載體亦可含有選擇標記，經由其可在培養物中鑑別經轉型之細胞。標記可與異源性核酸分子相關聯，亦即，基因可操

作地連接啟動子。如本文中所使用，術語"標記"係指編碼性狀或表型之基因，其使得含有該標記之植物或細胞得以選擇或篩選。舉例而言，在植物中，標記基因將編碼抗抗生素或抗除草劑。其使得自未經轉型或轉染之細胞當中選出經轉型之細胞。

合適之可選擇標記之實例包括腺苷脫胺酶、二氫葉酸還原酶、潮黴素-B-磷酸轉移酶、胸苷激酶、黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸-核糖基轉移酶、抗草甘膦(glyphosate)及抗草丁膦(glufosinate)，及胺基-糖苷3'-O-磷酸轉移酶(抗康黴素(kanamycin)、抗新黴素(neomycin)及抗G418)。此等標記可包括抗G418、抗潮黴素、抗博萊黴素(bleomycin)、抗康黴素及抗建它黴素(gentamicin)。構築體亦可含有賦予對除草用草酰磷(phosphinothricin)類似物(如草銨膦(ammonium glufosinate))之抵抗性的可選擇標記基因Bar。Thompson等人，EMBO J. 9: 2519-23 (1987)。其他合適之選擇標記同樣已知。

可使用可視標記，諸如綠色螢光蛋白(GFP)。亦已描述基於控制細胞分裂鑑別或選擇經轉型之植物的方法。參見WO 2000/052168及WO 2001/059086。

亦可包括細菌或病毒起源之複製序列以使載體選殖至細菌或噬菌體宿主中。較佳地，使用廣泛宿主範圍原核起源之複製。可包括對於細菌之可選擇標記以使選擇含所要構築體之細菌細胞。合適之原核可選擇標記亦包括抗諸如康黴素或四環素之抗生素。

如此項技術中已知，編碼其他功能之其他核酸序列亦可存在於載體中。舉例而言，當土壤桿菌(*Agrobacterium*)為宿主時，可包括T-DNA序列以有利於隨後轉譯至及併入植物染色體中。

用於經遺傳工程處理之植物

本發明涵蓋遺傳操縱煙草植物用於經由引入編碼菸鹼性生物鹼合成路徑中之酶的聚核苷酸序列來增加菸鹼性生物鹼合成。另外，本

發明提供在不產生菸鹼之植物(諸如擬南芥及顛茄)中產生菸鹼性生物鹼及相關化合物之方法。

"遺傳工程處理"(GE)涵蓋用於將核酸或特異性突變引入宿主生物中之任何方法。舉例而言，當煙草植物經增加基因(諸如A622或NBB1)表現且進而增加菸鹼含量之聚核苷酸序列轉型時，該煙草植物經遺傳工程處理。相反，未經聚核苷酸序列轉型之煙草植物為對照植物且稱為"未經轉型"植物。

在本發明情形中，"遺傳工程處理"種類包括"基因轉殖"植物及細胞(參見下文定義)，以及藉助於(例如)經由使用嵌合RNA/DNA寡核苷酸所達成之靶向突變(如由Beetham等人，Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96: 8774-8778 (1999)及Zhu等人，loc. cit.第8768-8773頁所述)，或所謂"重組誘導性寡核鹼基"(如PCT申請案WO 03/013226中所述)所產生之植物及細胞。如本文中所述，同樣地，經遺傳工程處理之植物或細胞可藉由引入經修飾之病毒來產生，該經修飾之病毒繼而在宿主中引起遺傳修飾，其結果類似於基因轉殖植物中所產生之彼等結果。參見(例如)美國專利第4,407,956號。另外，經遺傳工程處理之植物或細胞可為藉由僅引入來源於宿主物種或來源於性相容物種之核酸序列所建構之任何原生方法(亦即，不涉及外來核苷酸序列)之產物。參見(例如)美國公開申請案第2004/0107455號。

"植物"為涵蓋整個植物、植物器官(例如葉、莖、根等)、種子、經分化或未經分化之植物細胞及其子代之術語。植物物質不受限制地包括：種子懸浮培養物、胚芽、分生組織部分、癒合組織、葉、根、芽、果實、配子體、孢子體、花粉及小孢子。可用於本發明之植物種類一般廣至經遺傳工程技術處理之較高等植物種類，包括單子葉及雙子葉植物，以及裸子植物。較佳之菸鹼產生植物包括茄科(Solanaceae)之煙草、澳茄、角苔屬(Anthocericis)及朝顏煙草

(*Salpiglossis*)屬或菊科(*Compositae*)之鱧腸(*Eclipta*)及百日草(*Zinnia*)屬。

"煙草"係指產生菸鹼性生物鹼之煙草屬中之任何植物。煙草亦指代包含由煙草植物所產生之物質的產品且由此包括(例如)自GE菸鹼增加之煙草所製成之膨脹煙草、復原煙草、香煙、雪茄、嚼煙或無煙煙草形式、鼻煙及嚼煙。煙草種類之實例包括(但不限於)以下各物：無莖煙草(*Nicotiana acaulis*)、智利尖葉煙草(*Nicotiana acuminata*)、智利尖葉煙草多葉變種(*Nicotiana acuminata* var. *multiflora*)、西南非洲煙草(*Nicotiana africana*)、宿根煙草(*Nicotiana alata*)、抱莖煙草(*Nicotiana amplexicaulis*)、亞倫茲氏煙草(*Nicotiana arentsii*)、漸狹煙草(*Nicotiana attenuata*)、苯諾維德氏煙草(*Nicotiana benavidesii*)、本塞姆氏煙草(*Nicotiana benthamiana*)、畢吉洛夫氏煙草(*Nicotiana bigelovii*)、波納煙草(*Nicotiana bonariensis*)、洞生煙草(*Nicotiana cavicola*)、克利夫蘭煙草(*Nicotiana clevelandii*)、心葉煙草(*Nicotiana cordifolia*)、傘序煙草(*Nicotiana corymbosa*)、德伯尼煙草(*Nicotiana debneyi*)、艾克歇西爾煙草(*Nicotiana excelsior*)、弗蓋蒂煙草(*Nicotiana forgetiana*)、芳香煙草(*Nicotiana fragrans*)、粉藍煙草(*Nicotiana glauca*)、黏性煙草(*Nicotiana glutinosa*)、古德斯皮德煙草(*Nicotiana goodspeedii*)、哥氏煙草(*Nicotiana gossei*)、雜交煙草(*Nicotiana hybrid*)、印古爾巴煙草(*Nicotiana ingulba*)、卡瓦卡米煙草(*Nicotiana kawakamii*)、蔡特煙草(*Nicotiana knightiana*)、藍格斯多夫煙草(*Nicotiana langsдорffii*)、線形煙草(*Nicotiana linearis*)、長花煙草(*Nicotiana longiflora*)、沿海煙草(*Nicotiana maritima*)、麥格隆熄豐煙草(*Nicotiana megalosiphon*)、密爾煙草(*Nicotiana miersii*)、夜花煙草(*Nicotiana noctiflora*)、裸莖煙草(*Nicotiana nudicaulis*)、鈍葉煙草(*Nicotiana obtusifolia*)、西方煙草(*Nicotiana occidentalis*)、西方煙草

亞種香花草 (*Nicotiana occidentalis* subsp. *hesperis*)、耳狀煙草 (*Nicotiana otophora*)、圓錐煙草 (*Nicotiana paniculata*)、少花煙草 (*Nicotiana pauciflora*)、碧冬煙草 (*Nicotiana petunioides*)、皺葉煙草 (*Nicotiana plumbaginifolia*)、四芒煙草 (*Nicotiana quadrivalvis*)、雷蒙煙草 (*Nicotiana raimondii*)、淺波煙草 (*Nicotiana repanda*)、蓮座狀煙草 (*Nicotiana rosulata*)、蓮座狀煙草亞種印古爾巴 (*Nicotiana rosulata* subsp. *ingulba*)、圓葉煙草 (*Nicotiana rotundifolia*)、黃花煙草 (*Nicotiana rustica*)、塞徹爾煙草 (*Nicotiana setchellii*)、擬煙草 (*Nicotiana simulans*)、茄葉煙草 (*Nicotiana solanifolia*)、薇甘煙草 (*Nicotiana spegazzinii*)、斯托克頓煙草 (*Nicotiana stocktonii*)、甜煙草 (*Nicotiana suaveolens*)、美花煙草、普通煙草、密花煙草 (*Nicotiana thyrsiflora*)、大煙草 (*Nicotiana tomentosa*)、擬茸毛煙草 (*Nicotiana tomentosiformis*)、三角葉煙草 (*Nicotiana trigonophylla*)、蔭生煙草 (*Nicotiana umbratica*)、波緣煙草 (*Nicotiana undulata*)、毛煙草 (*Nicotiana velutina*)、唯剛煙草 (*Nicotiana wigandioides*)及花煙草 (*Nicotiana x sanderae*)。

在本說明書中，"煙草髮狀根"係指具有來自整合於基因組中且在培養物中生長而不補充植物生長素及其他植物激素之髮根土壤桿菌 (*Agrobacterium rhizogenes*)之Ri質體之T-DNA的煙草根。煙草髮狀根如同煙草植物根產生菸鹼性生物鹼。此等類型之根特徵為快速生長、頻繁分枝、斜向生長，及能合成如完整植物根之相同化合物。David 等人，*Biotechnology* 2: 73-76 (1984)。茄科植物根為莨菪烷生物鹼生物合成之主要部分，且由此髮狀根培養物亦能集聚高含量之此等代謝物。舉例而言，參見Oksman-Caldentey及Arroo, "Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures,"於METABOLIC ENGINEERING OF PLANT SECONDARY METABOLISM 中 253-

81(Kluwer Academic Publishers, 2000)。

用於遺傳工程處理之不產生菸鹼之細胞

本發明涵蓋具有編碼涉及產生菸鹼性生物鹼之酶的核酸序列之經遺傳工程處理之"不產生菸鹼之細胞"。不產生菸鹼之細胞係指來自不產生菸鹼之任何生物之細胞。說明性細胞包括(但不限於)：植物細胞(諸如顛茄、擬南芥)，以及昆蟲細胞、哺乳動物細胞、酵母細胞、真菌細胞、海藻細胞或細菌細胞。合適之宿主細胞進一步揭示於 Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)。

"昆蟲細胞"係指可經編碼菸鹼生物合成酶之基因轉型且能以可回收之量表現酶或其產物的任何昆蟲細胞。說明性昆蟲細胞包括Sf9細胞(ATCC CRL 1711)。

"真菌細胞"係指可經編碼菸鹼生物合成酶之基因轉型且能以可回收之量表現酶或其產物的任何真菌細胞。說明性真菌細胞包括酵母細胞，諸如釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)(Baldari, 等人, 1987. EMBO J. 6: 229-234)及甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(例如購自Invitrogen之甲醇酵母(*P. pastoris*)KM714)。亦可使用諸如麴黴(*Aspergillus*)及木黴(*Trichoderma*)之絲狀真菌之細胞。Archer, 等人, Antonie van Leeuwenhoek 65: 245-250 (2004)。

"細菌細胞"係指可經編碼菸鹼性生物鹼生物合成酶之基因轉型且能以可回收之量表現酶或其產物的任何細菌細胞。細菌細胞之例子包括大腸桿菌，諸如大腸桿菌菌株M15/rep4，其購自QIAGEN。

"哺乳動物細胞"係指可經編碼菸鹼生物合成酶之基因轉型且能以可回收之量表現酶或其產物的任何哺乳動物細胞。說明性哺乳動物細胞包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO)或COS細胞。哺乳動物細胞亦可包括已引入菸鹼性生物鹼生物合成酶編碼序列之已受精卵母細胞或胚胎幹

細胞。該等宿主細胞可接著用於產生非人類基因轉殖動物。用於哺乳動物細胞中之蛋白質的調節表現之系統之實例包括Clontech's Tet-Off及Tet-On基因表現系統及類似系統。Gossen及Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)。

"海藻細胞"係指可經編碼菸鹼生物合成酶之基因轉型而不負面影響正常海藻發展或生理機能之任何海藻種類。說明性海藻細胞包括萊茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) (Mayfield及Franklin, Vaccine 23: 1828-1832 (2005))。

由於在昆蟲細胞中產生菸鹼性生物鹼可負面影響昆蟲生長及發展，因此誘導性表現系統可減少負面影響。舉例而言，可使昆蟲細胞首先在非誘導條件下生長至所要狀態且接著誘導酶表現。

另外，表現菸鹼性生物鹼生物合成基因之細胞可以前驅體供給以增加用於菸鹼性生物鹼合成之受質可用性。細胞可以併入天然產生之菸鹼性生物鹼類似物中之前驅體類似物供給。

轉型及選擇

儘管菸鹼為普通煙草及煙草屬中的一些其他種類中之主要生物鹼，但其他植物具有菸鹼產生能力，包括(例如)茄科之澳茄、角苔屬(*Anthocericis*)及朝顏煙草(*Salpiglossis*)屬及菊科之鱧腸及百日草屬。使用本發明構築體及方法，可在不產生菸鹼之植物(諸如顛茄及擬南芥)及細胞(諸如昆蟲、真菌及細菌細胞)中產生菸鹼。

為達成本說明書之目的，植物或不產生菸鹼之細胞(諸如真菌細胞)可經包含一或多個各自可操作地連接啟動子之序列的質體轉型。舉例而言，說明性載體可包含可操作地連接啟動子之QPT序列。同樣地，質體可包含可操作地連接啟動子之QPT序列及可操作地連接啟動子之A622序列。或者，植物或不產生菸鹼之細胞可經一個以上質體轉型。舉例而言，植物或不產生菸鹼之細胞可經包含可操作地連接啓

動子之QPT序列的第一質體轉型，該第一質體不同於包含A622或NBB1序列之第二質體。當然，第一及第二質體或其部分係引入同一細胞中。

植物轉型

"基因轉殖植物"係指包含本身亦存在於另一生物或物種中或來自另一生物或物種相對於宿主密碼子選擇最優化之核酸序列的植物。單子葉與雙子葉被子植物或裸子植物細胞可以此項技術中已知之各種方式轉型。舉例而言，參見Klein等人，*Biotechnology* 4: 583-590 (1993)；Bechtold等人，*C. R. Acad. Sci. Paris* 316:1194-1199 (1993)；Bent等人，*Mol. Gen. Genet.* 204:383-396 (1986)；Paszowski等人，*EMBO J.* 3: 2717-2722 (1984)；Sagi等人，*Plant Cell Rep.* 13: 262-266 (1994)。舉例而言，根據Nagel等人，*Microbiol Lett* 67: 325 (1990)，可使用土壤桿菌種，諸如根癌土壤桿菌(*A. tumefaciens*)及髮根土壤桿菌(*A. rhizogenes*)。另外，植物可由根瘤菌(*Rhizobium*)、中華根瘤菌(*Sinorhizobium*)或中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)轉型作用來轉型。Broothaerts等人，*Nature* 433:629-633 (2005)。

舉例而言，可以植物表現載體經由(例如)電穿孔使土壤桿菌轉型，其後經由(例如)熟知之葉圓盤法將土壤桿菌引入植物細胞中。用於完成其之其他方法包括(但不限於)：電穿孔、粒子槍轟擊、磷酸鈣沉澱，及聚乙二醇融合、轉移至發芽花粉粒中、直接轉型(Lorz等人，*Mol. Genet.* 199: 179-182 (1985))，及此項技術中已知之其他方法。若使用諸如抗康黴素之選擇標記，則使其更易於判定哪個細胞已成功轉型。標記基因可包括於由特異性重組酶(諸如(*cre*或*flp*))所辨識之重組位點對內以有利於在選擇後移除標記。參見美國公開申請案第2004/0143874號。

無標記基因之基因轉殖植物可使用包含編碼標記之核酸的第二

質體來產生，該第二質體不同於包含A622或NBB1序列之第一質體。將第一及第二質體或其部分引入同一植物細胞中，使得瞬間表現可選擇標記基因，鑑別經轉型之植物細胞，且獲得經轉型之植物，其中A622或NBB1序列係穩定整合至基因組中且可選擇標記基因未經穩定整合。參見美國公開申請案第2003/0221213號。包含A622或NBB1序列之第一質體可視情況為具有完全由存在於野生型非基因轉殖普通煙草或性相容煙草種類中之核酸序列組成之T-DNA區的二元載體。

已知上述土壤桿菌轉型方法適用於使雙子葉植物轉型。另外，de la Pena等人，Nature 325: 274-276 (1987)；Rhodes等人，Science 240: 204-207 (1988)；及Shimamoto等人，Nature 328: 274-276 (1989)已使用土壤桿菌使穀類單子葉植物轉型。亦參見Bechtold等人，C.R. Acad. Sci. Paris 316 (1994)，其說明用於土壤桿菌介導之轉型的真空滲入。

自經轉型之細胞或培養物再生基因轉殖植物之方法根據植物種類但基於已知方法而改變。舉例而言，用於再生基因轉殖煙草植物之方法已為熟知。選擇具有A622、NBB1、PMT及QPT中之至少一者的表現增加之經遺傳工程處理之植物。另外，本發明之經遺傳工程處理之植物可具有增加之菸鹼含量及產量。

不產生菸鹼之細胞轉型

本發明之構築體可用於使用合適之轉型技術使任何細胞轉型，該轉型技術諸如用於植物細胞之土壤桿菌介導之轉型、粒子轟擊、電穿孔，及聚乙二醇融合、磷酸鈣轉染、DEAE-葡聚糖介導之轉染，或陽離子脂質介導之轉染。

不產生菸鹼之細胞可經本發明之核酸構築體轉型而不使用可選擇或可視標記，且基因轉殖生物可藉由偵測所引入之構築體的存在來鑑別。可量測特定細胞中蛋白質、多肽或核酸分子的存在以判定(例

如)細胞是否已成功轉型或轉染。舉例而言及如此項技術中所常用，所引入之構築體的存在可由用於偵測特異性核酸或多肽序列之PCR或其他合適之方法來偵測。另外，經轉型之細胞可藉由辨識與在類似條件下培養之未經轉型之細胞的生長速率或形態特徵相比經轉型之細胞之生長速率或形態特徵的差異來鑑別。參見WO 2004/076625。

為達成本發明之目的，選擇異源性表現A622及NBB1之經遺傳工程處理之細胞。

量化菸鹼性生物鹼含量

經遺傳工程處理之植物及細胞之特徵為菸鹼性生物鹼含量增加。類似地，經轉型之不產生菸鹼之細胞特徵為產生菸鹼性生物鹼。

在描述本發明之植物中，短語"菸鹼或菸鹼性生物鹼含量增加"係指當與未經轉型之對照植物或細胞相比時植物或細胞中之菸鹼性生物鹼的量增加。"菸鹼增加之植物"涵蓋菸鹼含量增加而比同一物種或變種之對照植物之菸鹼含量多10%，較佳多50%、100%或200%的經遺傳工程處理之植物。

經成功轉型之不產生菸鹼之細胞之特徵為菸鹼性生物鹼合成。舉例而言，經轉型之不產生菸鹼之細胞可產生菸鹼，而未經轉型之對照細胞並不如此。

菸鹼性生物鹼含量之量的增加可由若干方法來檢定，例如藉由基於氣液層析法、高效液相層析法、放射性免疫檢定及酶聯結免疫吸附劑分析法量化。如Hibi等人，Plant Physiology 100: 826-35 (1992)中所述，在本發明中，菸鹼性生物鹼含量由配備有毛細管柱及FID偵測器之氣液層析法來量測。

量化產量

本發明之經遺傳工程處理之植物及細胞之特徵為菸鹼性生物鹼含量及產量增加。在經遺傳工程處理之植物中菸鹼性生物鹼之產生較

佳係藉由表現菸鹼生物合成路徑基因(A622、NBB1、PMT或QPT)來達成。

在描述本發明之植物中，短語"產量增加"或"高產"係指當與該植物之菸鹼經增加之對照植物或作物相比時，該植物之植物或作物本身之產量增加。"產量增加之植物"涵蓋該植物之植物或作物本身，或者該植物之菸鹼經增加之植物或作物之產量，較佳比同一物種或變種之富含菸鹼之對照植物之產量多110%，更佳多125%之的經遺傳工程處理之植物。

光合效率之量的增加可由若干方法來檢定，例如藉由量化光合速率，諸如氣體交換及CO₂固定，及葉綠素螢光。Miyagawa等人，Plant Cell Physiol. 41, 311-320 (2000)。如由 Leegood, Carbon Metabolism In Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual(編者Hall, Scurlock, Bolhar-Nordenkamp, Leegood, 及 Long)247-267(Chapman 及 Hall, London; 1993)所述，光合速率亦可藉由量測代謝物及碳水化合物含量來量化。或者，光合活性可基於酶活性(諸如核酮糖二磷酸縮化酶(Rubisco)活性)來計算。Portis, A.R. J. Exp. Bot. 46:1285-1291 (1995)。

當然，產量的增加可藉由量測更易辨別之特徵來確定，該等特徵包括(但不限於)：植物高度、重量、葉子尺寸、開花時間、所產生之種子數及種子重量。

菸鹼增加之產品

本發明提供具有增加之菸鹼含量的經遺傳工程處理之植物，以及產生菸鹼或相關化合物之經遺傳工程處理之不產生菸鹼之細胞，其中該細胞來源於不產生菸鹼之生物。多種產品可自該經遺傳工程處理之植物製成。同樣的，產品可自經遺傳工程處理而可用於產生菸

鹼或相關化合物之細胞製成。

抗草食動物之植物

菸鹼充當幫助保護煙草植物免受害蟲損害之天然殺蟲劑。已顯示常規育種或基因轉殖低菸鹼煙草受昆蟲損害之易感性增加。Legg, P.D., 等人, Can. J. Cyto., 13:287-291 (1971); Voelckel, C, 等人, Chemoecology 11:121-126 (2001); Steppuhn, A., 等人, PLoS Biol, 2(8): e217: 1074-1080 (2004)。使用本發明方法及構築體，可產生對昆蟲及其他害蟲損害之抵抗性增加的菸鹼增加之植物。類似地，抗蟲性的增加可在諸如顛茄及擬南芥(*A. thaliana*)之不產生菸鹼之植物中達成，該等不產生菸鹼之植物係根據本發明進行遺傳工程處理以產生菸鹼。

菸鹼增加之煙草產品

本發明構築體及方法可用於產生(例如)香煙、雪茄，及其他傳統煙草產品(諸如鼻煙及嚼煙)。另外，可產生減少暴露於煙組份(諸如焦油)，但仍具有與習知香煙類似或增加之菸鹼傳遞的菸鹼增加之香煙。

在本說明書中，菸鹼增加之煙草產品可呈煙葉、煙絲、碎煙、煙草末、復原煙草、膨脹或充氣煙草及包括(例如)菸鹼之煙草部分的形式。菸鹼增加之煙草產品可包括香煙、雪茄、煙斗絲及無煙煙草之任何形式(諸如鼻煙、嚼煙或嚼煙)。

將不同煙草類型或栽培品種摻合於煙草產品內在煙草技術中為常見的。因此，應瞭解，菸鹼增加之煙草可以任何百分比與未經轉型之煙草摻合以獲得任何程度之所要菸鹼含量至多達所利用之菸鹼增加之煙草的菸鹼含量以製造煙草產品。

菸鹼增加之香煙尤其有利，此係由於研究證明當菸鹼增加時，吸煙者吸入較少焦油及一氧化碳。參見 Armitage 等人，

Psychopharmacology 96:447-453 (1988) ; Fagerström, Psychopharmacology 77:164-167 (1982) ; Russell, Nicotine and Public Health 15:265-284 (2000) 及 Woodman 等人 , European Journal of Respiratory Disease 70:316-321 (1987) 。

香煙之煙為4,000種以上不同化合物之極其複雜的混合物。Green 及Rodgman, Recent Advances in Tobacco Science 22: 131-304 (1996) ; IOM Report, executive summary之第9頁。香煙之煙由兩相組成：通常稱作"焦油"或總微粒物質之微粒相，及含有氣體及半揮發性化合物之蒸氣相。對於"焦油"之通用定義為當機器抽吸香煙時由Cambridge襯墊所捕獲之"無菸鹼乾煙"或"無菸鹼乾微粒物質"(NFDPM)。更特定言之，"焦油"為自煙分離之總微粒物質，排除水及菸鹼。焦油佔香煙之煙重量的10%以下。然而，焦油組份含有大部分之最有害的煙化合物。

與敏感性生物檢定組合之分析方法已得以鑑別煙草煙中之69種致癌物質。參見THE CHANGING CIGARETTE: CHEMICAL STUDIES AND BIOASSAYS，第5章，Smoking and Tobacco Control Monograph 第13號(NIH公開案第02-5074號，2001年10月)。此對研究者而言已變得清晰，然而，香煙之煙的並非所有組份具有同等毒性。值得注意地，第一份美國公共衛生局局長對吸煙之報導(U.S. Surgeon General's report on smoking)(於1994年)得出結論：菸鹼在由吸煙者所吸入之含量下可能無毒，其暗示不直接涉及吸煙者之主要藥理結果之來源。公共衛生局局長於1994年之報導在第74頁陳述："無可接受之跡象表明延長暴露於菸鹼引起目標性質的危險功能變化或退化疾病"。

實際上，美國食品及藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)允許出售菸鹼替代產品(諸如貼片及口香糖)用於戒煙治療。此等產品可在一天中比一包香煙傳遞更多菸鹼。IOM Report第

167頁陳述："菸鹼之許多研究表明菸鹼未必為人類之致癌劑，或在最壞的情況下，其致癌性與煙草之其他組份的致癌性相比為輕微的。若將菸鹼視為致癌劑，與其他煙草組份的危險相比其危險亦只是輕微的"。

香煙一般由FTC(美國)或ISO吸煙機方法來定級，該等方法測定(例如)當根據標準化條件由機器抽吸香煙時所產生之焦油及煙草的量。參見Pillsbury等人，J. Assoc. Off. Analytical Chem. (1969)；ISO: 4387 (1991)。如PCT申請案WO 2005/018307中所分析，最商業化香煙一般得到每1份菸鹼約10至15份"焦油"(以毫克為單位量測)。

許多公共衛生官員認為當前FTC/ISO機器吸煙方式有缺陷，此係由於此等方法未能考慮到主要由尋求菸鹼所驅動之人類吸煙行為。換言之，此等方法未考慮補償性吸煙。補償性吸煙或亦稱之為補償行為實質上意謂因煙草煙中之菸鹼的存在減少而引起之過度吸煙(更密集地吸煙)或因菸鹼的存在增加而引起之過少吸煙(較不密集地吸煙)。參見Benowitz, N. Compensatory Smoking of Low Yield Cigarettes, NCI Monograph 13。

目前正評估新穎吸煙機方法，尤其考慮低產量品牌之補償性吸煙的彼等方法。一實例為涉及調整吸煙參數以使具有較低ISO菸鹼產量之品牌為機器更強烈抽吸之方法。Kozlowski及O'Connor Lancet 355: 2159 (2000)。其他所建議之方法量測以每菸鹼單位計或在經界定之"目標"菸鹼產量下毒素之產量。此係(例如)藉由系統地改變噴煙體積、噴煙時間間隔及通風孔堵塞直至達到目標菸鹼產量來達成。香煙可接著基於獲得目標菸鹼產量所需之努力以及基於在彼產量下之毒素傳遞來定級。由於可評估不同品牌之間特定毒素的比較，因此消費者將受益於此等吸煙機方法。

研究已表明許多吸煙者以多數"淡"及"超淡"香煙吸入與濃香型香

煙正好同樣多的煙 (Gori 及 Lynch, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 5:314-326)。吸煙者可更主動地(比較高產量之香煙)補償或抽吸較低產量之香煙(根據FTC或ISO方法)以獲得為重要感觀特性之其所要菸鹼衝擊及煙之口感。Rose, J.E. "The role of upper airway stimulation in smoking , " 於 *Nicotine Replacement: A Critical Evaluation*中, 第95-106頁, 1988。

吸煙者可得到補償之方式包括每根香煙之噴煙頻率及該等噴煙之煙吸入體積、吐出前所保持之煙吸入的持續時間、指定時段內所抽吸之香煙數, 及所抽吸之每根香煙的百分比(香煙抽吸深入之程度)。

當每單位之所吸入之煙體積的菸鹼百分比增加時, 許多吸煙者可得到補償且吸入較少煙。Gori G.B., *Virtually Safe Cigarettes. Reviving an opportunity once tragically rejected*. IOS Press. Amsterdam, (2000)。捲煙用煙草中之菸鹼百分比越高, 香煙之煙中的菸鹼百分比越高。更特定言之, 香煙填充物中之菸鹼百分比越高, 香煙之煙中的菸鹼百分比越高。"填充物"意謂捲入香煙或類香煙裝置內之任何可抽吸物質且包括(a)所有煙草, 包括(但不限於)復原及膨脹煙草; (b)可伴隨(a)之任何非煙草替代品; (c)煙草包裝; (d)用以補充(a)、(b)或(c)之包括調味劑的其他添加劑。類香煙裝置為特定意欲經藉由加熱煙草物質所形成之替代性"煙"氣溶膠來傳遞菸鹼的任何裝置。該等裝置之特徵在於其含有具有最小或無燃燒熱解之高含量甘油或甘油替代品。甘油當加熱時快速蒸發且形成氣溶膠, 該氣溶膠可吸入且外觀及感覺極類似於習知香煙之煙。

因此, 所有其他因素(包括(但不限於): 過濾嘴類型、香煙紙(包括其透氣度、成型性及所利用之接裝紙)及過濾嘴通風量)保持恆定, 含於香煙或類香煙裝置內之煙草填充物的菸鹼含量對於主流香煙之煙中的菸鹼相應增加兩倍而言會大致加倍。此外, 所有其他因素保持恆

定，含於香煙或類香煙裝置內之煙草填充物之菸鹼含量對於主流香煙之煙中的菸鹼相應增加三倍而言會大致增至三倍。此部分中之計算係指隨著菸鹼含量而非"游離"或"揮發性"菸鹼的所述增加所增大之香煙之主流煙中之質子化菸鹼。

在本發明之一較佳實施例中，所製造之暴露減少之香煙包含具有菸鹼增加高達兩倍之菸鹼增加之煙草植物。在本發明之另一較佳實施例中，所製造之暴露減少之香煙包含具有菸鹼增加大於兩倍之菸鹼增加之煙草。

經北卡羅萊那州立大學(North Carolina State University)之農業研究所(Agricultural Research Service)所進行的變種測試程式經由區域最低標準程式(Regional Minimum Standards Program)評估育種株且經由北卡羅萊那官方變種測試(North Carolina Official Variety Test)(NCOVT)評估商業變種。在NCOVT中經烤乾之商業變種的所報導之總生物鹼濃度(2001-2003之三年平均值)在2.45%至3.17%之範圍內。Smith等人，"Variety Information"，第3章於：NORTH CAROLINA OFFICIAL VARIETY TEST中(2004)，表3.1。三年平均總生物鹼濃度對於K-326(實例4-6及9-14所利用之栽培品種)為2.5%。光譜測定法用於在上述NCOVT中量測煙草栽培品種之總生物鹼含量且為達成量測本發明之煙草及菸鹼增加之植物的總生物鹼含量之目的。美國技術顧問組ISO/TC 126(USA/Technical Advisory Group ISO/TC 126)-煙草及菸鹼產品：ISO/DIS 2881。如本文中所揭示(包括圖式)，顯然，一些菸鹼增加之植物具有使野生型K326對照物之菸鹼集聚至少加倍或甚至增至三倍以上的能力。同樣地，在實例4至6中，NBB1及A622過度表現與野生型對照物相比引起菸鹼增加兩倍或甚至三倍。

"固化"為減少水分且使葉綠素破壞得到呈金黃色之煙葉的老化過

程，且由此使澱粉轉化成糖。因此，經固化煙草與經收集之綠葉相比具有較高還原糖含量及較低澱粉含量。"經烤乾之煙草"係指在通風棚中以加熱乾燥煙草植物之方法且特徵為獨特顏色、高還原糖含量、中度至厚實質感及特別平滑之抽吸特性。Bacon等人，Ind. Eng. Chem. 44: 292 (1952)。

煙草特異性亞硝胺(TSNA)為在固化及加工期間主要形成之一類致癌物質。Hoffman, D., 等人，J. Natl Cancer Inst. 58, 1841-4 (1977)；Wiemik A等人，Recent Adv. Tob. Sci, (1995), 21: 39-80。諸如4-(N-亞硝基甲基胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)、N'-亞硝基降菸鹼(NNN)、N'-亞硝基新煙草鹼(NAT)及N'-亞硝基毒藜鹼(NAB)之TSNA係由菸鹼及其他次要菸草生物鹼(諸如降菸鹼、新煙草鹼及毒藜鹼)的N-亞硝化來形成。

菸鹼增加之煙草可含有較高亞硝胺，此係由於在煙草之生物鹼含量與TSNA集聚之間存在正相關。舉例而言，發現新煙草鹼與NAT之間的顯著相關係數為0.76。Djordjevic等人，J. Agric. Food Chem., 37: 752-56 (1989)。然而，美國專利第5,803,081號、第6,135,121號、第6,805,134號、第6,895,974號及第6,959,712號，及美國公開申請案2005/ 0034365、2005/0072047、2005/0223442、2006/0041949，及PCT公開申請案WO 2006/091194及其他文獻論述減少煙草特異性亞硝胺之方法，該方法可應用於利用本發明之煙草產品。

因此，本發明提供用於產生含有增加之菸鹼含量的香煙及其他煙草產品之構築體及方法。所需暴露減少之香煙應盡可能有效地傳遞對於每根香煙而言吸煙者所要含量之菸鹼，同時維持可接受之味道。參見WO 05/018307。

復原煙葉、膨脹煙草及摻合

菸鹼增加之煙草亦可用於產生復原片式煙草(Recon)及膨脹煙草

或充氣煙草。Recon可自以下各物產生：煙草加工及香煙製造之煙草塵、莖、小葉粒子、其他副產品，且有時直接為整葉。因製造商而改變之recon過程接近類似於典型造紙過程且需要加工各種煙草部分且接著將recon片切成類似於捲煙用煙草(碎煙)之尺寸及性狀。

另外，根據本發明，菸鹼增加之煙草可用於產生膨脹煙草(亦稱為充氣煙草)，其為許多香煙品牌之重要組份。膨脹煙草係經由合適之氣體膨脹，藉以使煙草"充氣"使得密度減小及填充容量增加，其繼而使香煙中所使用之煙草重量減小來製成。藉由使用菸鹼增加之煙草作為起始物質，以所得膨脹煙草所製成之香煙將得到毒性化學品(諸如焦油及一氧化碳)與菸鹼之比率下降。

菸鹼增加之膨脹煙草、菸鹼增加之Recon及菸鹼增加之碎煙可以任何百分比在三者之間或與任何百分比之未經轉型之膨脹煙草、未經轉型之recon或未經轉型之碎煙摻合以產生含有不同菸鹼含量之香煙填充物。根據此項技術中已知之標準方法，接著將任一該摻合物併入香煙製造過程中。

利用GE菸鹼增加之煙草的除香煙以外之煙草產品係根據此項技術中已知之標準方法使用本文中所述之煙草植物物質中之任一者來製造。在一實施例中，所製造之煙草產品包含自菸鹼增機之煙草所獲得之植物物質。增加之菸鹼含量可高達野生型栽培品種之彼菸鹼含量的三倍以上。

菸鹼性生物鹼酶及類似物

除傳統煙草產品(諸如香煙及嚼煙)以外，本發明提供用於產生菸鹼及菸鹼類似物以及用於合成菸鹼及菸鹼類似物之酶的方法。此等化合物可由遺產工程化之菸鹼產生植物及不產生菸鹼之細胞以及於無細胞/活體外細胞系統中產生。

由於最近研究表明菸鹼受體在治療諸如阿茲海默氏病、精神分

裂症、中樞及自主神經系統功能障礙及沉溺症之多種病狀及病症中的作用，因此對菸鹼受體配位體來源存在需要。舉例而言，本發明方法及構築體可用於產生菸鹼性生物鹼。已顯示過度表現PMT之基因轉殖髮狀根培養物提供用於大規模商業化生產莨菪鹼(醫藥學上重要的莨菪烷生物鹼)之有效方式。Zhang等人，Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101: 6786-91 (2004)。因此，大規模或商業量之菸鹼性生物鹼可在煙草髮狀根培養物中藉由表現A622及NBB1中之至少一者來產生。同樣地，本發明涵蓋藉由表現A622及NBB1產生大規模或商業量之菸鹼的細胞培養系統，諸如細菌或昆蟲細胞培養物。

另外，產物可直接使用NBB1及A622酶之活性來製成。舉例而言，重組NBB1及A622酶可用於合成或部分合成菸鹼性生物鹼或菸鹼性生物鹼類似物。因此，大規模或商業量之A622及NBB1可由多種方法產生，該等方法包括自經遺傳工程處理之植物、細胞或培養系統(包括(但不限於)髮狀根培養物，昆蟲、細菌、真菌、植物、海藻及哺乳動物之細胞培養物)或活體外提取重組酶。

特定實例由下文用於鑑別編碼涉及菸鹼生物合成之酶的序列以及用於引入靶基因以產生植物轉型體之方法呈現。其旨在例示且並不對本發明作出限制。

實例1：鑑別作為由NIC基因座調節之基因的NBB1

自來源於美花煙草之cDNA庫所製備之cDNA微陣列(參見Kato等人，Proc. Japan Acad. 79, Ser. B: 151-54 (2003))用於搜尋由菸鹼生物合成調節NIC基因座控制之新穎基因。

美花煙草cDNA係由PCR擴增且使用Amersham Lucidea陣列點片機點於鏡面塗佈之載片(7型星形，Amersham)上。藉由UV交聯(120 mJ/m²)使DNA固定於載片表面上。在Agriport容器(Kirin)中在用1.5%(W/V)蔗糖及0.35%(W/V)結冷膠(Wako)補充之半強度B5培養基上

生長普通煙草Burley 21小植株(WT及nic1nic2)。

收集八週齡小植株之根，立即用液氮冷凍，且保持於 -80℃ 下直至使用。使用Plant RNeasy小規模套組(Qiagen)自經冷凍之根分離總RNA，且使用GenElute mRNA小規模純化套組(Sigma)純化mRNA。在Cy3或Cy5-Dctp (Amersham)存在下藉由使用LabelStar陣列套組(Qiagen)自0.4 μg經純化之mRNA合成cDNA。使用Lucidea SlidePro雜交機(Amersham)進行cDNA與微陣列載片的雜交及雜交後洗滌。使用FLA-8000掃描儀(Fujifilm)掃描微陣列。用ArrayGauge軟體(Fujifilm)對於信號強度來量化所獲得之陣列圖像。用相反成對組合之Cy3及Cy5標記來自野生型及nic1nic2煙草之cDNA探針。藉由說明染料之總信號強度來標準化雜交信號。鑑別與nic1nic2探針相比與野生型探針雜交強兩倍以上之cDNA純系，且此等純系包括NBB1。

藉由使用SMART RACE cDNA擴增套組(Clontech)自普通煙草之總RNA由5'-及3'-RACE獲得全長NBB1 cDNA。將所得全長NBB1 cDNA序列選殖至pGEM-T載體(Promega)中以得到pGEMT-NBB1cDNAfull。

使用ABI PRISM® 3100遺傳分析儀(Applied Biosystems)及BigDye®終止器v3.1循環定序套組(Applied Biosystems)在兩條鏈上確定NBB1 cDNA插入之核苷酸序列。NBB1全長cDNA在SEQ ID NO: 1中列出。由核苷酸序列編碼之胺基酸序列在SEQ ID NO: 2中列出。蛋白質序列包括FAD結合基元。推定性空泡信號肽位於N末端。

實例2：表徵NBB1

由北方墨點分析(Northern blot analysis)研究煙草植物中之NBB1表現。

在25℃下以150微莫耳光子/m²之光(16 h光照，8 h黑暗)在具有3%蔗糖及0.3%結冷膠之½xB5培養基上使普通煙草栽培品種Burley 21

之植物(以下縮寫成WT)及已將nic1、nic2或nic1與nic2突變引入Burley 21背景中之突變株活體外生長兩個月。藉由將0.5 mL之100 μ M茉莉酮酸甲酯添加至含有植物之具有80 cm³固體培養基容量及250 cm³氣體容量之Agripot容器(Kirin, Tokyo)中用茉莉酮酸甲酯蒸氣處理植物。將處理時間設定於0 h及24 h。自植物體收集根部分及葉部分(自植物體收集2次或6次葉，總共7至10片葉)，且立即使用液氮冷凍儲存。

根據製造商之方案使用RNeasy Midi套組(Qiagen)提取RNA。然而，將聚乙烯吡咯啶酮添加至於Qiagen套組中之RLT緩衝液中達1%之濃度。進行兩次管柱操作以增加RNA純度。

根據由Sambrook及Russell(Sambrook, J.等人, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 第7章(2001))所給出之方法進行RNA墨點法。

來自NBB1核苷酸序列(SEQ ID NO: 1)之1278鹼基對至末端(1759鹼基對)的序列片段用作探針模板。該模板係由使用以下引子的PCR自cDNA純系藉由擴增來製備：

引子1：GGAAACTAACAACGGAATCTCT

引子2：GATCAAGCTATTGCTTTCCCT

根據製造商之說明書使用Bcabest標記套組(Takara)以³²P標記探針。根據製造商之方案使用ULTRAhyb(Ambion)作為緩衝液完成雜交。

自選殖至於大腸桿菌中之pcDNAII載體中的PMT序列製備PMT探針(Hibi等人, 1994)。使用QIAprep旋轉式小規模純化套組(Qiagen)自大腸桿菌提取及純化質體，用限制酶XbaI及HindIII由普通方法處理，且經瓊脂糖凝膠使經消化之DNA發生電泳。使用QIAquick凝膠提取套組(Qiagen)收集約1.5 kb之DNA片段。所收集之DNA片段為由用於NBB1探針之相同方法所標記之³²P，且使其雜交。

如圖1所示，NBB1及PMT在煙草植物中具有相同表現模式。NBB1涉及菸鹼生物合成之證據為：如同PMT，NBB1在NIC基因之控制下，且其顯示與PMT類似之表現模式。

實例3：系統演化分析NBB1

NBB1多肽與花菱草(*Eschscholzia californica*)小葉鹼橋聯酶(BBE)具有25%之一致性及60%之同源性。Dittrich等人，*Proc. Nat'l Acad Sci. USA* 88: 9969-73 (1991)。NBB1多肽與EcBBE之比對展示於圖2中。

基於Carter及Thomberg, *Plant Physiol.* 134: 460-69 (2004)，使用NBB1多肽及植物類BBE多肽之序列建構系統樹。使用鄰接法CLUSTAL W程式進行系統演化分析。數字指示自1,000次複製的引導值。所使用之序列為：EcBBE，加州罌粟花(*California poppy*)BBE(GenBank 寄存編號 AF005655)；PsBBE，罌粟(*Papaver somniferum*)可能性牛心果鹼氧化酶(AF025430)；BsBBE，小檗(*Berberis stolonifera*)BBE(AF049347)；VuCPRD2，豇豆(*Vigna unguiculata*)乾旱誘導蛋白(AB056448)；NspNEC5，菸草種油桃V(AF503441/AF503442)；HaCHOX，向日葵(*Helianthus annuus*)碳水化合物氧化酶(AF472609)；LsCHOX，萵苣(*Lactuca saliva*)碳水化合物氧化酶(AF472608)；及27種芥菜基因(*At1g01980*、*At1g11770*、*At1g26380*、*At1g26390*、*At1g26400*、*At1g26410*、*At1g26420*、*At1g30700*、*At1g30710*、*At1g30720*、*At1g30730*、*At1g30740*、*At1g30760*、*At1g34575*、*At2g34790*、*At2g34810*、*At4g20800*、*At4g20820*、*At4g20830*、*At4g20840*、*At4g20860*、*At5g44360*、*At5g44380*、*At5g44390*、*At5g44400*、*At5g44410*及*At5g44440*)。

結果展示於圖3中。三種已知BBE形成獨立分枝系且加下劃線且指示為"真正的BBE"。NBB1之序列不高度類似於BBE或類BBE蛋白質

中之任一者，且在樹基處與其他序列分離。僅其他自菸草屬油桃V所述之類BBE蛋白、雜交觀賞性藍格斯多夫煙草X花煙草(*N. sanderae*)之花蜜中所述之蛋白質(Carter及Thomburg (2004))與豇豆乾旱誘導蛋白及來自芥菜之若干推定性類BBE蛋白質叢集。由於觀賞性煙草之花蜜缺乏生物鹼且油桃V具有葡萄糖氧化酶活性，因此得出結論：油桃V涉及花中之抗微生物防護且不太可能在生物鹼合成中具有任何作用(同作者)。

實例4：在煙草髮狀根中過度表現NBB1

製備NBB1過度表現構築體

使用實例1之pGEMT-NBB1cDNAfull載體作為模板及兩組引子由PCR擴增attB-NBB1片段；一組用於NBB1基因特異性擴增(基因特異性引子)且另一組以添加attB序列(轉接端引子)。PCR條件為由製造商所推薦之彼等條件。由attB-NBB1 PCR產物與pDONR221(Invitrogen)之間的鹼基對重組反應產生GATEWAY入口純系pDONR221-NBB1。

基因特異性引子

NBB1-attB1 5'

AAAAAGCAGGCTCACCATGTTTCCGCTCATAATTCTG

NBB1-attB2 5'

AGAAAGCTGGGTTCATTCAGCTGCTATACTTGTGC

轉接端引子

attB1轉接子5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT

attB2轉接子5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

描述pTobRD2-DEST

使用Burley 21基因組DNA作為模板及TobRD2啟動子特異性引子擴增1,031個鹼基對之TobRD2啟動子區(SEQ ID NO: 5，於WO9705261中)，且接著用HindIII及XbaI消化。

TobRD2啓動子特異性引子：

TobRD2-01F 5' AAAGCTTGGAAACATATTCAATACATTGTAG

HindIII位點加下劃線。

TobRD2-02R 5' TCTAGATTCTACTACTATTTTATAAGTG

XbaI位點加下劃線。

將所得片段選殖於pBI101H(來自於NAIST之Shuji Yokoi博士；參考Molecular Breeding 4: 269-275, 1998)之HindIII與XbaI位點之間產生質體pTobRD2-BI101H。將含有側接ccdB基因及抗氯黴素基因之attR重組位點的GATEWAY卡匣選殖於pTobRD2-BI101H二元載體之XbaI與SacI位點之間以產生二元載體pTobRD2-DEST，其具有含有作為側接鄰近於GATEWAY卡匣之TobRD2啓動子之選擇標記的NPTII基因表現卡匣(Nos啓動子-新黴素磷酸轉移酶II ORF-Nos終止子)及HPT基因表現卡匣(CaMV 35S啓動子-潮黴素磷酸轉移酶ORF-Nos終止子)之T-DNA區。pTobRD2-DEST之T-DNA區之圖解展示於圖4A中。

由LR反應將NBB1 ORF自pDONR221-NBB1載體轉移至GATEWAY二元載體pTobRD2-DEST，其經設計以在TobRD2啓動子下表現經選殖之ORF。最終表現載體pTobRD2-NBB1ox之T-DNA區之圖解展示於圖4B中。

產生基因轉殖髮狀根

由電穿孔將二元載體pTobRD2-NBB1ox引入髮根土壤桿菌菌株15834中。基本上如由Kanegae等人，Plant Physiol. 105:2:483-90 (1994)所述，使用葉圓盤法由髮根土壤桿菌使普通煙草栽培品種K326野生型植物轉型。抗康黴素(於B5培養基中之200 mg/L)用作用於pTobRD2-NBB1ox轉型株(TN株)之選擇標記。野生型髮根土壤桿菌用於產生對照髮狀根株(WT株)。在27°C在黑暗條件下在B5液體培養基中使煙草髮狀根生長兩週，且接著收集。

分析表現之程序

由免疫墨點分析來分析NBB1蛋白質之表現量。在液氮中冷凍髮狀根，且立即使用研钵及研杵在含有1 mM苯基甲基磺醯氟及200 mM二硫蘇糖醇之提取緩衝液(100 mM Tris-HCl pH 6.8，4% SDS，20%甘油)中均化。在使勻漿離心後，由SDS-PAGE分離上清液中之可溶性蛋白質。使用抗NBB1兔血清進行免疫墨點分析。詳細程序先前已報導。Shoji等人，Plant Mol. Biol., 50,427-440 (2002)。具有抗NBB1抗血清之免疫墨點顯示基因轉殖髮狀根株TN9及TN17具有增加之NBB1蛋白質含量。參見圖5A。

分析生物鹼含量之程序

將基因轉殖髮狀根培養兩週，收集且冷凍乾燥。將2 ml之0.1 N硫酸添加至19 mg經冷凍乾燥之樣品中。將此懸浮液超音波處理15分鐘且過濾。將氫氧化銨(0.1 ml，28% NH₃；Wako)添加至1 ml濾液中，且將混合物以15,000 rpm離心10分鐘。將上清液(1 ml)之樣品負載於Extrelut-1管柱(Merck)上且使靜置5分鐘。用6 ml氯仿溶離生物鹼。接著在37°C在減壓下用蒸發器(Taitec Concentrator TC-8)乾燥經溶離之氯仿溶離份。將經乾燥之樣品溶解於含有0.1%十二烷之50 μ l乙醇溶液中。配備有毛細管柱(Rtx-5Amine管柱，Restec)及FID偵測器之氣相層析設備(GC-14B，Shimadzu)用於分析樣品。將管柱溫度在100°C下維持於10分鐘，以25°C/min升至150°C，在150°C下保持1 min，以1°C/min升至170°C，在170°C下保持2 min，以30°C/min升至300°C，且接著在300°C下保持10 min。注射及偵測器溫度為300°C。注射經純化之生物鹼製劑之1 μ l樣品，且由內標法量測生物鹼含量。

經NBB1過度表現載體pTobRD2-NBB1ox轉型之髮狀根株(TN9、TN17)與野生型髮狀根株相比具有增加之菸鹼及降菸鹼含量。參見圖6。

實例5：在煙草髮狀根中過度表現A622

製備A622過度表現構築體

如上文對於實例4所述，使用pcDNAII-A622載體(根據Hibi等人，Plant Cell 6: 723-35 (1994))作為模板、以下A622特異性引子及轉接端引子擴增attB-A622片段。

基因特異性引子

A622-attB1 5'

AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTTGTATCAG
AGAAAAGCA

A622-attB2 5'

AGAAAGCTGGGTCCTAGACAAATTTGTTGTAGAACTCGTCG

由鹼基對反應將經擴增之A622片段選殖至pDONR221載體中產生pDONR-A622，且接著由LR反應將A622片段自pDONR-A622轉移至pTobRD2-DEST。所得表現載體稱為pTobRD2-A622ox。pTobRD2-A622ox之T-DNA區之圖解展示於圖4C中。

產生基因轉殖髮狀根

如上文對於實例4所述，由含有pTobRD2-A622ox載體之髮根土壤桿菌15834使普通煙草栽培品種K326野生型植物轉型。載運來自pTobRD2-A622ox之T-DNA的基因轉殖髮狀根稱為TA株，且如上文實例4所述來培養。

分析表現之程序

除抗A622小鼠血清用於A622蛋白質偵測外，如上文實例4所述進行免疫墨點分析。經A622過度表現載體轉型之髮狀根株TA11、TA14、TA21具有較高含量之A622蛋白質。參見圖5B。

分析生物鹼含量之程序

如上文實例4所述，提取、純化且分析煙草生物鹼。經A622過度

表現載體轉型之髮狀根株TA11、TA14、TA21具有較高含量之菸鹼及降菸鹼。參見圖6。

實例6：在煙草髮狀根中過度表現NBB1及A622

製備A622及NBB1過度表現構築體

為表現來自單一T-DNA之A622與NBB1蛋白質，將TobRD2-A622表現卡匣及TobRD2-NBB1表現卡匣串聯選殖二元載體中。用HindIII自pTobRD2-A622ox切下TobRD2-A622卡匣，且接著選殖至pTobRD2-NBB1ox中之TobRD2啟動子之5'末端處的HindIII位點中。用於過度表現NBB1與A622之所得載體稱為pTobRD2-A622ox-NBB1ox。pTobRD2-A622ox-NBB1ox之T-DNA區之圖解展示於圖4D中。

產生基因轉殖髮狀根

如上文對於實例4所述，由含有pTobRD2-A622ox-NBB1ox載體之髮根土壤桿菌15834使普通煙草栽培品種K326野生型植物轉型。載運來自pTobRD2-A622ox-NBB1ox之T-DNA的基因轉殖髮狀根稱為TNA株，且如上文實例4所述來培養。

分析表現之程序

除抗A622小鼠血清與抗NBB1兔血清用於蛋白質偵測外，如上文實例4所述進行免疫墨點分析。與野生型髮狀根株相比，在髮狀根株TNA8中，NBB1(參見圖5A)及A622(參見圖5B)之表現量增加。

分析生物鹼含量之程序

如上文實例4所述，自髮狀根株TNA8提取煙草生物鹼，純化且分析。株TNA8中菸鹼及降菸鹼之含量比野生型髮狀根株中更高。(參見圖6)

實例7：表現A622蛋白質之基因轉殖顛茄植物

顛茄產生來源於N-甲基吡咯鎘陽離子之莨菪烷生物鹼、莨菪素及莨菪鹼，但不含有菸鹼生物鹼，此可能歸因於不存在NBB1及A622

基因。

將含有在第一ATG處所引入之NcoI位點的煙草A622 cDNA自pcDNAII-A622載體(Hibi等人, 1994)切下作為NcoI-BamHI片段且在CaMV35S啟動子與重複強化子之控制下選殖至pRTL2(Restrepo等人, Plant Cell 2:987-98 (1990))中。用HindIII切下此A622過度表現卡匣且在二元載體pGA482(Amersham)中選殖以產生A622表現載體pGA-A622。

產生基因轉殖植物

由電穿孔將二元載體pGA-A622引入根癌土壤桿菌菌株EHA105中。基本上如Kanegae等人(Plant Physiol 105(2):483-90 (1994))所述, 使用葉圓盤法由根癌土壤桿菌使顛茄植物轉型。抗康黴素(於MS/B5培養基中之200 mg/L)用作用於pGA-A622轉型之選擇標記。自葉圓盤再生基因轉殖35S-A622植物, 在22°C在連續光照下在生長箱中生長。

分析表現之程序

如上文實例5所述, 自野生型及35S-A622 T1植物之葉提取總蛋白質。使用抗A622小鼠血清進行免疫墨點分析。含有大量A622蛋白質之自花授粉T1代植物之葉組織(諸如3號株C1(參見圖7))用於生物鹼分析。

分析生物鹼含量之程序

基本上如(Hashimoto等人, 1992)所述, 用1 M H₂SO₄提取基因轉殖顛茄植物中之菸鹼性生物鹼, 且純化。將生物鹼之質譜與權威標準之質譜比較後, 由氣相層析法-質譜分析法(GC-MS)(具有HP-5 ms管柱之Hewlett Packard 5890系列II/JEOL MStation JMS700)鑑別生物鹼。將管柱溫度在100°C下維持10 min, 以25°C/min升至150°C, 在150°C下保持1 min, 以1°C/min升至170°C, 在170°C下保持2 min, 以30°C/min升至300°C, 且接著在300°C下保持10 min。將單獨A622引入

顛茄中不引起菸鹼或其他菸鹼生物鹼集聚。

實例8：表現NBB1蛋白質及A622蛋白質之基因轉殖顛茄髮狀根
製備NBB1過度表現構築體

為測試NBB1及A622之組合對菸鹼性生物鹼之偶合反應而言是否充分，藉由以載運NBB1表現載體之髮根土壤桿菌菌株15834使實例7之表現A622之顛茄植物之葉轉型來產生表現A622與NBB1之基因轉殖顛茄髮狀根。

描述pBI101H-E2113-DEST

載運CaMV35S啟動子與重複強化子(E12)及煙草嵌紋病毒(Ω)之5'上游序列之二元載體pBE2113獲自Yuko Ohashi博士，國立農業生物資源研究所(National Institute of Agrobiological Resources)(Tsukuba, Japan)，參見Plant Cell Physiol. 37: 49-59 (1996)，且在將含有側接ccdB基因及抗氯黴素基因之attR重組位點的GATEWAY卡匣選殖於載體中之XbaI與SacI位點之間後使該二元載體pBE2113轉變成GATEWAY目的載體，其以GATEWAY卡匣替代 β -葡萄糖醛酸酶基因。用HindIII及SacI消化所得目的二元載體，且將含有E12-35S- Ω -GATEWAY卡匣之HindIII-SacI片段選殖於pBI101H中之HindIII與SacI位點之間。所得目的二元載體稱為pBI101H-E2113-DEST。pBI101H-E2113-DEST之T-DNA區之圖解展示於圖4E中。

由LR反應將NBB1 ORF自pDONR221-NBB1-2載體轉移至GATEWAY二元載體pBI101H-E2113-DEST。表現載體稱為pEI235S Ω -NBB1。pEI235S Ω -NBB1之T-DNA區之圖解展示於圖4F中。

產生基因轉殖髮狀根

由電穿孔將二元載體pEI235S Ω -NBB1引入髮根土壤桿菌菌株15834中。基本上如由Kanegae等人(Plant Physiol. 105(2):483-90 (1994))所述，使用葉圓盤法以pEI235S Ω -NBB1使含有表現A622之

35S-A622卡匣的T1代植物之葉組織(3號株C1)轉型。抗潮黴素(於B5培養基中之30 mg/L)用作選擇標記。使載運來自pEI235S Ω -NBB1之基因轉殖髮狀根(株E)及作為對照之受野生型髮根土壤桿菌感染而無T-DNA之基因轉殖髮狀根(WT株)在MS/B5液體培養基中生長兩週，且接著收集。

表現分析

如上文實例4所述，提取總蛋白質且進行免疫墨點分析。抗A622小鼠血清用於A622蛋白質偵測，而抗NBB1兔血清用於NBB1蛋白質偵測。基因轉殖顛茄髮狀根株(E2)表現大量NBB1與A622蛋白質(參見圖8)。

生物鹼分析

將基因轉殖顛茄E2及WT髮狀根在含有100 mg/l菸鹼酸之100 ml MS/B5液體培養基中培養三週。基本上如(Hashimoto等人，1992)所述，用1 M H₂SO₄提取E2及WT髮狀根中之菸鹼生物鹼，且純化。將生物鹼之質譜與權威標準之質譜比較後，由氣相層析法-質譜分析法(GC-MS)(具有HP-5 ms管柱之Hewlett Packard 5890系列II/JEOL MStation JMS700)鑑別生物鹼。將管柱溫度在100°C下維持10 min，以25°C/分鐘升至150°C，在150°C下保持1分鐘，以1°C/min升至170°C，在170°C下保持2分鐘，以30°C/min升至300°C，且接著在300°C下保持10分鐘。

偵測到小而獨特的新穎峰(參見圖9中之峰5)。對應於峰5之峰在WT株髮狀根中不可偵測。如圖10所示，峰5之化合物展示與菸鹼之MS分裂分布相同的MS分裂分布。此證明外源性NBB1及A622的表現對於在顛茄髮狀根中形成菸鹼而言為充分的。

實例9：藉由在A622啟動子控制下表現PMT增加菸鹼含量

描述pA622pro-DEST

pA622pro-DEST具有作為選擇標記之NPTII基因表現卡匣及HPT基因表現卡匣。使用含有A622啟動子之載體(Shoji等人, Plant Mol. Biol. 50, 427-440 (2002))作為模板及下文所示之A622啟動子特異性引子擴增1,407個鹼基對之A622啟動子, 且用HindIII及XbaI消化。將所得片段選殖於pBI101H中之HindIII與XbaI位點之間。在將含有側接ccdB基因及抗氯黴素基因之attR重組位點的GATEWAY卡匣選殖於二元載體中之XbaI與SacI之間後, 使二元載體轉變成GATEWAY目的載體。參見圖11A。

A622啟動子特異性引子

A622pro-01F 5' AAAAGCTTAGATCTCTCTTATGTTTCATG

HindIII位點加下劃線。

A622pro-02R

5'

TCTAGATTTACTCCTAGGGGAAGAAAAAAGTAGC

XbaI位點加下劃線。

製備PMT過度表現構築體

如上文實例4所述, 使用其中PMT ORF(NCBI寄存編號: D28506)選殖於pcDNAII(Invitrogen)(參見SEQ ID NO: 7B)之BstXI位點中之煙草PMT載體作為模板、以下基因特異性引子及attB序列轉接端引子擴增attB-PMT片段。由attB-PMT PCR產物與pDONR221(Invitrogen)之間的鹼基對重組反應產生GATEWAY入口純系pDONR221-PMT。

基因特異性引子

PMT-attB1 5' AAAAAGCAGGCTCAAAAATGGAAGTCATATC

PMT-attB2 5' AGAAAGCTGGGTTTAAGACTCGATCATACTTC

由LR反應將PMT ORF自pDONR221-PMT載體轉移至GATEWAY二元載體pA622pro-DEST。基因表現載體稱為pA622pro-PMTox。參見圖11B。

產生基因轉殖煙草植物

使 pA622pro-PMTox 轉型成根癌土壤桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105，其用於使野生型 K326 葉轉型。使基因轉殖 T0 芽再生，且轉移至生根培養基中。將若干生根之基因轉殖植物轉移至土壤中。

生物鹼分析

如上文實例4所述，自基因轉殖煙草葉提取生物鹼，且分析。分析在轉移至土壤後36天採樣之植物葉中的菸鹼含量。經 pA622pro-PMTox 轉型之若干基因轉殖株顯示菸鹼集聚比野生型 K326 植物經 AG-GUS 卡匣轉型之對照株更高。參見圖12。

實例10：藉由在 TobRD2 啟動子控制下表現 PMT 增加菸鹼含量
製備 PMT 過度表現構築體

由 LR 反應將 PMT ORF 自 pDONR221-PMT 載體轉移至 GATEWAY 二元載體 pTobRD2-DEST (參見圖4A)。基因表現載體稱為 pTobRD2-PMTox。參見圖11C。

產生基因轉殖煙草植物

使 pTobRD2-PMTox 轉型成根癌土壤桿菌菌株 EHA105，其用於使野生型 K326 葉轉型。使基因轉殖 T0 芽再生，且轉移至生根培養基中。將若干生根之基因轉殖植物轉移至土壤中。

生物鹼分析

如上文實例4所述，自基因轉殖煙草葉提取生物鹼，且分析。分析在轉移至土壤後36天採樣之植物葉中的菸鹼含量。若干基因轉殖株顯示菸鹼集聚比野生型 K326 植物經 TobRD2-GUS 卡匣轉型之對照株更高。參見圖13。

實例11：藉由在 A622 啟動子控制下表現 QPT 增加菸鹼含量
製備 QPT 過度表現構築體

使用 pBJY6 載體 (來自於 Kenzo Nakamura 博士, Nagoya University, Japan) 作為模板及下文所示之基因特異性引子擴增 QPT ORF 片段 (SEQ ID NO: 5B)。由 TOPO 選殖反應產生 GATEWAY 入口純系 pENTR-QPT。

QPT 基因特異性引子

QPT-F 5' CACCATGTTTAGAGCTATTCC

QPT-R 5' TCATGCTCGTTTTGTACGCC

由 LR 反應將 QPT ORF 自 pENTR-QPT 載體轉移至 GATEWAY 二元載體 pA622pro-DEST (參見圖 11A)。基因表現載體稱為 pA622pro-QPTox。參見圖 11D。

產生基因轉殖煙草植物

使 pA622pro-QPTox 轉型成根癌土壤桿菌菌株 EHA105，其用於使野生型 K326 葉轉型。使基因轉殖 T0 芽再生，且轉移至生根培養基中。將若干生根之基因轉殖植物轉移至土壤中。

分析生物鹼

如上文實例 4 所述，自基因轉殖煙草葉提取生物鹼，且分析。分析在轉移至土壤後 36 天採樣之植物葉中的菸鹼含量。若干基因轉殖株顯示菸鹼集聚比野生型 K326 植物經 A622-GUS 卡匣轉型之對照株更高。參見圖 14。

實例 12：藉由在 TobRD2 啟動子控制下表現 QPT 增加菸鹼含量
製備 QPT 過度表現構築體

由 LR 反應將 QPT ORF 自 pDONR221-QPT 載體轉移至 GATEWAY 二元載體 pTobRD2-DEST (參見圖 4A)。基因表現載體稱為 pTobRD2-QPTox。參見圖 11E。

產生基因轉殖煙草植物

使 pTobRD2-QPTox 轉型成根癌土壤桿菌菌株 EHA105，其用於使

野生型K326葉轉型。使基因轉殖T0芽再生，且轉移至生根培養基中。將若干生根之基因轉殖植物轉移至土壤中。

分析生物鹼

如上文實例4所述，自基因轉殖煙草葉提取生物鹼，且分析。分析在轉移至土壤後36天採樣之植物葉中的菸鹼含量。若干基因轉殖株顯示菸鹼集聚比野生型K326植物經TobRD2-GUS卡匣轉型之對照株更高。參見圖15。

實例13：藉由在A622啟動子控制下表現PMT及QPT增加菸鹼含量

描述pBI221-A622pro-DEST

pBI221-A622pro-DEST為用於建構多基因表現二元載體之基本載體。1,407個鹼基對之A622啟動子以作為模板之pUC19-A622profull-LUC載體及A622啟動子-特異性引子加以擴增，且用HindIII及XbaI消化。將所得片段選殖於pBI221(Clontech)之HindIII與XbaI位點之間，以用A622啟動子替代CaMV 35S啟動子。在將含有側接於ccdB基因及抗氯黴素基因之attR重組位點的GATEWAY卡匣選殖於載體中之XbaI與SacI位點之間後，使載體轉變成GATEWAY目的載體，其中以GATEWAY卡匣替代B-葡萄糖醛酸酶基因。接著將HindIII-EcoRI轉接子插入Nos終止子之3'末端處之EcoRI位點，產生pBI221-A622pro-DEST。

製備PMT-QPT過度表現構築體

為過度表現PMT與QPT蛋白質，將A622pro-PMT表現卡匣及A622pro-QPT表現卡匣以串聯方式選殖於二元載體中。首先，由LR反應將PMT ORF自pDONR221-PMT載體轉移至GATEWAY二元載體pBI221-A622pro-DEST。基因表現載體稱為pBI221-A622pro-PMT。將pBI221-A622pro-PMT用HindIII消化，且接著選殖至pA622pro-QPTox

載體之A622啟動子之5'末端處的HindIII位點中。所得PMT-QPT表現載體稱為pA622pro-PMTox-QPTox。pA622pro-PMTox-QPTox之T-DNA區之圖解展示於圖11F中。

產生基因轉殖煙草植物

使pA622pro-PMTox-QPTox轉型成根癌土壤桿菌菌株EHA105，其用於使野生型K326葉轉型。使基因轉殖T0芽再生，且轉移至生根培養基中。將若干已生根之基因轉殖植物轉移至土壤中。

分析生物鹼含量之程序

如上文實例4所述，自基因轉殖煙草葉提取生物鹼，且進行分析。分析在轉移至土壤後36天採樣之植物葉中的菸鹼含量。經A622pro-PMTox-QPTox轉型之若干株顯示菸鹼集聚比野生型K326植物經A622-GUS卡匣轉型之對照株更高。參見圖16。

實例14：藉由在TobRD2啟動子控制下表現PMT及QPT增加菸鹼含量

製備PMT-QPT過度表現構築體

為在TobRD2控制下過度表現PMT與QPT蛋白質，將TobRD2-PMT表現卡匣及TobRD2-QPT表現卡匣串聯選殖於二元載體中。首先，由LR反應將PMT ORF自pDONR221-PMT載體轉移至GATEWAY二元載體pBI221-TobRD2-DEST。基因表現載體稱為pBI221-TobRD2-PMT。用HindIII消化pBI221-TobRD2-PMT，且接著選殖至pTobRD2-QPTox中之TobRD2啟動子之5'末端處的HindIII位點中。所得PMT-QPT表現載體稱為pTobRD2-PMTox-QPTox。參見圖11G。

產生基因轉殖煙草植物

使pTobRD2-PMTox-QPTox轉型成根癌土壤桿菌菌株EHA105，其用於使野生型K326葉轉型。使基因轉殖T0芽再生，且轉移至生根培養基中。將若干生根之基因轉殖植物轉移至土壤中。

分析生物鹼含量之程序

如上文實例4所述，自基因轉殖煙草葉提取生物鹼，且分析。分析在轉移至土壤後36天採樣之植物葉中的菸鹼含量。經TobRD2-PMTox-QPTox轉型之若干基因轉植株顯示菸鹼集聚比野生型K326植物經TobRD2-GUS卡匣轉型之對照株更高。參見圖17。

實例15：藉由表現與其他生物鹼生物合成酶組合之NBB1在芥菜中產生菸鹼性生物鹼

芥菜植物不產生菸鹼性生物鹼。然而，許多菸鹼性生物鹼之前驅體(菸鹼酸)為常見代謝物。測試在芥菜中共同表現NBB1與A622之作用。由於菸鹼為尤其令人關注之生物鹼，因此PMT的表現包括在內以增加甲基腐胺(菸鹼中之吡咯啶環的前驅體)之可用性。

製備A622過度表現構築體

將含有在第一ATG處所引入之NcoI位點的煙草A622 cDNA(Hibi等人，1994)自pcDNAII(Invitrogen)切下作為NcoI-BamHI片段且在CaMV35S啟動子與重複強化子之控制下選殖至pRTL2(Restrepo等人，Plant Cell 2:987-98 (1990))中。用HindIII切下此A622過度表現卡匣且在二元載體pGA482(Amersham)中選殖以產生A622表現載體pGA-A622。

產生基因轉殖35S-A622植物

由電穿孔將二元載體pGA-A622引入根癌土壤桿菌菌株LBA4404中。基本上如由Akama等人，Plant cell Reports 12: 7-11 (1992)所述，使用癒合組織誘導-植物再生法由根癌土壤桿菌使擬南芥植物(生態型：Wassilewskija(WS))轉型。抗康黴素(於芽誘導培養基上之50 mg/L)用作用於pGA-A622轉型之選擇標記。自癒合組織再生基因轉殖植物，在23°C在16 h光照/8 h黑暗條件下在生長箱中生長。

製備NBB1及PMT過度表現構築體

由LR反應將NBB1 ORF(SEQ ID NO: 1B)自pDONR221-NBB1-2載體轉移至GATEWAY二元載體pGWB2(參見圖18A)。NBB1連接CAMV 35S啟動子之基因表現載體稱為p35S-NBB1。參見圖18B。類似地，由LR反應將PMT ORF自pDONR221-PMT載體轉移至pGWB2。基因表現載體稱為p35S-PMT。參見圖18C。

產生基因轉殖35S-A622-35S-NBB1植物、35S-A622-35S-PMT植物及35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT植物

由電穿孔將二元載體p35S-NBB1及p35S-PMT引入根癌土壤桿菌菌株EHA105中。基本上如由Clough等人，Plant J. 16: 735-43 (1998)所述，使用浸花法由根癌土壤桿菌使載運pGA-A622之T1代植物轉型。抗潮黴素(於芽誘導培養基上之25 mg/L)用作用於p35S-NBB1及p35S-PMT轉型之選擇標記。使基因轉殖植物在23℃在16 h光照/8 h黑暗條件下在生長箱中生長。由使用35S啟動子引子及NBB1或PMT基因特異性引子之基因組PCR篩選所得基因轉殖植物。

用於篩選35S-A622-35S-NBB1植物之引子

35S-F 5' ACCCTTCCTCTATATAAGGAAG

NBB1-1140 5' TGAGCCCAAGCTGTTTCAGAATCC

用於篩選35S-A622-35S-PMT植物之引子

35S-F 5' ACCCTTCCTCTATATAAGGAAG

PMT-01R 5' CGCTAAACTCTGAAAACCAGC

使PCR陽性35S-A622-35S-NBB1植物與35S-A622-35S-PMT植物雜交以產生35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT植物。由使用各自表現卡匣特異性引子對之基因組PCR篩選F1子代。

自PCR陽性株提取總蛋白質。立即使用研砵及研杵在含有1 mM 苯基甲基磺醯氟及200 mM二硫蘇糖醇之提取緩衝液(100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油)中均化經冷凍之根。在使勻漿離心後，

由SDS-PAGE分離上清液中之可溶性蛋白質。如由Shoji等人，Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002)所述，使用用於A622蛋白質偵測之抗A622小鼠血清及用於NBB1蛋白質偵測之抗NBB1兔血清進行免疫墨點分析。所獲得之基因轉殖株表現含有A622與NBB1多肽。參見圖19。

分析生物鹼含量之程序

選擇表現NBB1及A622之基因轉殖株且用於生物鹼分析。如上文實例4所述，自基因轉殖煙草葉提取生物鹼，且分析。如圖20所示，在NBB1-A622-PMT株而非A622-PMT株中發現對應於菸鹼溶離時間之新峰。此顯示共同表現NBB1及A622比單獨表現A622對於在通常不產生生物鹼之植物中產生菸鹼性生物鹼而言更有效。

實例16：在非植物細胞中表現NBB1及A622

Bac-至-Bac表現系統(Invitrogen)昆蟲細胞-桿狀病毒表現系統用於在昆蟲細胞中表現具有6xHis標記之NBB1及A622蛋白質。為產生表現純系，由LR反應將NBB1 ORF及A622 ORF(分別為SEQ ID NO: 1B及SEQ ID NO: 3B)自個別DONR載體(pDONR-NBB1-2、pDONR-A622)轉移至GATEWAY載體pDEST10(Invitrogen)。所得表現純系稱為pDEST10-NBB1及pDEST10-A622。

使PDEST10-NBB1及pDEST10-A622轉型成最大效率DH10Bac細胞(Invitrogen)以回收重組穿梭載體DNA。使用基因特異性引子及M13反向引子之PCR分析用於驗證含有A622及NBB1之重組穿梭載體的存在。參見圖21A。

用Cellfectin(Invitrogen)將含有個別基因表現卡匣之所得重組穿梭載體轉染至昆蟲細胞Sf9。用病毒儲備庫感染Sf9細胞兩次以擴增及擴大病毒。

如以抗NBB1及抗A622抗血清之免疫墨點法所示，在昆蟲細胞培

養物中產生NBB1及A622。藉由吸附於Ni-NTA管柱上，接著用0.5 M 咪唑溶離來純化含有6xHis標記之重組蛋白質。參見圖21B。

【圖式簡單說明】

圖1：NBB1表現之RNA墨點分析

圖2：NBB1與花菱草小蘗鹼橋聯酶(*Eschscholzia californica* berberine bridge enzyme)(EcBBE)的比對

圖3：使用NBB1多肽及植物類BBE蛋白質之序列所建構之系統樹

圖4A：pTobRD2-DEST之T-DNA區

圖4B：pTobRD2-NBB1ox之T-DNA區

圖4C：pTobRD2-A622ox之T-DNA區

圖4D：pTobRD2-A622ox-NBB1ox之T-DNA區

圖4E：pBI101H-E2113-DEST之T-DNA區

圖4F：pEI235SΩ-NBB1之T-DNA區

圖5A：煙草髮狀根中之NBB1的免疫墨點分析

圖5B：煙草髮狀根中之A622的免疫墨點分析

圖6：TobRD2-NBB1(TN)、TobRD2-A622(TA)、TobRD2-NBB1-A622(TNA)之髮狀根中之菸鹼生物鹼含量

圖7：基因轉殖顛茄(*A. belladonna*)中之A622蛋白質的表現

圖8：表現NBB1及A622之基因轉殖顛茄

圖9：在表現NBB1及A622之基因轉殖顛茄髮狀根中之菸鹼合成

圖10：在表現A622及NBB1之顛茄髮狀根中所合成之菸鹼的MS分布

圖11A：pA622pro-DEST之T-DNA區

圖11B：pA622pro-PMTox之T-DNA區

圖11C：pTobRD2-PMTox之T-DNA區

圖11D：pA622pro-QPTox之T-DNA區

圖 11E：pTobRD2-QPTox之T-DNA區

圖 11F：pA622pro-PMTox-QPTox之T-DNA區

圖 11G：pTobRD2-PMTox-QPTox之T-DNA區

圖 12：在經A622pro-PMTox(AP-1至AP-24)轉型之煙草植物之葉中的菸鹼含量。AG-1至AG-4為經A622-GUS轉型之對照植物

圖 13：在經TobRD2-PMTox(TP-1至TP-14)轉型之煙草植物之葉中的菸鹼含量。TG-1至TG-3為經TobRD2-GUS轉型之對照植物

圖 14：在經A622pro-QPTox(AQ-1至AQ-15)轉型之煙草植物之葉中的菸鹼含量。AG-1至AG-4為經A622-GUS轉型之對照植物

圖 15：在經TobRD2-QPTox(TQ-1至TQ-14)轉型之煙草植物之葉中的菸鹼含量。TG-1至TG-3為經TobRD2-GUS轉型之對照植物

圖 16：在經A622pro-PMTox-QPTox(APQ-1至APQ-27)轉型之煙草植物之葉中的菸鹼含量。AG-1至AG-3為經A622-GUS轉型之對照植物

圖 17：在經pTobRD2-PMTox-QPTox(TPQ-1至TPQ-24)轉型之煙草植物之葉中的菸鹼含量。TG-1至TG-3為經TobRD2-GUS轉型之對照植物

圖 18A：pGWB2之T-DNA區

圖 18B：p35S-NBB1之T-DNA區

圖 18C：p35S-NBB1之T-DNA區

圖 19：經35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT卡匣轉型之擬南芥(*Arabidopsis thaliana*)株的免疫墨點分析

圖 20：共同表現NBB1、A622及PMT之基因轉殖芥菜(*Arabidopsis*)

圖 21A：證實重組穿梭載體中A622及NBB1的存在

圖 21B：偵測昆蟲細胞Sf9細胞及Ni-NTA管柱溶離液中之A622及NBB1

序 列 表

<110> 日本國立大學法人奈良先端科學技術大學院大學

<120> 菸鹼性生物鹼含量的增加

<130> 045952-0144

<140> TW 096116136

<141> 2007-05-07

<150> PCT/IB2006/004043

<151> 2006-09-13

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 3. 3

<210> 1

<211> 1749

<212> DNA

<213> 菸草屬(Nicotiana sp.)

<400> 1

acgcggggag	aaatacatatc	aacatgtttc	cgctcataat	tctgatcagc	ttttcacttg	60
cttccttgct	tgaaactgct	actggagctg	ttacaaatct	ttcagcctgc	ttaatcaacc	120
acaatgtcca	taacttctct	atttacccca	caagtagaaa	ttactttaac	ttgctccact	180
tctcccttca	aaatcttcgc	tttgctgcac	ctttcatgcc	gaaaccaacc	ttcattatcc	240
taccaagcag	taaggaggag	ctcgtgagca	ccattttttg	ttgcagaaaa	gcattcttatg	300
aaatcagagt	aaggtgcggc	ggacacagtt	acgaaggaa	ttcttacggt	tcctttgacg	360
cttctccatt	cgtgatcggt	gacttgatga	aattagacga	cgtttcagta	gatttggtatt	420
ctgaaacagc	ttgggctcag	ggcggcgcaa	caattggcca	aattttattat	gccattgcca	480
aggttaagtga	cgttcatgca	ttttcagcag	gttcgggacc	aacagtagga	tctggagggtc	540
atatttcagg	tgggtgattt	ggactttttat	ctagaaaatt	cggacttgct	gctgataatg	600
tcgttgatgc	tcttcttatt	gatgctgatg	gacggttatt	agaccgaaaa	gccatgggcg	660
aagacgtggt	ttgggcaatc	agaggtggcg	gcggtggaaa	ttggggcatt	gtttatgcct	720
ggaaaattcg	attactcaaa	gtgcctaaaa	tcgtaacaac	ttgtatgata	tataggcctg	780
gatccaaaca	atacgtggct	caaatacttg	agaaatggca	aatagttact	ccaaatttgg	840
tcgatgattt	tactctagga	gtactgctga	gacctgcaga	tctaccgcgc	gatatgaaat	900
atggttaatac	tactcctatt	gaaatatttc	cccaattcaa	tgcactttat	ttgggtccaa	960
aaactgaagt	tctttccata	tcgaatgaga	catttcggga	gctaggcggt	agaatgatg	1020
agtgcaggga	aatgacttgg	gtagagtcag	cacttttctt	ctccgaatta	gctgacgtta	1080
acgggaactc	gactggtgat	atctcccgct	tgaaagaacg	ttacatggac	ggaaaagggt	1140
ttttcaaagg	caaaacggac	tacgtgaaga	agccagtttc	aatggatggg	atgctaacat	1200
ttcttgtgga	actcgagaaa	aaccggaagg	gatattctgt	ctttgatcct	tatggcggag	1260
ccatggacaa	gattagtgat	caagctattg	ctttccctca	tagaaaagg	aaccttttcg	1320
cgattcagta	tctagcacag	tggaatgaag	aggacgatta	catgagcgac	gtttacatgg	1380
agtggataag	aggattttac	aatacaatga	cgccttttgt	ttcaagctcg	ccaaggggag	1440
cttatatcaa	ctacttggat	atggatcttg	ggtcgaatat	ggtcgacgac	tacttattgc	1500
gaaatgctag	tagcagtagt	ccttcttctt	ctgttgatgc	tgtggagaga	gctagagcgt	1560
ggggtgagat	gtatttcttg	cataactatg	ataggtttgt	taaagctaag	acacaaattg	1620
atccactaaa	tgtttttcga	catgaacaga	gtattcctcc	tatgcttggt	tcaacgcaag	1680
agcacaagta	tagcagtga	tgagatttaa	aatgtactac	cttgagagag	attccggttg	1740
tagttttcc						1749

<210> 2

<211> 559

<212> 蛋白質

<213> 菸草屬(Nicotiana sp.)

<400> 2

```

Met Phe Pro Leu Ile Ile Leu Ile Ser Phe Ser Leu Ala Ser Leu Ser
 1             5             10             15

Glu Thr Ala Thr Gly Ala Val Thr Asn Leu Ser Ala Cys Leu Ile Asn
          20             25             30

His Asn Val His Asn Phe Ser Ile Tyr Pro Thr Ser Arg Asn Tyr Phe
          35             40             45

Asn Leu Leu His Phe Ser Leu Gln Asn Leu Arg Phe Ala Ala Pro Phe
          50             55             60

Met Pro Lys Pro Thr Phe Ile Ile Leu Pro Ser Ser Lys Glu Glu Leu
          65             70             75             80

Val Ser Thr Ile Phe Cys Cys Arg Lys Ala Ser Tyr Glu Ile Arg Val
          85             90             95

Arg Cys Gly Gly His Ser Tyr Glu Gly Thr Ser Tyr Val Ser Phe Asp
          100            105            110

Ala Ser Pro Phe Val Ile Val Asp Leu Met Lys Leu Asp Asp Val Ser
          115            120            125

Val Asp Leu Asp Ser Glu Thr Ala Trp Ala Gln Gly Gly Ala Thr Ile
          130            135            140

Gly Gln Ile Tyr Tyr Ala Ile Ala Lys Val Ser Asp Val His Ala Phe
          145            150            155            160

Ser Ala Gly Ser Gly Pro Thr Val Gly Ser Gly Gly His Ile Ser Gly
          165            170            175

Gly Gly Phe Gly Leu Leu Ser Arg Lys Phe Gly Leu Ala Ala Asp Asn
          180            185            190

Val Val Asp Ala Leu Leu Ile Asp Ala Asp Gly Arg Leu Leu Asp Arg
          195            200            205

Lys Ala Met Gly Glu Asp Val Phe Trp Ala Ile Arg Gly Gly Gly Gly
          210            215            220

Gly Asn Trp Gly Ile Val Tyr Ala Trp Lys Ile Arg Leu Leu Lys Val
          225            230            235            240

Pro Lys Ile Val Thr Thr Cys Met Ile Tyr Arg Pro Gly Ser Lys Gln
          245            250            255

Tyr Val Ala Gln Ile Leu Glu Lys Trp Gln Ile Val Thr Pro Asn Leu
          260            265            270

```

Val Asp Asp Phe Thr Leu Gly Val Leu Leu Arg Pro Ala Asp Leu Pro
275 280 285

Ala Asp Met Lys Tyr Gly Asn Thr Thr Pro Ile Glu Ile Phe Pro Gln
290 295 300

Phe Asn Ala Leu Tyr Leu Gly Pro Lys Thr Glu Val Leu Ser Ile Ser
305 310 315 320

Asn Glu Thr Phe Pro Glu Leu Gly Val Lys Asn Asp Glu Cys Lys Glu
325 330 335

Met Thr Trp Val Glu Ser Ala Leu Phe Phe Ser Glu Leu Ala Asp Val
340 345 350

Asn Gly Asn Ser Thr Gly Asp Ile Ser Arg Leu Lys Glu Arg Tyr Met
355 360 365

Asp Gly Lys Gly Phe Phe Lys Gly Lys Thr Asp Tyr Val Lys Lys Pro
370 375 380

Val Ser Met Asp Gly Met Leu Thr Phe Leu Val Glu Leu Glu Lys Asn
385 390 395 400

Pro Lys Gly Tyr Leu Val Phe Asp Pro Tyr Gly Gly Ala Met Asp Lys
405 410 415

Ile Ser Asp Gln Ala Ile Ala Phe Pro His Arg Lys Gly Asn Leu Phe
420 425 430

Ala Ile Gln Tyr Leu Ala Gln Trp Asn Glu Glu Asp Asp Tyr Met Ser
435 440 445

Asp Val Tyr Met Glu Trp Ile Arg Gly Phe Tyr Asn Thr Met Thr Pro
450 455 460

Phe Val Ser Ser Ser Pro Arg Gly Ala Tyr Ile Asn Tyr Leu Asp Met
465 470 475 480

Asp Leu Gly Val Asn Met Val Asp Asp Tyr Leu Leu Arg Asn Ala Ser
485 490 495

Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Val Asp Ala Val Glu Arg Ala Arg Ala
500 505 510

Trp Gly Glu Met Tyr Phe Leu His Asn Tyr Asp Arg Leu Val Lys Ala
515 520 525

Lys Thr Gln Ile Asp Pro Leu Asn Val Phe Arg His Glu Gln Ser Ile
530 535 540

Pro Pro Met Leu Gly Ser Thr Gln Glu His Lys Tyr Ser Ser Glu
545 550 555

<210> 3
 <211> 1179
 <212> DNA
 <213> 菸草屬(Nicotiana sp.)

```

<400> 3
aaaaatccga ttttaattcct agtttctagc cctccacct taacccgaag ctactttttt 60
tcttccccta ggagtaaaat ggttgatca gagaaaagca agatcttaat aattggaggc 120
acaggctaca taggaaaata cttggtggag acaagtgcaa aatctgggca tccaactttc 180
gctcttatca gagaaagcac actcaaaaac cccgagaaat caaaactcat cgacacattc 240
aagagttatg gggttacgct acttttttga gatatatcca atcaagagag ctactcaag 300
gcaatcaagc aagttgatgt ggtgatttcc actgtcggag gacagcaatt tactgatcaa 360
gtgaacatca tcaaagcaat taaagaagct ggaaatatca agagatttct tccttcagaa 420
tttgattttg atgtggatca tgctcgtgca attgaaccag ctgcatcact cttegtctta 480
aaggaagaa tcaggaggat gatagaggca gaaggaattc catacacata tgtaattctg 540
aattggtttg cagattttctt cttgcccac ttggggcagt tagaggccaa aacccctcct 600
agagacaaag ttgtcatttt tggcgatgga aatcccaaag caatatatgt gaaggaagaa 660
gacatagcga catacactat cgaagcagta gatgatccac ggacattgaa taagactctt 720
cacatgagac cacctgccaa tattctatcc ttcaacgaga tagtgtcctt gtgggaggac 780
aaaattggga agaccctcga gaagtatat ctatcagagg aagatattct ccagattgta 840
caagagggac ctctgccatt aaggactaat ttggccatat gccattcagt ttttgtaaat 900
ggagattctg caaactttga ggttcagcct cctacaggtg tcgaagccac tgagctatat 960
cmetaagtga aatacacaaac cgtcgacgag ttctacaaca aatttgtcta gtttgtcgat 1020
atcaatctgc ggtgactcta tcaaacttgt tgtttctatg aatctattga gtgtaattgc 1080
aataattttc gcttcagtgc ttttgcaact gaaatgtact agctagttga acgctagcta 1140
aattctttac tgttgttttc tatttttcgt cttattcca 1179
    
```

<210> 4
 <211> 310
 <212> 蛋白質
 <213> 菸草屬(Nicotiana sp.)

```

<400> 4
Met Val Val Ser Glu Lys Ser Lys Ile Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly
 1           5           10           15

Tyr Ile Gly Lys Tyr Leu Val Glu Thr Ser Ala Lys Ser Gly His Pro
 20           25           30

Thr Phe Ala Leu Ile Arg Glu Ser Thr Leu Lys Asn Pro Glu Lys Ser
 35           40           45

Lys Leu Ile Asp Thr Phe Lys Ser Tyr Gly Val Thr Leu Leu Phe Gly
 50           55           60

Asp Ile Ser Asn Gln Glu Ser Leu Leu Lys Ala Ile Lys Gln Val Asp
 65           70           75           80

Val Val Ile Ser Thr Val Gly Gly Gln Gln Phe Thr Asp Gln Val Asn
 85           90           95

Ile Ile Lys Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe Leu Pro
100           105           110

Ser Glu Phe Gly Phe Asp Val Asp His Ala Arg Ala Ile Glu Pro Ala
115           120           125
    
```

Ala Ser Leu Phe Ala Leu Lys Val Arg Ile Arg Arg Met Ile Glu Ala
 130 135 140

Glu Gly Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ile Cys Asn Trp Phe Ala Asp Phe
 145 150 155 160

Phe Leu Pro Asn Leu Gly Gln Leu Glu Ala Lys Thr Pro Pro Arg Asp
 165 170 175

Lys Val Val Ile Phe Gly Asp Gly Asn Pro Lys Ala Ile Tyr Val Lys
 180 185 190

Glu Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Thr Ile Glu Ala Val Asp Asp Pro Arg
 195 200 205

Thr Leu Asn Lys Thr Leu His Met Arg Pro Pro Ala Asn Ile Leu Ser
 210 215 220

Phe Asn Glu Ile Val Ser Leu Trp Glu Asp Lys Ile Gly Lys Thr Leu
 225 230 235 240

Glu Lys Leu Tyr Leu Ser Glu Glu Asp Ile Leu Gln Ile Val Gln Glu
 245 250 255

Gly Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asn Leu Ala Ile Cys His Ser Val Phe
 260 265 270

Val Asn Gly Asp Ser Ala Asn Phe Glu Val Gln Pro Pro Thr Gly Val
 275 280 285

Glu Ala Thr Glu Leu Tyr Pro Lys Val Lys Tyr Thr Thr Val Asp Glu
 290 295 300

Phe Tyr Asn Lys Phe Val
 305 310

<210> 5
 <211> 1399
 <212> DNA
 <213> 菸草屬(Nicotiana sp.)

<400> 5
 caaaaactat tttccacaaa attcatttca caaccccccc aaaaaaaaac catgtttaga 60
 gctattcctt tcaactgtac agtgcaccc tatgcaatta cagctccaag gttgggtggtg 120
 aaaatgtcag caatagccac caagaatata agagtggagt cattagaggt gaaaccacca 180
 gcacacccaa cttatgattt aaagggaagt atgaaaactg cactctctga agatgctggg 240
 aatttaggag atgtgacttg taaggcgaca attcctcttg atatggaatc cgatgctcat 300
 tttctagcaa aggaagacgg gatcatagca ggaattgcac ttgctgagat gatattcgcg 360
 gaagttgatc cttcattaaa ggtggagtgg tatgtaaata atggcgataa agttcataaa 420
 ggcttgaaat ttggcaaagt acaaggaaaac gcttacaaca ttgttatagc tgagagggtt 480
 gttctcaatt ttatgcaaag aatgagtgga atagctacac taactaagga aatggcagat 540
 gctgcacacc ctgcttacat cttggagact aggaaaactg ctcttgatt acgtttggtg 600
 gataaatggg cggatttgat cgggtggggg aagaatcaca gaatgggctt atttgatatg 660
 gtaatgataa aagacaatca catatctgct gctggagggtg tcggcaaagc tctaaaatct 720
 gtggatcagt atttgagca aaataaactt caaatagggg ttgaggttga aaccaggaga 780
 attgaagaag tacgtgaggt tctagactat gcatctcaaa caaagacttc gttgactagg 840
 ataatgctgg acaatatggt tgttccatta tctaacggag atattgatgt atccatgctt 900

```

aaggaggctg tagaattgat caatgggagg ttgatacgg aggccttcagg aaatgttacc 960
cttgaacacg tacacaagat tggacaaaact ggtgttacct acatttctag tggcgccctg 1020
acgcattccg tgaagcact tgacatttcc ctgaagatcg atacagagct cgccttgaa 1080
gttggaggcg gtacaaaacg agcatgagcg ccattacttc tgctataggg ttggagtaaa 1140
agcagctgaa tagctgaaag gtgcaataaa gaatcatttt actagttgtc aaacaaaaga 1200
tccttcactg tgtaatcaaa caaaaagatg taaattgctg gaatatctca gatggctctt 1260
ttccaacctt attgcttgag ttggtaattt cattatagct ttgttttcat gtttcatgga 1320
atttgttaca atgaaaatac ttgatttata agtttggtgt atgtaaaatt ctgtgttact 1380
tcaaatattt tgagatgtt                                     1399

```

<210> 6

<211> 351

<212> 蛋白質

<213> 菸草屬(Nicotiana sp.)

<400> 6

```

Met Phe Arg Ala Ile Pro Phe Thr Ala Thr Val His Pro Tyr Ala Ile
 1           5           10           15

Thr Ala Pro Arg Leu Val Val Lys Met Ser Ala Ile Ala Thr Lys Asn
          20           25           30

Thr Arg Val Glu Ser Leu Glu Val Lys Pro Pro Ala His Pro Thr Tyr
      35           40           45

Asp Leu Lys Glu Val Met Lys Leu Ala Leu Ser Glu Asp Ala Gly Asn
 50           55           60

Leu Gly Asp Val Thr Cys Lys Ala Thr Ile Pro Leu Asp Met Glu Ser
 65           70           75           80

Asp Ala His Phe Leu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Ile Ala Gly Ile Ala
          85           90           95

Leu Ala Glu Met Ile Phe Ala Glu Val Asp Pro Ser Leu Lys Val Glu
      100           105           110

Trp Tyr Val Asn Asp Gly Asp Lys Val His Lys Gly Leu Lys Phe Gly
      115           120           125

Lys Val Gln Gly Asn Ala Tyr Asn Ile Val Ile Ala Glu Arg Val Val
      130           135           140

Leu Asn Phe Met Gln Arg Met Ser Gly Ile Ala Thr Leu Thr Lys Glu
      145           150           155           160

Met Ala Asp Ala Ala His Pro Ala Tyr Ile Leu Glu Thr Arg Lys Thr
          165           170           175

Ala Pro Gly Leu Arg Leu Val Asp Lys Trp Ala Val Leu Ile Gly Gly
          180           185           190

Gly Lys Asn His Arg Met Gly Leu Phe Asp Met Val Met Ile Lys Asp
      195           200           205

Asn His Ile Ser Ala Ala Gly Gly Val Gly Lys Ala Leu Lys Ser Val
      210           215           220

```

Asp Gln Tyr Leu Glu Gln Asn Lys Leu Gln Ile Gly Val Glu Val Glu
 225 230 235 240
 Thr Arg Thr Ile Glu Glu Val Arg Glu Val Leu Asp Tyr Ala Ser Gln
 245 250 255
 Thr Lys Thr Ser Leu Thr Arg Ile Met Leu Asp Asn Met Val Val Pro
 260 265 270
 Leu Ser Asn Gly Asp Ile Asp Val Ser Met Leu Lys Glu Ala Val Glu
 275 280 285
 Leu Ile Asn Gly Arg Phe Asp Thr Glu Ala Ser Gly Asn Val Thr Leu
 290 295 300
 Glu Thr Val His Lys Ile Gly Gln Thr Gly Val Thr Tyr Ile Ser Ser
 305 310 315 320
 Gly Ala Leu Thr His Ser Val Lys Ala Leu Asp Ile Ser Leu Lys Ile
 325 330 335
 Asp Thr Glu Leu Ala Leu Glu Val Gly Arg Arg Thr Lys Arg Ala
 340 345 350

<210> 7
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> 菸草屬(Nicotiana sp.)

<400> 7
 ggaaaaataca aaccataata ctttctcttc ttcaatttgt ttagtttaat tttgaaaatg 60
 gaagtcatat ctaccaacac aaatggctct accatcttca agaatgggtgc cattccccatg 120
 aatggccacc aaaatggcac ttctgaacac ctcaacggct accagaatgg cacttccaaa 180
 caccaaaacg ggcaccagaa tggcactttc gaacatcgga acggccacca gaatgggaca 240
 tccgaacaac agaacgggac aatcagccat gacaatggca acgagctact gggaagctcc 300
 gactctatta agcctggctg gttttcagag ttttagcgcat tatggccagg tgaagcattc 360
 tcaactaagg ttgagaagtt actattccag gggaagtctg attaccaaga tgtcatgttc 420
 tttgagtcag caacttatgg gaaggttctg actttggatg gagcaattca acatacagag 480
 aatgggtggat ttccatacac tgaaatgatt gttcatctac cacttgggtc catcccaaac 540
 ccaaaaaagg ttttgatcat cggcggagga attggtttta cattattcga aatgcttctg 600
 tatccttcaa tcgaaaaaat tgacattgtt gagatcgatg acgtggtagt tgatgtatcc 660
 agaaaaat tcccttatct ggcagctaat tttaacgatc ctggtgtaac cctagttctc 720
 ggagatggag ctgcatttgt aaaggctgca caagcgggat attatgatgc tattatagtg 780
 gactcttctg atcccattgg tccagcaaaa gatttgtttg agaggccatt ctttgaggca 840
 gtagccaaag cccttaggcc aggaggagtt gtatgcacac aggctgaaag catttggtct 900
 catatgcata ttattaagca aatcattgct aactgtcgtc aagtctttaa gggttctgtc 960
 aactatgctt ggacaaccgc tccaacatat cccacgggtg tgatcggtta tatgctctgc 1020
 tctactgaag ggccagaagt tgacttcaag aatccagtaa atccaattga caaagagaca 1080
 actcaagtca agtccaaatt aggacctctc aagttctaca actctgatat tcacaaagca 1140
 gcattcattt taccatcttt cgccagaagt atgatcgagt cttaatcaag tgaataatga 1200
 aacttggtag tacaatcatt ggaccaagat cgagtcttaa tcaagtgaat aaataagtga 1260
 aatgcgacgt attgtaggag aattctgcag taattatcat aatttccaat tcacaatcat 1320
 tgtaaaattc tttctctgtg gtgtttcgta ctttaataata aattttcctg ctgaagtttt 1380
 gaatcg 1386

<210> 8

<211> 375

<212> 蛋白質

<213> 菸草屬(Nicotiana sp.)

<400> 8

Met Glu Val Ile Ser Thr Asn Thr Asn Gly Ser Thr Ile Phe Lys Asn
1 5 10 15

Gly Ala Ile Pro Met Asn Gly His Gln Asn Gly Thr Ser Glu His Leu
20 25 30

Asn Gly Tyr Gln Asn Gly Thr Ser Lys His Gln Asn Gly His Gln Asn
35 40 45

Gly Thr Phe Glu His Arg Asn Gly His Gln Asn Gly Thr Ser Glu Gln
50 55 60

Gln Asn Gly Thr Ile Ser His Asp Asn Gly Asn Glu Leu Leu Gly Ser
65 70 75 80

Ser Asp Ser Ile Lys Pro Gly Trp Phe Ser Glu Phe Ser Ala Leu Trp
85 90 95

Pro Gly Glu Ala Phe Ser Leu Lys Val Glu Lys Leu Leu Phe Gln Gly
100 105 110

Lys Ser Asp Tyr Gln Asp Val Met Leu Phe Glu Ser Ala Thr Tyr Gly
115 120 125

Lys Val Leu Thr Leu Asp Gly Ala Ile Gln His Thr Glu Asn Gly Gly
130 135 140

Phe Pro Tyr Thr Glu Met Ile Val His Leu Pro Leu Gly Ser Ile Pro
145 150 155 160

Asn Pro Lys Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Gly Ile Gly Phe Thr Leu
165 170 175

Phe Glu Met Leu Arg Tyr Pro Ser Ile Glu Lys Ile Asp Ile Val Glu
180 185 190

Ile Asp Asp Val Val Val Asp Val Ser Arg Lys Phe Phe Pro Tyr Leu
195 200 205

Ala Ala Asn Phe Asn Asp Pro Arg Val Thr Leu Val Leu Gly Asp Gly
210 215 220

Ala Ala Phe Val Lys Ala Ala Gln Ala Gly Tyr Tyr Asp Ala Ile Ile
225 230 235 240

Val Asp Ser Ser Asp Pro Ile Gly Pro Ala Lys Asp Leu Phe Glu Arg
245 250 255

Pro Phe Phe Glu Ala Val Ala Lys Ala Leu Arg Pro Gly Gly Val Val
260 265 270

Cys Thr Gln Ala Glu Ser Ile Trp Leu His Met His Ile Ile Lys Gln
 275 280 285
 Ile Ile Ala Asn Cys Arg Gln Val Phe Lys Gly Ser Val Asn Tyr Ala
 290 295 300
 Trp Thr Thr Ala Pro Thr Tyr Pro Thr Gly Val Ile Gly Tyr Met Leu
 305 310 315 320
 Cys Ser Thr Glu Gly Pro Glu Val Asp Phe Lys Asn Pro Val Asn Pro
 325 330 335
 Ile Asp Lys Glu Thr Thr Gln Val Lys Ser Lys Leu Gly Pro Leu Lys
 340 345 350
 Phe Tyr Asn Ser Asp Ile His Lys Ala Ala Phe Ile Leu Pro Ser Phe
 355 360 365
 Ala Arg Ser Met Ile Glu Ser
 370 375

<210> 9
 <211> 1680
 <212> DNA
 <213> 菸草屬 (Nicotiana sp.)

<400> 9
 atgtttccgc tcataattct gatcagcttt tcacttgctt ccttgtctga aactgctact 60
 ggagctgtta caaatctttc agcctgctta atcaaccaca atgtccataa cttctctatt 120
 taccacacaa gttagaatta cttaacttg ctccacttct ccttcacaaa tcttcgcttt 180
 gctgcacctt tcatgccgaa accaaccctc attatcctac caagcagtaa ggaggagctc 240
 gtgagcacca tttttgttg cagaaaagca tcttatgaaa tcagagtaa gtgcggcgga 300
 cacagttacg aaggaaactt ttacgtttcc tttgacgctt ctccattcgt gatcggtgac 360
 ttgatgaaat tagacgacgt ttcagtagat ttggattctg aaacagcttg ggctcagggc 420
 ggcgcaacaa ttggccaaat ttattatgcc attgccaaagg taagtgcagt tcatgcattt 480
 tcagcagggt cgggaccaac agtaggatct ggaggtcata tttcagggtg tggatttggg 540
 cttttatcta gaaaattcgg acttgctgct gataatgtcg ttgatgctct tcttattgat 600
 gctgatggac gggtattaga ccgaaaagcc atgggcgaag acgtgttttg ggcaatcaga 660
 ggtggcgggc gtggaaattg gggcattgtt tatgcctgga aaattcgatt actcaaagtg 720
 cctaaaatcg taacaacttg tatgatctat aggcctggat ccaaacaata cgtggctcaa 780
 atacttgaga aatggcaaat agttactcca aatttggctg atgattttac tctaggagta 840
 ctgctgagac ctgcagatct acccgcggat atgaaatatg gtaatactac tctattgaa 900
 atatttcccc aattcaatgc actttatttg ggtccaaaaa ctgaagtctt tcccatatcg 960
 aatgagacat ttccggagct aggcgttaag aatgatgagt gcaaggaaat gacttgggta 1020
 gagtcagcac ttttcttctc cgaattagct gacgttaacg ggaactcgac tggatgatc 1080
 tcccgctctga aagaacgcta catggacgga aaagggtttt tcaaaggcaa aacggactac 1140
 gtgaagaagc cagtttcaat ggatgggatg ctaacatttc ttgtggaact cgagaaaaac 1200
 ccgaagggat atcttgtctt tgatccttat ggcggagcca tggacaagat tagtgatcaa 1260
 gctattgctt tccctcatag aaaaggtaac cttttcgcga ttcagtatct agcacagtgg 1320
 aatgaagagg acgattacat gagcgacgtt tacatggagt ggataagagg attttacaat 1380
 acaatgacgc cctttgtttc aagctcgcca aggggagctt atatcaacta cttggatatg 1440
 gatcttggag tgaatatggt cgacgactac ttattgcgaa atgctagtag cagtagtctt 1500
 tcttctcttg ttgatgctgt ggagagagct agagcgtggg gtgagatgta tttcttgcac 1560
 aactatgata ggttggttaa agctaagaca caaattgatc cactaaatgt ttttcgacat 1620
 gaacagagta ttcctcctat gcttgggtta acgcaagagc acaagtatag cagtgaatga 1680

<210> 10
<211> 933
<212> DNA
<213> 菸草屬 (Nicotiana sp.)

```
<400> 10
atggttgtat cagagaaaaa caagatctta ataattggag gcacaggcta cataggaaaa 60
tacttgggtg agacaagtgc aaaatctggg catccaactt tcgctcttat cagagaaaagc 120
acactcaaaa accccgagaa atcaaaactc atcgacacat tcaagagtta tgggggttacg 180
ctactttttt gagatatatc caatcaagag agcttactca aggcaatcaa gcaagttgat 240
gtgggtgattt ccactgtcgg aggacagcaa tttactgata aagtgaacat catcaaagca 300
attaaagaag ctggaaatat caagagattt ctctcttcag aatttggatt tgatgtggat 360
catgctcgtg caattgaacc agctgcatca ctcttcgctc taaaggtaag aatcaggagg 420
atgatatagg cagaaggaaat tccatacaca tatgtaatct gcaattgggt tgcagatttc 480
ttcttgcccc acttgggggca gtttagaggcc aaaacccctc ctagagacaa agttgtcatt 540
tttggcgatg gaaatcccaa agcaatatat gtgaagggaag aagacatagc gacatacact 600
atcgaagcag tagatgatcc acggacattg aataagactc ttcacatgag accacctgcc 660
aatattctat ccttcaacga gatagtgtcc ttgtgggagg acaaaattgg gaagaccttc 720
gagaagttat atctatcaga ggaagatat ctccagattg tacaagaggg acctctgcca 780
ttaaggacta atttggccat atgccattca gtttttggtt atggagattc tgcaaacctt 840
gaggttcagc ctctacaggg tgtcgaagcc actgagctat atccaaaagt gaaatacaca 900
accgtcgacg agttctacaa caaatttgtc tag                                     933
```

<210> 11
<211> 1056
<212> DNA
<213> 菸草屬 (Nicotiana sp.)

```
<400> 11
atgttttagag ctattccttt cactgctaca gtgcatcctt atgcaattac agctccaagg 60
ttgggtggtga aaatgtcagc aatagccacc aagaatacaa gagtggagtc attagagggtg 120
aaaccaccag cacacccaac ttatgattta aaggaggtta tgaaacttgc actctctgaa 180
gatgctggga atttaggaga tgtgacttgt aaggcgacaa ttctcttga tatggaatcc 240
gatgctcatt ttctagcaaa ggaagacggg atcatagcag gaattgcact tgctgagatg 300
atattcgagg aagtgtatcc ttcatataag gtggagtggg atgtaaatga tggcgataaa 360
gttcataaag gcttgaaatt tggcaaaag caaggaaacg cttacaacat tgttatagct 420
gagagggttg ttctcaattt tatgcaaaag atgagtggaa tagctacact aactaaggaa 480
atggcagatg ctgcacaccc tgcctacatc ttggagacta ggaaaactgc tcttggatta 540
cgtttgggtg ataaatgggc ggtattgatc ggtgggggga agaatacacg aatgggctta 600
tttgatatgg taatgataaa agacaatcac atatctgctg ctggagggtg cggcaaaagc 660
ctaaaatctg tggatcagta tttggagcaa aataaaactc aaataggggt tgagggttga 720
accaggacaa ttgaagaagt acgtgaggtt ctgactatg catctcaaac aaagacttcg 780
ttgactagga taatgctgga caatatggtt gtteccattat ctaacggaga tattgatgta 840
tccatgctta aggaggctgt agaattgatc aatgggagggt ttgatacgga ggcttcagga 900
aatgttaccc ttgaaacagt acacaagatt ggacaaactg gtgttaccta catttctagt 960
ggtgccctga cgcattccgt gaaagcactt gacatttccc tgaagatcga tacagagctc 1020
gcccttgaag atggaaggcg tacaacacga gcatga                                     1056
```

<210> 12
<211> 1128
<212> DNA
<213> 菸草屬 (Nicotiana sp.)

```
<400> 12
atggaagtca tatctaccaa cacaaatggc tctaccatct tcaagaatgg tgccattccc 60
atgaacggcc accaaaaatgg cacttctgaa cacctcaacg gctaccagaa tggcacttcc 120
```

```

aaacacccaaa acgggcacca gaatggcact ttcgaacatc ggaacggcca ccagaatggg 180
acatccgaac aacagaacgg gacaatcagc catgacaatg gcaacgagct actgggaagc 240
tccgactcta ttaagcctgg ctgggttttca gagtttagcg cattatggcc aggtgaagca 300
ttctcactta aggttgagaa gtactatctt caggggaagt ctgattacca agatgtcatg 360
ctctttgagt cagcaactta tgggaagggt ctgacttttg atggagcaat tcaacataca 420
gagaatgggt gatttcata cactgaaatg attgttcac taccacttgg ttccatccca 480
aacccaaaaa aggttttgat catcggcgga ggaattgggt ttacattatt cgaaatgctt 540
cgttatecct caatcgaaaa aattgacatt gttgagatcg atgacgtggt agttgatgta 600
tccagaaaaa ttttccctta tctggcagct aatttttaacg atcctcgtgt aaccctagtt 660
ctcggagatg gagctgcatt tgtaaaaggc gcacaagcgg gatattatga tgctattata 720
gtggactctt ctgatcccat tgggccagca aaagatttgt ttgagaggcc attctttgag 780
gcagtagcca aagcccttag gccaggagga gttgtatgca cacaggctga aagcatttgg 840
cttcatatgc atattattaa gcaaatcatt gctaactgtc gtcaagtctt taagggttct 900
gtcaactatg cttggacaac cgctccaaca tatcccaccg gtgtgatcgg ttatatgtct 960
tgctctactg aagggccaga agttgacttc aagaatccag taaatccaat tgacaaagag 1020
acaactcaag tcaagtccaa attaggacct ctcaagttct acaactctga tattcacaaa 1080
gcagcattca ttttaccatc tttcgccaga agtatgatcg agtcttaa 1128

```

<210> 13

<211> 538

<212> 蛋白質

<213> 加州罂粟花(*Eschscholzia californica*)

<400> 13

```

Met Glu Asn Lys Thr Pro Ile Phe Phe Ser Leu Ser Ile Phe Leu Ser
  1                      5                      10                      15

Leu Leu Asn Cys Ala Leu Gly Gly Asn Asp Leu Leu Ser Cys Leu Thr
                20                      25                      30

Phe Asn Gly Val Arg Asn His Thr Val Phe Ser Ala Asp Ser Asp Ser
  35                      40                      45

Asp Phe Asn Arg Phe Leu His Leu Ser Ile Gln Asn Pro Leu Phe Gln
  50                      55                      60

Asn Ser Leu Ile Ser Lys Pro Ser Ala Ile Ile Leu Pro Gly Ser Lys
  65                      70                      75                      80

Glu Glu Leu Ser Asn Thr Ile Arg Cys Ile Arg Lys Gly Ser Trp Thr
                85                      90                      95

Ile Arg Leu Arg Ser Gly Gly His Ser Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Thr
  100                      105                      110

Ser Asp Thr Pro Phe Ile Leu Ile Asp Leu Met Asn Leu Asn Arg Val
  115                      120                      125

Ser Ile Asp Leu Glu Ser Glu Thr Ala Trp Val Glu Ser Gly Ser Thr
  130                      135                      140

Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Thr Glu Ser Ser Ser Lys Leu Gly
  145                      150                      155                      160

Phe Thr Ala Gly Trp Cys Pro Thr Val Gly Thr Gly Gly His Ile Ser
                165                      170                      175

```

Gly Gly Gly Phe Gly Met Met Ser Arg Lys Tyr Gly Leu Ala Ala Asp
 180 185 190
 Asn Val Val Asp Ala Ile Leu Ile Asp Ala Asn Gly Ala Ile Leu Asp
 195 200 205
 Arg Gln Ala Met Gly Glu Asp Val Phe Trp Ala Ile Arg Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Val Trp Gly Ala Ile Tyr Ala Trp Lys Ile Lys Leu Leu Pro
 225 230 235 240
 Val Pro Glu Lys Val Thr Val Phe Arg Val Thr Lys Asn Val Ala Ile
 245 250 255
 Asp Glu Ala Thr Ser Leu Leu His Lys Trp Gln Phe Val Ala Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Glu Asp Phe Thr Leu Ser Val Leu Gly Gly Ala Asp Glu Lys
 275 280 285
 Gln Val Trp Leu Thr Met Leu Gly Phe His Phe Gly Leu Lys Thr Val
 290 295 300
 Ala Lys Ser Thr Phe Asp Leu Leu Phe Pro Glu Leu Gly Leu Val Glu
 305 310 315 320
 Glu Asp Tyr Leu Glu Met Ser Trp Gly Glu Ser Phe Ala Tyr Leu Ala
 325 330 335
 Gly Leu Glu Thr Val Ser Gln Leu Asn Asn Arg Phe Leu Lys Phe Asp
 340 345 350
 Glu Arg Ala Phe Lys Thr Lys Val Asp Leu Thr Lys Glu Pro Leu Pro
 355 360 365
 Ser Lys Ala Phe Tyr Gly Leu Leu Glu Arg Leu Ser Lys Glu Pro Asn
 370 375 380
 Gly Phe Ile Ala Leu Asn Gly Phe Gly Gly Gln Met Ser Lys Ile Ser
 385 390 395 400
 Ser Asp Phe Thr Pro Phe Pro His Arg Ser Gly Thr Arg Leu Met Val
 405 410 415
 Glu Tyr Ile Val Ala Trp Asn Gln Ser Glu Gln Lys Lys Lys Thr Glu
 420 425 430
 Phe Leu Asp Trp Leu Glu Lys Val Tyr Glu Phe Met Lys Pro Phe Val
 435 440 445
 Ser Lys Asn Pro Arg Leu Gly Tyr Val Asn His Ile Asp Leu Asp Leu
 450 455 460
 Gly Gly Ile Asp Trp Gly Asn Lys Thr Val Val Asn Asn Ala Ile Glu
 465 470 475 480

Ile Ser Arg Ser Trp Gly Glu Ser Tyr Phe Leu Ser Asn Tyr Glu Arg
485 490 495
Leu Ile Arg Ala Lys Thr Leu Ile Asp Pro Asn Asn Val Phe Asn His
500 505 510
Pro Gln Ser Ile Pro Pro Met Ala Asn Phe Asp Tyr Leu Glu Lys Thr
515 520 525
Leu Gly Ser Asp Gly Gly Glu Val Val Ile
530 535

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之说明：合成引子

<400> 14
ggaaaactaa caacggaatc tct 23

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之说明：合成引子

<400> 15
gatcaagcta ttgctttccc t 21

<210> 16
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之说明：合成引子

<400> 16
aaaaagcagg ctcaccatgt ttccgctcat aattctg 37

<210> 17
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220> <223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 17 agaaagctgg gttcattcac tgctatactt gtgc	
	34
<210> 18 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 18 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct	
	29
<210> 19 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 19 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt	
	29
<210> 20 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 20 aaagcttgga aacatattca atacattgta g	
	31
<210> 21 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 21 tctagattct actactattt tataagtg	
	28

<210> 22
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列之說明：合成引子

 <400> 22
 aaaaagcagg cttcgaagga gatagaacca tgggtgtatc agagaaaagc a 51

 <210> 23
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列之說明：合成引子

 <400> 23
 agaaagctgg gtcctagaca aatttggtgt agaactcgtc g 41

 <210> 24
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列之說明：合成引子

 <400> 24
 aaaagcttag atctctctta tgtttcatg 29

 <210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列之說明：合成引子

 <400> 25
 tctagattta ctcttagggg aagaaaaaaa gtagc 35

 <210> 26
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>	
<223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 26	
aaaaagcagg ctcaaaaatg gaagtcatat c	31
<210> 27	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 27	
agaaagctgg gtttaagact cgatcatact tc	32
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 28	
caccatgttt agagctattc c	21
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之說明：合成引子	
<400> 29	
tcatgctcgt tttgtacgcc	20
<210> 30	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之說明：合成引子	



<400> 30 acccttcttc tatataagga ag	22
<210> 31 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之说明：合成引子	
<400> 31 tgagcccaag ctgtttcaga atcc	24
<210> 32 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之说明：合成引子	
<400> 32 acccttcttc tatataagga ag	22
<210> 33 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之说明：合成引子	
<400> 33 cgctaaactc tgaaaaccag c	21

I657141

發明摘要

※ 申請案號：102137008(由096116136分割)

※ 申請日：096/05/07

※IPC 分類：C12N 15/05 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

【發明名稱】

菸鹼性生物鹼含量的增加

INCREASING LEVELS OF NICOTINIC ALKALOIDS

【中文】

可調整四種基因，*A622*、*NBB1*、*PMT*及*QPT*，以增加菸草 (*Nicotiana*)植物中之菸鹼性生物鹼含量，以及在不產生菸鹼之植物及細胞中合成菸鹼性生物鹼。詳言之，使*A622*、*NBB1*、*PMT*及*QPT*中之一或多者過度表現可用來增加煙草植物中之菸鹼及菸鹼性生物鹼含量。不產生菸鹼之細胞可經遺傳工程處理以藉由過度表現*A622*及*NBB1*來產生菸鹼及相關化合物。

【英文】

Four genes, *A622*, *NBB1*, *PMT*, and *QPT*, can be influenced for increasing nicotinic alkaloid levels in *Nicotiana* plants, as well as for synthesizing nicotinic alkaloids in non-nicotine producing plants and cells. In particular, overexpressing one or more of *A622*, *NBB1*, *PMT*, and *QPT* may be used to increase nicotine and nicotinic alkaloid levels in tobacco plants. Non-nicotine producing cells can be engineered to produce nicotine and related compounds by overexpressing *A622* and *NBB1*.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 6 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種產生多肽之方法，該多肽包含SEQ ID NO: 2者所述之胺基酸序列，該方法包含以編碼包含SEQ ID NO: 2者所述之胺基酸序列之多肽之經分離核酸分子使不產生菸鹼之細胞轉型及在使該多肽得以產生之條件下培養該經轉型之細胞。
2. 如請求項1之方法，其中該經轉型之不產生菸鹼之細胞係選自由細菌、酵母、絲狀真菌細胞、海藻細胞、綠色植物細胞、昆蟲細胞及哺乳動物細胞組成之群。
3. 如請求項2之方法，其中該酵母細胞為釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或甲醇酵母(*Pichia pastoris*)細胞。
4. 如請求項2之方法，其中該絲狀真菌細胞為麴黴(*Aspergillus*)或木黴(*Trichoderma*)細胞。
5. 如請求項2之方法，其中該細菌細胞為大腸桿菌細胞。
6. 如請求項2之方法，其中該哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢細胞細胞(CHO)、已受精卵母細胞或胚胎幹細胞。
7. 如請求項2之方法，其中該海藻細胞為萊茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)細胞。
8. 一種自顛茄屬(*Atropa*)細胞或芥菜屬(*Arabidopsis*)細胞產生菸鹼之方法，其包含：
 - (a) 以構築體使該顛茄屬或芥菜屬細胞轉型，該構築體在5'至3'方向上包含啟動子，該啟動子經操作與選自由下列所組成之群之異源性核酸連結：
 - (i) SEQ ID NO: 1所述之核苷酸序列；及
 - (ii) 編碼具有SEQ ID NO: 2所述之胺基酸序列之核苷酸序列；

- (b) 將該經轉型之細胞再生成基因轉殖生物；及
 - (c) 選擇產生菸鹼的基因轉殖生物。
9. 如請求項8之方法，其中該基因轉殖生物經進一步轉型來表現至少一個A622、腐胺甲基轉移酶(PMT)及喹啉酸磷酸核糖基轉移酶(QPT)。
 10. 如請求項8或9之方法，其中該細胞為顛茄細胞。
 11. 如請求項8或9之方法，其中該細胞為擬南芥細胞。