

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4935359号
(P4935359)

(45) 発行日 平成24年5月23日 (2012. 5. 23)

(24) 登録日 平成24年3月2日 (2012. 3. 2)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 19/26 (2006. 01)

C 1 2 P 19/26

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00 1 O 3

A O 1 H 1/00 (2006. 01)

A O 1 H 1/00 A

C O 8 B 37/08 (2006. 01)

C O 8 B 37/08 Z

請求項の数 36 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2006-543308 (P2006-543308)
 (86) (22) 出願日 平成18年8月10日 (2006. 8. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/315817
 (87) 国際公開番号 W02007/023682
 (87) 国際公開日 平成19年3月1日 (2007. 3. 1)
 審査請求日 平成19年11月1日 (2007. 11. 1)
 (31) 優先権主張番号 特願2005-244192 (P2005-244192)
 (32) 優先日 平成17年8月25日 (2005. 8. 25)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-43724 (P2006-43724)
 (32) 優先日 平成18年2月21日 (2006. 2. 21)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000003160
 東洋紡績株式会社
 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 北澤 宏明
 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋
 紡績株式会社内
 (72) 発明者 柴谷 滋郎
 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋
 紡績株式会社内
 (72) 発明者 曾我部 敦
 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋
 紡績株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸生産植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と外因性の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質とを植物細胞又は植物体において同時に発現させることによりヒアルロン酸を得ること、並びに

該糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、グルタミン：フルクトースー6ーリン酸アミドトランスフェラーゼ及びUDPーグルコースデヒドロゲナーゼであること、を特徴とするヒアルロン酸の製造方法。

【請求項2】

(1) 植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞又は植物体を形質転換する工程、(2) 形質転換して得られた形質転換体を生育する工程、(3) 該形質転換体により生産されたヒアルロン酸を分離する工程を含むこと、並びに

該糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、グルタミン：フルクトースー6ーリン酸アミドトランスフェラーゼ及びUDPーグルコースデヒドロゲナーゼであること、を特徴とするヒアルロン酸の製造方法。

【請求項3】

プロモーターが器官特異的又は組織特異的プロモーターであることを特徴とする請求項2記載のヒアルロン酸の製造方法。

10

20

【請求項 4】

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の（a）または（b）のDNAであることを特徴とする請求項 2 または 3 に記載のヒアルロン酸の製造方法。

（a）配列番号 1 または 3 で示される塩基配列からなるDNA

（b）（a）の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 5】

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の（a）又は（b）のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のヒアルロン酸の製造方法。

（a）配列番号 2 または 4 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

（b）アミノ酸配列（a）において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質

【請求項 6】

糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAがクロレラウイルス由来および/またはシロイヌナズナ由来のDNAである請求項 2 ～ 5 のいずれかに記載のヒアルロン酸の製造方法。

【請求項 7】

グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードするDNAが、以下の（a）または（b）のDNAであることを特徴とする請求項 2 ～ 6 のいずれかに記載のヒアルロン酸の製造方法。

（a）配列番号 5、7 または 9 で示される塩基配列からなるDNA

（b）（a）の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 8】

グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼが、以下の（a）又は（b）のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のヒアルロン酸の製造方法。

（a）配列番号 6、8 または 10 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

（b）アミノ酸配列（a）において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 9】

UDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、以下の（a）または（b）のDNAであることを特徴とする請求項 2 ～ 6 のいずれかに記載のヒアルロン酸の製造方法。

（a）配列番号 11、13、15、17、19、または 21 で示される塩基配列からなるDNA

（b）（a）の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 10】

UDP-グルコースデヒドロゲナーゼが、以下の（a）又は（b）のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のヒアルロン酸の製造方法。

（a）配列番号 12、14、16、18、20 または 22 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

（b）アミノ酸配列（a）において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

植物が、被子植物、裸子植物、シダ植物及びコケ植物からなる群から選ばれるいずれかの植物である、請求項 1～10 のいずれかに記載のヒアルロン酸の製造方法。

【請求項 1 2】

器官が、根、茎、塊茎、葉、花器、塊根、種子及び茎頂からなる群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の器官である、請求項 3 に記載のヒアルロン酸の製造方法。

【請求項 1 3】

組織が、表皮、師部、柔組織、木部及び維管束からなる群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の組織である、請求項 3 に記載のヒアルロン酸の製造方法。

【請求項 1 4】

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と外因性のグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ及びUDP-グルコースデヒドロゲナーゼとを同時に発現させ、ヒアルロン酸生産能を獲得させた形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と外因性のグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ及びUDP-グルコースデヒドロゲナーゼとを有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

【請求項 1 5】

植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードするDNA、及びUDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードするDNAを含む発現用組換えベクターを用いて形質転換されたヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードするDNA、及びUDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードするDNAを有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

【請求項 1 6】

プロモーターが器官特異的又は組織特異的プロモーターであることを特徴とする請求項 15 記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

【請求項 1 7】

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の (a) または (b) のDNAであることを特徴とする請求項 15 または 16 に記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

(a) 配列番号 1 または 3 で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a) の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 1 8】

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 14～16 のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

(a) 配列番号 2 または 4 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質

【請求項 1 9】

グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードするDNA及びUDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードするDNAがクロレラウイルス由来および/またはシロイヌナズナ由来のDNAである請求項 15～18 のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

【請求項 2 0】

グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードするDNAが、以下の（a）または（b）のDNAであることを特徴とする請求項15～19のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

（a）配列番号5、7または9で示される塩基配列からなるDNA

（b）（a）の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項21】

グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼが、以下の（a）又は（b）のタンパク質であることを特徴とする請求項14～19のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

（a）配列番号6、8または10で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

【請求項22】

UDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、以下の（a）または（b）のDNAであることを特徴とする請求項15～19のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

（a）配列番号11、13、15、17、19、または21で示される塩基配列からなるDNA

（b）（a）の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項23】

UDP-グルコースデヒドロゲナーゼが、以下の（a）又は（b）のタンパク質であることを特徴とする請求項14～19のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

（a）配列番号12、14、16、18、20または22で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項24】

植物が、被子植物、裸子植物、シダ植物及びコケ植物からなる群から選ばれるいずれかの植物である、請求項14～23のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

【請求項25】

器官が、根、茎、塊茎、葉、花器、塊根、種子及び茎頂からなる群から選ばれる1種又は2種以上の器官である、請求項14～23のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

【請求項26】

組織が、表皮、師部、柔組織、木部及び維管束からなる群から選ばれる1種又は2種以上の組織である、請求項14～23のいずれかに記載の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又は子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

【請求項27】

植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA、グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードするDNA及びUDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードするDNAを含む発現用組換

10

20

30

40

50

えベクター。

【請求項 28】

プロモーターが器官特異的又は組織特異的プロモーターであることを特徴とする請求項 27 に記載の発現用組換えベクター。

【請求項 29】

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA が、以下の (a) または (b) の DNA であることを特徴とする請求項 27 または 28 に記載の発現用組換えベクター。

(a) 配列番号 1 または 3 で示される塩基配列からなる DNA

(b) (a) の塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA

10

【請求項 30】

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 27 または 28 に記載の発現用組換えベクター。

(a) 配列番号 2 または 4 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質

【請求項 31】

グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードする DNA 及び UDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードする DNA がクロレラウイルス由来および/またはシロイヌナズナ由来の DNA である請求項 27 ~ 30 のいずれかに記載の発現用組換えベクター。

20

【請求項 32】

グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードする DNA が、以下の (a) または (b) の DNA であることを特徴とする請求項 27 ~ 31 のいずれかに記載の発現用組換えベクター。

(a) 配列番号 5、7 または 9 で示される塩基配列からなる DNA

(b) (a) の塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA

30

【請求項 33】

グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼが、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 27 ~ 31 のいずれかに記載の発現用組換えベクター。

(a) 配列番号 6、8 または 10 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 34】

UDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードする DNA が、以下の (a) または (b) の DNA であることを特徴とする請求項 27 ~ 31 のいずれかに記載の発現用組換えベクター。

40

(a) 配列番号 11、13、15、17、19、または 21 で示される塩基配列からなる DNA

(b) (a) の塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA

【請求項 35】

UDP-グルコースデヒドロゲナーゼが、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする請求項 27 ~ 31 のいずれかに記載の発現用組換えベクター。

50

(a) 配列番号 12、14、16、18、20 または 22 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 36】

請求項 27～35 のいずれかに記載のベクターを用いて、植物細胞又は植物体を形質転換する工程を有する、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物体の作製方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物によりヒアルロン酸を製造する方法、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物およびそれらの作製方法に主に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒアルロン酸は、1934年にMeyerとPalmerが、牛の眼球の硝子体から単離したグリコサミノグリカン（ムコ多糖）である（非特許文献1参照）。高分子のヒアルロン酸は、変形関節症の治療や眼科用手術補助剤、癒着防止や創傷治癒促進効果等に使用されている。また、低分子のヒアルロン酸は生理活性効果があることが報告されている。また、ヒアルロン酸は保水力に優れていることから化粧品用途にも使用されている。そして、バイオマテリアル素材や、新たな医療用途への応用も期待されている。

20

【0003】

これまで、ヒアルロン酸は、動物組織からの抽出（特許文献1）または微生物発酵（特許文献2～5）による製造方法が開発されてきた。しかしながら、動物組織からの抽出は、例えば狂牛病におけるプリオン、ウィルス等の混入の危険性が懸念されている。また、動物細胞は、細胞の維持管理が困難で、高価な培地を必要とする上に増殖速度も遅い。一方、微生物発酵は、糖を含有する培地や設備投資のコストが問題である。また、大腸菌等では、タンパク質のプロセッシングが起こらない、インクルージョンボディ（封入体）を形成する可能性があり、プロテアーゼによる分解が生じる等の問題がある（非特許文献2参照）。また、治療用物質を微生物で生産する場合は、エンドトキシンの混入等を防ぐために精製コストが非常に高くなる。

30

一方、植物は光合成を利用して水と二酸化炭素から糖を合成する、エネルギー負荷の低い理想的な糖質生産系である。特許文献6に記載の発明では、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子を植物体、また植物細胞に導入することによって、ヒアルロン酸が生産可能なことが示されている。

【特許文献1】特開平05-125103号公報

【特許文献2】特開昭58-056692号公報

【特許文献3】特開平06-319579号公報

【特許文献4】特開平06-319580号公報

40

【特許文献5】特開平09-056394号公報

【特許文献6】国際公開第05/012529号パンフレット

【非特許文献1】Meyer, K. and Palmer, J. W. (1934) J. Biol. Chem., 107, 629-634

【非特許文献2】Petrides, D. et al. (1995) Biotechnol. Bioeng., 48, 529

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】精製前後のSDS-PAGE (atUGD)

【図2】精製前後のSDS-PAGE (cvUGD)

【図3】PROTEIOS（登録商標）によるGFATの発現

【図4】Reissig法による GFAT活性測定

50

【図 5】 cvHAS-cvGFAT 遺伝子を導入した形質転換タバコと cvHAS 遺伝子を導入した形質転換タバコのヒアルロン酸生産性

【図 6】 多重遺伝子を導入した形質転換タバコのヒアルロン酸生産性

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、植物においてヒアルロン酸を製造する公知の方法を改良することによって、従来より更に高度にヒアルロン酸を生産可能な植物または植物培養細胞、その作製方法、及び発現用組換えベクターを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

10

【0006】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子および糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子で植物細胞又は植物を形質転換することにより、植物細胞又は植物体においてヒアルロン酸が高度に生産されることを見出し、更に鋭意検討を重ねて、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、次の事項に係るものである。

1. ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と外因性の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質とを植物細胞又は植物体において同時に発現させることによりヒアルロン酸を得ることを特徴とするヒアルロン酸の製造方法

20

2. (1) 植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA と糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA とを含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞又は植物体を形質転換する工程、(2) 形質転換して得られた形質転換体を生育する工程、(3) 該形質転換体により生産されたヒアルロン酸を分離する工程を含むことを特徴とするヒアルロン酸の製造方法。

3. プロモーターが器官特異的又は組織特異的プロモーターであることを特徴とする 2 のヒアルロン酸の製造方法。

4. ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA が、以下の (a) または (b) の DNA であることを特徴とする 2 または 3 のヒアルロン酸の製造方法。

30

(a) 配列番号 1 または 3 で示される塩基配列からなる DNA

(b) (a) の塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA

5. ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の (a) 又は (b) のタンパク質であることを特徴とする 1～3 のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

(a) 配列番号 2 または 4 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質

40

6. 糖ヌクレオチドがウリジン-5'-ジホスホ (UDP) -N-アセチルグルコサミンおよび/または UDP-グルクロン酸であることを特徴とする 1～5 のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

7. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ、UDP-N-アセチルグルコサミンジホスホリラーゼ、ホスホアセチルグルコサミンムターゼ、グルコサミン-6-リン酸

N-アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミン-1-リン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ、ホスホグルコムターゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼ、ヘキソキナーゼ、N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、UDP-グルコース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、イノシトールオキシゲナーゼ、グルクロノキナー

50

ゼ及びグルクロン酸-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた1種以上のタンパク質であることを特徴とする1～6のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

8. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、UDP-N-アセチルグルコサミンジホスホリラーゼ、ホスホアセチルグルコサミンムターゼ、グルコサミン-6-リン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミン-1-リン酸

N-アセチルトランスフェラーゼ、ホスホグルコムターゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼ、ヘキソキナーゼ、N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、UDP-グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ、イノシトールオキシゲナーゼ、グルクロノキナーゼ及びグルクロン酸-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた1種以上のタンパク質、およびグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼであることを特徴とする1～6のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

10

9. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼおよび/またはUDP-グルコースデヒドロゲナーゼである1～6のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

10. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAがクロレラウイルス由来および/またはシロイヌナズナ由来のDNAである2～9のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

11. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAであることを特徴とする2～10のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

20

(a) 配列番号5、7または9で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

12. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする1～10のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

(a) 配列番号6、8または10で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

30

13. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAであることを特徴とする2～10のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

(a) 配列番号11、13、15、17、19、または21で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

14. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする1～10のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

40

(a) 配列番号12、14、16、18、20または22で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

15. 植物が、被子植物、裸子植物、シダ植物及びコケ植物からなる群から選ばれるいずれかの植物である、1～14のいずれかのヒアルロン酸の製造方法。

16. 器官が、根、茎、塊茎、葉、花器、塊根、種子及び茎頂からなる群から選ばれる1種又は2種以上の器官である、3のヒアルロン酸の製造方法。

50

17. 組織が、表皮、師部、柔組織、木部及び維管束からなる群から選ばれる1種又は2種以上の組織である、3のヒアルロン酸の製造方法。

18. ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と外因性の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質とを同時に発現させ、ヒアルロン酸生産能を獲得させた形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

19. 植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含む発現用組換えベクターを用いて形質転換されたヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

10

20. プロモーターが器官特異的又は組織特異的プロモーターであることを特徴とする19の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

21. ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAであることを特徴とする19または20の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

(a) 配列番号1または3で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA

20

22. ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする18~20のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

(a) 配列番号2または4で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質

23. 糖ヌクレオチドがUDP-N-アセチルグルコサミンおよび/またはUDP-グルクロン酸であることを特徴とする18~22のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

30

24. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ、UDP-N-アセチルグルコサミンジホスホリラーゼ、ホスホアセチルグルコサミンムターゼ、グルコサミン-6-リン酸

N-アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミン-1-リン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ、ホスホグルコムターゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼ、ヘキソキナーゼ、N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、UDP-グルコース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、イノシトールオキシゲナーゼ、グルクロノキナーゼ及びグルクロン酸-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた1種以上のタンパク質であることを特徴とする18~23のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

40

25. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、UDP-N-アセチルグルコサミンジホスホリラーゼ、ホスホアセチルグルコサミンムターゼ、グルコサミン-6-リン酸

N-アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミン-1-リン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ、ホスホグルコムターゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼ、ヘキソキナーゼ、N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、UDP-グルコース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、イノシトールオキシゲナーゼ、グルクロノキナーゼ及びグルクロン酸-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた1種以上のタンパク質、およびグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼであることを特徴とする18~23のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

50

26. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼおよび/またはUDP-グルコースデヒドロゲナーゼである18~23のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

27. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAがクロレラウイルス由来および/またはシロイヌナズナ由来のDNAである19~26のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

28. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAであることを特徴とする19~27のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

10

(a) 配列番号5、7または9で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

29. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする18~27のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

(a) 配列番号6、8または10で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

20

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

30. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAであることを特徴とする19~27のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

(a) 配列番号11、13、15、17、19、または21で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

30

31. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする18~27のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

(a) 配列番号12、14、16、18、20または22で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

40

32. 植物が、被子植物、裸子植物、シダ植物及びコケ植物からなる群から選ばれるいずれかの植物である、18~31のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

33. 器官が、根、茎、塊茎、葉、花器、塊根、種子及び茎頂からなる群から選ばれる1種又は2種以上の器官である、18~31のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

34. 組織が、表皮、師部、柔組織、木部及び維管束からなる群から選ばれる1種又は2種以上の組織である、18~31のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

35. 18~34のいずれかの形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質

50

を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織から得られる植物抽出物。

36. 植物抽出物がヒアルロン酸を含むことを特徴とする35の植物抽出物。

37. 植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含む発現用組換えベクター。

38. プロモーターが器官特異的又は組織特異的プロモーターであることを特徴とする37の発現用組換えベクター。

39. ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAであることを特徴とする37または38の発現用組換えベクター。

(a) 配列番号1または3で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA

40. ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする37または38の発現用組換えベクター。

(a) 配列番号2または4で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質

41. 糖ヌクレオチドがUDP-N-アセチルグルコサミンおよび/またはUDP-グルクロン酸である37～40のいずれかの発現用組換えベクター。

42. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ、UDP-N-アセチルグルコサミンジホスホリラーゼ、ホスホアセチルグルコサミンムターゼ、グルコサミン-6-リン酸

N-アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミン-1-リン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ、ホスホグルコムターゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼ、ヘキソキナーゼ、N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、UDP-グルコース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、イノシトールオキシゲナーゼ、グルクロノキナーゼ及びグルクロン酸-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた1種以上のタンパク質であることを特徴とする37～41のいずれかの発現用組換えベクター。

43. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、UDP-N-アセチルグルコサミンジホスホリラーゼ、ホスホアセチルグルコサミンムターゼ、グルコサミン-6-リン酸

N-アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミン-1-リン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ、ホスホグルコムターゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼ、ヘキソキナーゼ、N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、UDP-グルコース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、イノシトールオキシゲナーゼ、グルクロノキナーゼ及びグルクロン酸-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた1種以上のタンパク質、およびグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼであることを特徴とする37～41のいずれかの発現用組換えベクター。

44. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼおよび/またはUDP-グルコースデヒドロゲナーゼである37～41のいずれかの発現用組換えベクター。

45. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAがクロレラウイルス由来および/またはシロイヌナズナ由来のDNAである37～44のいずれかの発現用組換えベクター。

46. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAであることを特徴とする37～45のいずれかの発現用組換えベクター。

(a) 配列番号5、7または9で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェント

10

20

30

40

50

な条件下でハイブリダイズし、かつグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

47. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする37~45のいずれかの発現用組換えベクター。

(a) 配列番号6、8または10で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質

48. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAであることを特徴とする37~45のいずれかの発現用組換えベクター。

(a) 配列番号11、13、15、17、19、または21で示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

49. 糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする37~45のいずれかの発現用組換えベクター。

(a) 配列番号12、14、16、18、20または22で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

50. 37~49のいずれかのベクターを用いて、植物細胞又は植物体を形質転換する工程を有する、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物体の作製方法。

51. 1~17のいずれかのヒアルロン酸の製造方法により得られたヒアルロン酸を有効成分として含有することを特徴とする化粧料組成物。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、本来植物で生産されなかったヒアルロン酸が、植物により生産される。本発明によれば、ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子および糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が植物内で発現され、更に、植物内でヒアルロン酸が高度に生産される。従来より、更に高度にヒアルロン酸を生産可能な植物または植物培養細胞、その作製方法、及び発現用組換えベクターを提供することができる。従って、植物で生産された安全なヒアルロン酸を低コストで提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の要点は、ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と外因性の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質とを植物細胞又は植物体において同時に発現させることによりヒアルロン酸を得ることを特徴とするヒアルロン酸の製造方法である。

【0010】

また、(1)植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞又は植物体を形質転換する工程、(2)形質転換して得られた形質転換体を生育する工程、(3)該形質転換体により生産されたヒアルロン酸を分離する工程を含むことを特徴とするヒアルロン酸の製造方法である。

【0011】

さらに、上記ヒアルロン酸の製造方法により得られたヒアルロン酸を有効成分として含有することを特徴とする化粧料組成物である。

【0012】

また、植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含むヒアルロン酸製造のための発現用組換えベクターである。

【0013】

また、ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と外因性の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質とを同時に発現させ、ヒアルロン酸生産能を獲得させた形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織である。

10

【0014】

また、植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含む発現用組換えベクターを用いて形質転換されたヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織である。

【0015】

また、植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含むヒアルロン酸製造のための発現用組換えベクターを用いて、植物細胞又は植物体を形質転換する工程を有する、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物体の作製方法である。

20

【0016】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0017】

(ヒアルロン酸合成酵素)

本発明においては、植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを用いて、植物細胞又は植物体の形質転換を行う。

30

【0018】

本発明のヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質は、UDP-グルクロン酸とUDP-N-アセチルグルコサミンを基質としてグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの繰り返し構造からなるポリマー構造のヒアルロン酸を合成するものである。

【0019】

本発明のヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質は、上記の性質を有していれば特に限定はされず、動物や、微生物やウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素（以下、HASと略すことがある）等を用いることが可能である。詳しくは、ヒト、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウシ、アフリカツメガエル等の脊椎動物由来のヒアルロン酸合成酵素や、ストレプトコッカス属、パステレラ属等の微生物由来のヒアルロン酸合成酵素や、クロレラウイルス等のウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素等を用いることが可能である。

40

【0020】

より具体的には、クロレラウイルス PBCV-1系統由来のHAS(A98R)、ヒト由来のヒアルロン酸合成酵素 (hHAS) のHAS1、HAS2およびHAS3、マウス由来のヒアルロン酸合成酵素 (mHAS) のHAS1、HAS2およびHAS3、ニワトリ由来のヒアルロン酸合成酵素 (gHAS) のHAS1、HAS2およびHAS3、ラット由来のヒアルロン酸合成酵素 (rHAS) のHAS2、ウシ由来のヒアルロン酸合成酵素 (bHAS) のHAS2、アフリカツメガエル由来のヒアルロン酸合成酵素 (xHAS) のHAS1、HAS2およびHAS3、パステレラ ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素 (pmHAS)、ストレプトコッカス ピオゲネス由来のヒアルロン酸合成酵素 (spHAS)、ストレプトコッカス エクイリシミリス由来のヒアルロン酸合成酵素 (seHAS) 等があげられる。

50

ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) 遺伝子には、HAS1、HAS2、HAS3等の各種タイプを有するものがあるが、タイプの種類は特に限定されない。

【0021】

上記記載のHASであれば使用できるが、好ましくはクロレラウイルス由来のHASがよく、とくに好ましくは、配列番号2または4で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質によって示されるクロレラウイルス由来のHASがよい。

【0022】

また、配列番号2または4で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるヒアルロン酸合成活性を失わない程度の変異がなされたタンパク質であっても良い。例えば、配列番号2または4で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、又は、配列番号2または4で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2または4で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよいが、特にこれに限定されるものではない。このような変異は、自然界において生じるほかに、人為的な変異も含む。一例として、パステウレラムルトシダ由来ヒアルロン酸合成酵素は、膜結合領域および膜貫通領域と推定される約270アミノ酸を欠失してもヒアルロン酸合成酵素活性をもつことが報告されている (Jing et al., 2000, Glycobiology, 10, 883-889)。変異したアミノ酸の数は、ヒアルロン酸合成活性を失わない限り、その個数は制限されない。また、配列番号2または4で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の一部であって、且つヒアルロン酸合成活性を有しているタンパク質であっても良い。

【0023】

ヒアルロン酸合成活性の測定は、次のように実施すればよい。試料と、1mMジチオスレイトール、20mM塩化マグネシウム、1mMエチレンジグリコールビス (β-アミノエチルエーテル) -N,N,N,N-テトラ酢酸、15%グリセロール、0.5mMウリジン-5'-ジホスホグルクロン酸 (以下、UDP-GlcAと略する)、0.5mMウリジン-5'-ジホスホ-N-アセチルグルコサミン (以下、UDP-GlcNAcと略する)、0.1μM UDP- [14C] GlcA、0.24μM UDP- [3H] GlcNAc、グルクロン酸125μgを含む50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.0) 0.2mlを37℃で1時間インキュベーションすることにより反応させる。反応後、反応液を10分間煮沸させることにより反応を停止させる。反応液を二分して、片方に0.5単位のスเตรプトコッカス ジスガラクティアエ (Streptococcus dysgalactiae) 由来ヒアルロニダーゼ (生化学工業社製) を添加し、30℃で4時間さらにインキュベーションする。10分間煮沸させることによりヒアルロニダーゼを失活させる。反応液をSuperdex Peptide HR10/30 (アマシャムファルマシア社製) カラムクロマトグラフィー (溶出液: 0.2M酢酸アンモニウム) で、0.5mlずつ分画し、各画分の放射活性を測定する。その結果、試料を用いた反応液から、ヒアルロニダーゼで低分子化される産物の量によりヒアルロン酸合成活性を測定すればよい。また、生成物であるヒアルロン酸をヒアルロン酸結合性タンパク質を用いたサンドイッチ法により測定する方法によってもヒアルロン酸合成酵素活性の測定が可能である。

【0024】

本発明のヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとは、UDP-グルクロン酸とUDP-N-アセチルグルコサミンを基質としてグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの繰り返し構造からなるポリマー構造のヒアルロン酸を合成する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

【0025】

本発明のヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAは、上記の性質を有していれば特に限定はされず、動物や、微生物やウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素 (以下、HASと略することがある) 遺伝子等を用いることが可能である。詳しくは、ヒト、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウシ、アフリカツメガエル等の脊椎動物由来のヒアルロン

10

20

30

40

50

酸合成酵素遺伝子や、ストレプトコッカス属、パステレラ属等の微生物由来のヒアルロン酸合成酵素遺伝子や、クロレラウイルス等のウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素遺伝子等を用いることが可能である。

【0026】

より具体的には、クロレラウイルス PBCV-1系統由来のHAS(A98R)遺伝子、ヒト由来のヒアルロン酸合成酵素 (hHAS) 遺伝子のHAS1、HAS2およびHAS3、マウス由来のヒアルロン酸合成酵素 (mHAS) 遺伝子のHAS1、HAS2およびHAS3、ニワトリ由来のヒアルロン酸合成酵素 (gHAS) 遺伝子のHAS1、HAS2およびHAS3、ラット由来のヒアルロン酸合成酵素 (rHAS) 遺伝子のHAS2、ウシ由来のヒアルロン酸合成酵素 (bHAS) 遺伝子のHAS2、アフリカツメガエル由来のヒアルロン酸合成酵素 (xHAS) 遺伝子のHAS1、HAS2およびHAS3、パステレラ
10
ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素 (pmHAS) 遺伝子、ストレプトコッカス ピオゲネス由来のヒアルロン酸合成酵素 (spHAS) 遺伝子、ストレプトコッカス エクイリス由来のヒアルロン酸合成酵素 (seHAS) 遺伝子等があげられる。ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) 遺伝子には、HAS1、HAS2、HAS3等の各種タイプを有するものがあるが、タイプの種類は特に限定されない。

【0027】

上記記載のHASであれば使用できるが、好ましくはクロレラウイルス由来のHAS遺伝子がよく、とくに好ましくは、配列番号1または3で示される塩基配列からなるDNAによって示されるクロレラウイルス由来のHAS遺伝子がよい。

【0028】

また、配列番号1または3で示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

【0029】

上記において、「ストリンジェントな条件」とは、配列番号1または3で示される塩基配列のヒアルロン酸合成酵素と同等のヒアルロン酸合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列のみが該特定配列とハイブリット (いわゆる特異的ハイブリット) を形成し、同等の活性を有しないポリペプチドをコードする塩基配列は該特定配列とハイブリット (いわゆる非特異的ハイブリット) を形成しない条件を意味する。当業者は、ハイブリダイゼーション反応および洗浄時の温度や、ハイブリダイゼーション反応液および洗浄液の塩濃度等を変化させることによって、このような条件を容易に選択することができる。具体的には、6×SSC(0.9M

NaCl, 0.09M クエン酸三ナトリウム) または6×SSPE (3M NaCl, 0.2M NaH_2PO_4 , 20mM EDTA・2Na, pH7.4) 中42℃でハイブリダイズさせ、さらに42℃で0.5×SSCにより洗浄する条件が、本発明のストリンジェントな条件の一例として挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0030】

該ストリンジェントな条件は、好ましくはハイストリンジェントな条件である。ハイストリンジェントな条件とは、A98Rをコードする遺伝子がハイブリダイズしない条件であれば特に限定されないが、例えば0.1×SSC及び0.1%
40
SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である。

【0031】

(糖ヌクレオチド)

糖ヌクレオチドとしては、UDP-N-アセチルグルコサミン、UDP-グルクロン酸、UDP-N-アセチルガラクトサミン、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、UDP-キシロース、GDP-フコース、GDP-マンノース、CMP-ノイラミン酸、等が例示されるが、これに限定されるものではない。これらの糖ヌクレオチドでUDP糖が好ましい。さらに好ましくは、これらのUDP糖の中でも、UDP-N-アセチルグルコサミン、UDP-グルクロン酸がよい。

【0032】

植物細胞又は植物体でこれらの糖ヌクレオチドの生産性を向上させることにより、ヒアル
50

ロン酸合成酵素の基質となるUDP-グルクロン酸とUDP-N-アセチルグルコサミンの量が増える。これらの、糖ヌクレオチドの生産性を向上させるためには、糖ヌクレオチド合成経路に関与する酵素、すなわち、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質を、植物細胞又は植物体に導入すればよい。

【0033】

さらに、本発明では、同時にヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質を植物細胞又は植物体に導入することにより、増加したUDP-グルクロン酸とUDP-N-アセチルグルコサミンを基質としてグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの繰り返し構造からなるポリマー構造のヒアルロン酸を従来よりも大量に合成できることを見いだした。

【0034】

(糖ヌクレオチド合成経路に関与する酵素)

本発明においては、植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを用いて、植物細胞又は植物体の形質転換を行う。

【0035】

糖ヌクレオチドとして、UDP-N-アセチルグルコサミン、UDP-グルクロン酸、UDP-N-アセチルガラクトサミン、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、UDP-キシロース、GDP-フコース、GDP-マンノース、CMP-ノイラミン酸等の合成酵素活性を有するタンパク質であればよい。これらの糖ヌクレオチドでUDP-N-アセチルグルコサミン、UDP-グルクロン酸、UDP-N-アセチルガラクトサミン、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、UDP-キシロースの合成酵素活性を有するタンパク質が好ましい。さらに好ましくは、UDP-N-アセチルグルコサミン、UDP-グルクロン酸の合成酵素活性を有するタンパク質がよい。

【0036】

本発明の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質は、糖ヌクレオチド合成代謝経路に関与する反応を触媒する酵素であればよい。たとえば、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ、UDP-N-アセチルグルコサミンジホスホリラーゼ、ホスホアセチルグルコサミンムターゼ、グルコサミン-6-リン酸

N-アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミン-1-リン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ、ホスホグルコムターゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼ、ヘキソキナーゼ、N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、UDP-グルコース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、イノシトールオキシゲナーゼ、グルクロノキナーゼ及びグルクロン酸-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ等が例示される。これらの糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質からなる群より選ばれた1種以上のタンパク質を、植物細胞又は植物体にて発現させればよい。

【0037】

また、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質として、少なくとも、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼを選択して、他の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質と組み合わせて植物細胞又は植物体にて発現させてもよい。グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ以外の他の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質は、UDP-N-アセチルグルコサミンジホスホリラーゼ、ホスホアセチルグルコサミンムターゼ、グルコサミン-6-リン酸

N-アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミン-1-リン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ、ホスホグルコムターゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼ、ヘキソキナーゼ、N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ、UDP-グルコース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、イノシトールオキシゲナーゼ、グルクロノキナーゼ及びグルクロン酸-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた1種以上のタンパク質等が例示される。

【0038】

本発明の効果を発揮するためには、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質として、少なくとも、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼを選択す

10

20

30

40

50

れば従来よりも優れた効果を得ることができる。より好ましくは、グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ（以下GFATと略すことがある）とUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ（以下UGDと略すことがある）の両者を選択するのがよい。また、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ単独でも、従来よりも優れた効果を示す。

【0039】

（グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ）

本発明のグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質は、L-グルタミンとフルクトース-6-リン酸を基質として、グルコサミン-6-リン酸を合成するものであればよい。

【0040】

本発明のグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質は上記の性質を有していれば特に限定はされず、真核生物由来、原核生物由来、ウイルス由来等のGFATがあげられる。真核生物由来としてはヒト、マウス、トウモロコシ、シロイヌナズナ、線虫や酵母由来等のGFAT、原核生物由来としては枯草菌や大腸菌由来等のGFAT、ウイルス由来としてはクロレラウイルスのGFATを用いることができるが、これに限定されるものではない。

【0041】

上記記載のGFATであれば好ましく使用できるが、より好ましくはクロレラウイルス由来またはシロイヌナズナ由来のGFATがよい。とくに好ましくは、配列番号6または8で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質によって示されるクロレラウイルス由来のGFATや配列番号10で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質によって示されるシロイヌナズナ由来のGFATがよい。

【0042】

また、配列番号6、8または10で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を失わない程度の変異がなされたタンパク質であっても良い。例えば、配列番号6、8または10で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、又は、配列番号6、8または10で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号6、8または10で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよいが、特にこれに限定されるものではない。このような変異は、自然界において生じるほかに、人為的な変異も含む。変異したアミノ酸の数は、GFAT活性を失わない限り、その個数は特に制限されない。天然の変異例として、配列番号5のクロレラウイルス弘前系統のGFATと、公知のクロレラウイルスPBCV-1系統、K2系統のGFATとは、少なくともアミノ酸レベルで2%が変異している例がある。また、配列番号6、8または10で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の一部であって、且つグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有しているタンパク質であっても良い。

【0043】

グルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼの活性は、フルクトース-6-リン酸(15mM)、L-グルタミン(15mM)、EDTA(1mM)、DTT(1mM)、KH₂PO₄(60mM)を含む溶液(pH7.0)に酵素液を添加して、37℃で数時間反応させ、生成物であるグルコサミン-6-リン酸またはグルタミン酸の量を測定することにより評価できる。具体的には、グルコサミン-6-リン酸を測定する方法としては

Morgan&Elson法の改良法であるReissig法(J.Biol.Chem,1955,217(2),959-66)、グルタミン酸を測定する方法としてはグルタミン酸脱水素酵素を利用した酵素法(J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(3), 201-8)などが例示される。

【0044】

本発明のグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタン

10

20

30

40

50

パク質をコードするDNAは、L-グルタミンとフルクトース-6-リン酸を基質として、グルコサミン-6-リン酸を合成する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

【0045】

本発明のグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAは上記の性質を有していれば特に限定はされず、真核生物由来、原核生物由来、ウイルス由来等のGFAT遺伝子があげられる。真核生物由来としてはヒト、マウス、トウモロコシ、シロイヌナズナ、線虫や酵母由来等のGFAT遺伝子、原核生物由来としては枯草菌や大腸菌由来等のGFAT遺伝子、ウイルス由来としてはクロレラウイルスのGFAT遺伝子を用いることができる。GFAT遺伝子には、GFAT1、GFAT2等の各種タイプを有するものがあるが、種類は特に限定されない。

10

【0046】

上記記載のGFAT遺伝子であれば好ましく使用できるが、より好ましくはクロレラウイルス由来またはシロイヌナズナ由来のGFAT遺伝子がよく、とくに好ましくは、配列番号5、7で示される塩基配列からなるクロレラウイルス由来GFAT遺伝子、または配列番号9で示される塩基配列からなるシロイヌナズナ由来GFAT遺伝子が好ましい。

【0047】

また、配列番号5、7または9で示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつGFAT活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

【0048】

上記において、「ストリンジェントな条件」とは、配列番号5、7または9で示される塩基配列のグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼと同等のグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列のみが該特定配列とハイブリット（いわゆる特異的ハイブリット）を形成し、同等の活性を有しないポリペプチドをコードする塩基配列は該特定配列とハイブリット（いわゆる非特異的ハイブリット）を形成しない条件を意味する。当業者は、ハイブリダイゼーション反応および洗浄時の温度や、ハイブリダイゼーション反応液および洗浄液の塩濃度等を変化させることによって、このような条件を容易に選択することができる。具体的には、6×SSC(0.9M

20

NaCl, 0.09M クエン酸三ナトリウム) または6×SSPE (3M NaCl, 0.2M NaH_2PO_4 , 20mM EDTA・2Na, pH7.4) 中42℃でハイブリダイズさせ、さらに42℃で0.5×SSCにより洗浄する条件が、本発明のストリンジェントな条件の1例として挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

【0049】

該ストリンジェントな条件は、好ましくはハイストリンジェントな条件である。ハイストリンジェントな条件とは、例えば0.1×SSC及び0.1% SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である。

【0050】

(UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ)

本発明のUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質は、UDP-グルコースを基質として、UDP-グルクロン酸を合成するものであればよい。

40

【0051】

本発明のUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質は上記の性質を有していれば特に限定はされず、真核生物由来、原核生物由来、ウイルス由来等のUGDがあげられる。真核生物由来としてはヒト、ウシ、マウス、ポプラ、サトウキビやシロイヌナズナ由来等のUGD、原核生物由来としては大腸菌、パストレラ・ムルトシダや乳酸菌由来等のUGD、ウイルス由来としてはクロレラウイルス由来等のUGDを用いることができるが、これに限定されるものではない。

【0052】

上記記載のUGDであれば好ましく使用できるが、より好ましくはクロレラウイルス由来ま

50

たはシロイヌナズナ由来のUGDがよい。とくに好ましくは、配列番号12, 14で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質によって示されるクロレラウイルス由来のUGDや配列番号16, 18, 20, 22で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質によって示されるクロレラウイルス由来のUGDがよい。

【0053】

また、配列番号12, 14, 16, 18, 20、または22で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を失わない程度の変異がなされたタンパク質であっても良い。例えば、配列番号12, 14, 16, 18, 20、または22で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失してもよく、又は、配列番号12, 14, 16, 18, 20、または22で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号12, 14, 16, 18, 20、または22で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよいが、特にこれに限定されるものではない。このような変異は、自然界において生じるほかに、人為的な変異も含む。変異したアミノ酸の数は、UGD活性を失わない限り、その個数は特に制限されない。また、配列番号12, 14, 16, 18, 20、または22で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の一部であって、且つUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有しているタンパク質であっても良い。

【0054】

UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性の測定方法は、UDP-グルコース (4mM)、NAD⁺ (1mM)、EDTA (1mM)、Tris-HCl (20mM) を含む溶液 (pH8.0) に酵素液を添加し、37℃で反応を行い、生成物であるUDP-グルクロン酸またはNADHを測定することにより評価できる。具体的には、NADHの測定法はTenhaken and Thulkeの報告 (Plant Physiol. 1996, 112:1127-34) に従い、Abs340の増加を測ることで実施できる。

【0055】

本発明のUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAは、UDP-グルコースを基質として、UDP-グルクロン酸を合成する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

【0056】

本発明のUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAは上記の性質を有していれば特に限定はされず、真核生物由来、原核生物由来、ウイルス由来等のUGD遺伝子があげられる。真核生物由来としてはヒト、ウシ、マウス、ポプラ、サトウキビやシロイヌナズナ由来等のUGD遺伝子、原核生物由来としては大腸菌、パストレラ・ムルトシダや乳酸菌由来等のUGD遺伝子、ウイルス由来としてはクロレラウイルス由来等のUGD遺伝子を用いることができるが、これに限定されるものではない。

【0057】

上記記載のUGD遺伝子であれば好ましく使用できるが、より好ましくはクロレラウイルス由来またはシロイヌナズナ由来のUGD遺伝子がよく、とくに好ましくは、配列番号配列番号11または13で示される塩基配列からなるクロレラウイルス由来UGD遺伝子、または配列番号15, 17, 19, 21で示される塩基配列からなるシロイヌナズナである。

【0058】

また、配列番号11, 13, 15, 17, 19、または21で示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

【0059】

上記において、「ストリンジェントな条件」とは配列番号11, 13, 15, 17, 19

、または21で示される塩基配列のUDP-グルコースデヒドロゲナーゼと同等のUDP-グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列のみが該特定配列とハイブリット（いわゆる特異的ハイブリット）を形成し、同等の活性を有しないポリペプチドをコードする塩基配列は該特定配列とハイブリット（いわゆる非特異的ハイブリット）を形成しない条件を意味する。当業者は、ハイブリダイゼーション反応および洗浄時の温度や、ハイブリダイゼーション反応液および洗浄液の塩濃度等を変化させることによって、このような条件を容易に選択することができる。具体的には、6×SSC(0.9M NaCl, 0.09M クエン酸三ナトリウム) または6×SSPE (3M NaCl, 0.2M NaH_2PO_4 , 20mM EDTA)・2Na, pH7.4) 中42℃でハイブリダイズさせ、さらに42℃で0.5×SSCにより洗浄する条件が、本発明のストリンジェントな条件の1例として挙げられるが、これに限定されるものではない。

10

【0060】

該ストリンジェントな条件は、好ましくはハイストリンジェントな条件である。ハイストリンジェントな条件とは、例えば0.1×SSC及び0.1% SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である。

【0061】

(発現用組換えベクター、および形質転換)

植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含む発現用組換えベクターを用いて宿主を形質転換することによりヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織を得ることができる。

20

【0062】

上記の形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織においては、ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質が発現される。

【0063】

「外因性の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質」とは、内在性のタンパク質とは異なり、植物細胞又は植物体へ外部から新たに導入する外来性の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質を意味する。「外部から新たに導入する」具体的は方法としては、発現用組換えベクター等を用いて形質転換すればよい。「外部から新たに導入する」遺伝子はもともと内在していた遺伝子を、外部から発現用組換えベクターを用いて形質転換することも含まれる。ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質は、今日まで植物細胞または植物体中に、その存在が確認されていないので、外因性と記さずとも外因性であることは自明である。

30

【0064】

上記のような形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織を用いることにより、ヒアルロン酸を高生産することが可能になる。以下、具体的に説明する。

【0065】

ここで、宿主とは、植物全体、種子、植物器官(例えば花弁、根、茎、塊茎、葉、花器、塊根、種子及び茎頂等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)又は植物培養細胞のいずれをも意味するものである。

40

【0066】

本明細書において、植物とは、種子植物、裸子植物、シダ植物、コケ植物、地衣植物等を含む、多細胞の植物を意味し、植物全体、種子、植物器官(例えば花弁、根、茎、塊茎、葉、花器、塊根、種子及び茎頂等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)又は植物培養細胞のいずれをも包含するものである。

【0067】

また、該形質転換して得られた形質転換体を培養し、該形質転換体により生産されたヒ

50

アルロン酸を分離することにより、ヒアルロン酸を製造してもよい。

【0068】

発現用組換えベクターとしては、形質転換植物細胞又は形質転換植物作製のために通常用いられているベクターを用いることができる。

【0069】

このようなベクターとしては、植物細胞で転写可能なプロモーター配列と転写産物の安定化に必要なポリアデニレーション部位を含むターミネーター配列を含んでいれば特に制限はない。例えばプラスミド「pBI121」、「pBI221」、「pBI101」、「pIG121Hm」等を用いることができる。

【0070】

植物培養細胞を宿主として用いる場合、形質転換は、植物培養細胞に、エレクトロポレーション法又はアグロバクテリウムのバイナリーベクター法もしくはパーティクルボンバードメント法で、植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含むヒアルロン酸製造のための発現用組換えベクターを導入することにより行うことができる。発現ベクターを導入された植物細胞は、例えば、カナマイシン耐性等の薬剤耐性を基準として選択される。形質転換された植物細胞は、細胞培養、組織培養、器官培養に用いることができ、また従来知られている植物組織培養法等を用いて、植物体を再生することもできる。

【0071】

形質転換の対象となる植物細胞の例としては、例えば、タバコ由来BY-2細胞やT-13細胞、ニンジン由来kurodagosun細胞、ブドウ由来VR細胞やVW細胞、ヨウシュヤマゴボウ由来PAR細胞やPAP細胞やPAW細胞、シロイヌナズナ由来T87細胞、アスパラガス由来Asp-86細胞やA.per細胞やA.pas細胞やA.plo細胞、スイカ由来Cba-1細胞、トマト由来Sly-1細胞、ハッカ由来1-Mar細胞、ニチニチソウ由来CRA細胞やV208細胞や、ホウレンソウ由来Spi-WT細胞やSpi-I-1細胞やSpi-12F細胞、ヘチマ由来Lcy-1細胞やLcyD6細胞やLcyD7細胞や、イネ由来OS-1細胞、ツルニチニチソウ由来Vma-1細胞、ゴマ由来PSB細胞やPSW細胞やPSG細胞、ヒャクニチソウ由来ZE3細胞等が挙げられる。

【0072】

植物体、植物器官又は植物組織を宿主とする場合、形質転換は、採取した植物切片に、アグロバクテリウムのバイナリーベクター法又はパーティクルボンバードメント法によって、あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法によって、植物中で機能し得るプロモーターの制御下にあるヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと、糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを含むヒアルロン酸製造のための発現用組換えベクターを導入し、形質転換の結果得られる腫瘍組織やシュート、毛状根等を分離することにより行われる。

【0073】

こうして得られる腫瘍組織やシュート、毛状根等は、そのまま細胞培養、組織培養又は器官培養に用いることが可能である。また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモンの投与等により植物体に再生させることができる。

【0074】

ヒアルロン酸合成酵素遺伝子が導入された植物細胞から植物を再生させるには、このような植物細胞を、再分化培地、ホルモンフリーのMS培地等に培養すればよい。発根した幼植物体は、土壌に移植して栽培することにより植物体とすることができる。再生（再分化）の方法は植物細胞の種類により異なるが、従来知られている植物組織培養法を適宜用いることができる。

【0075】

例えば、イネではFujimuraら（Fujimuraら（1995）、Plant Tissue Culture Lett., vol.12: p74）の方法を用いることができる。トウモロコシでは、Shillitoら（Shillitoら（1989）、Bio/Technology, vol.7:p581、Gorden-Kamm, 1990, Plant

10

20

30

40

50

Cell 2, 603) の方法を用いることができる。ジャガイモでは、Visserら (Visserら (1989)、Theor.Appl.Genet., vol.78:p589) の方法を用いることができる。タバコでは、Nagataら (Nagata, 1971, Planta 99, 12) の方法を用いることができる。シロイヌナズナではAkamaら (Akamaら (1992)、Plant Cell Rep., vol.12:p7) の方法を用いることができる。

【0076】

これらの方法により作製された植物体、または同じ性質を有するその子孫（繁殖媒体、例えば種子、塊茎、切穂等から得た植物体）も本発明の対象である。

【0077】

植物内で、ヒアルロン酸合成活性を有するタンパク質および糖ヌクレオチド合成活性を有するタンパク質を発現させ、更に植物内でヒアルロン酸を生産、蓄積または分泌させる際には、植物の適切な組織および器官で特異的に発現するようにヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAおよび糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを、植物中で機能し得るプロモーターの制御下等におき、制御することが好ましい。

【0078】

そのような制御を行うためには組織特異的又は器官特異的プロモーターを更に発現用組換えベクターに挿入して用いるとよい。

【0079】

また、時期特異的プロモーターを用いれば、特定の時期だけに目的遺伝子を発現させることができ、特定の時期だけに生産性を改良することができる。例えば、栄養生長期に働くプロモーターを用いることによって、栄養生長期のみで生産性を改良することができる。

【0080】

器官特異的プロモーターとしては、例えば、根特異的プロモーター、塊茎特異的プロモーター、葉特異的プロモーター、種子特異的プロモーター、茎特異的プロモーター等がある。

【0081】

また、組織特異的プロモーターとしては、例えば、緑色組織特異的プロモーター等がある。

【0082】

より具体的に、使用し得るプロモーターの例としては、例えば、構成的高発現プロモーターとして、カリフラワーモザイクウイルスの35S RNA遺伝子のプロモーターであるCaMV35Sプロモーター等が挙げられる。緑色組織特異的プロモーターとしては、リブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼの小サブユニットタンパク質をコードするrbs遺伝子のプロモーターやクロロフィルa/b結合タンパク質をコードするCAB遺伝子のプロモーター、グルセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼAサブユニットタンパク質をコードするGapA遺伝子プロモーター等が挙げられる。また種子特異的プロモーターとしては、リポキシゲナーゼ遺伝子のLOXプロモーター、レクチン遺伝子のPslプロモーター、アミラーゼ遺伝子のAmylAプロモーター等が挙げられる。根特異的プロモーターとしては、ヒヨシアミン6b-ヒドロキラーゼ遺伝子のA6H6Hプロモーター、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼのPMTプロモーター等が挙げられる。茎特異的プロモーターとしては、スクロースシンターゼのSus4遺伝子プロモーター、グリコプロテインをコードするパタチン遺伝子プロモーター等が挙げられる。

【0083】

また、ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAの発現を誘導性プロモーターで制御することも考えられる。誘導性プロモーターの例を以下に記載する。

【0084】

傷害やサリチル酸の添加により発現が増加する耐病性関連遺伝子プロモーターであるPR

10

20

30

40

50

1aプロモーターや、乾燥、低温、高塩濃度、アブシジン酸の転換より発現が増加するrd29A遺伝子プロモーター等が挙げられる。農薬として用いられている化合物により発現が誘導されるプロモーターとしては、除草剤のセフナーにより誘導されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼの27KDaサブユニットタンパク質をコードするGST-27遺伝子プロモーター、ベンゾ (1,2,3) -チアジアゾール-7-カルボシオイック酸 S-メチルエステル (BTH) により誘導されるキチナーゼ遺伝子プロモーターやPR遺伝子タンパク質プロモーター等がある。さらに、植物細胞内でヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAと糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAをより安定に発現させるためにインスレーターの利用や目的の細胞内小器官でヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質を局在させるためにシグナルペプチドを付加したり、酵素の一部を置換および欠損させること等を行ってもよい。

10

【0085】

形質転換の対象となる植物体には、遺伝子導入の可能ないずれの植物も包含される。

【0086】

本発明の植物又は植物体には、被子植物の単子葉植物や双子葉植物、裸子植物等が包含される。このような植物には、任意の有用植物、特に作物植物、蔬菜植物、花卉植物や木本植物が含まれる。

【0087】

また、本発明の植物又は植物体には、シダ植物、コケ植物等も含まれる。

20

【0088】

本発明が使用され得る植物種の例としては、具体的には、ナス科、イネ科、アブラナ科、バラ科、マメ科、ウリ科、シソ科、ユリ科、アカザ科、セリ科、フトモト科、ヒルガオ科の植物等が挙げられる。

【0089】

ナス科の植物の例としては、Nicotiana、Solanum、Datura、Lycopersion、またはPetuniaに属する植物が挙げられ、例えば、タバコ、ナス、ジャガイモ、トマト、トウガラシ、ペチュニア等が含まれる。

【0090】

イネ科の植物の例としては、Oryza、Hordeum、Secale、Sorghum、Echinochloa、またはZeaに属する植物が挙げられ、例えば、イネ、オオムギ、ライムギ、ヒエ、モロコシ、トウモロコシ、サトウキビ等が含まれる。

30

【0091】

アブラナ科の植物の例としては、Raphanus、Brassica、Arabidopsis、Wasabia、またはCapsellaに属する植物が挙げられ、例えば、大根、アブラナ、シロイヌナズナ、ワサビ、ナズナ等が含まれる。

【0092】

バラ科の植物の例としては、Orunus、Malus、Pynus、Fragaria、またはRosaに属する植物が挙げられ、例えば、ウメ、モモ、リンゴ、ナシ、オランダイチゴ、バラ等が含まれる。

40

【0093】

マメ科の植物の例としては、Glycine、Vigna、Phaseolus、Pisum、Vicia、Arachis、Trifolium、Alphalfa、またはMedicagoに属する植物が挙げられ、例えば、ダイズ、アズキ、インゲンマメ、エンドウ、ソラマメ、ラッカセイ、クローバ、ウマゴヤシ等が含まれる。

【0094】

ウリ科の植物の例としては、Luffa、Cucurbita、またはCucumisに属する植物が挙げられ、例えば、ヘチマ、カボチャ、キュウリ、メロン等が含まれる。

【0095】

シソ科の植物の例としては、Lavandula、Mentha、またはPerilla

50

aに属する植物が挙げられ、例えば、ラベンダー、ハッカ、シソ等が含まれる。

【0096】

ユリ科に属する植物の例としては、*Allium*、*Lilium*、または*Tulipa*に属する植物が挙げられ、例えば、ネギ、ニンニク、ユリ、チューリップ等が含まれる。

【0097】

アカザ科の植物の例としては、*Spinacia*に属する植物が挙げられ、例えば、レンサイ、ホウレンソウ等が含まれる。

【0098】

セリ科の植物の例としては、*Angelica*、*Daucus*、*Cryptotaenia*、または*Apitum*に属する植物が挙げられ、例えば、シシウド、ニンジン、ミツバ、セロリ等が含まれる。

10

【0099】

ヒルガオ科の植物の例としては、*Ipomoea*に属する植物が挙げられ、例えば、サツマイモ等が含まれる。

【0100】

上記のような形質転換植物と同じ性質を有する子孫、また、それらの器官及び組織も本発明の対象である。

【0101】

また、本発明には、ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質を生産する形質転換植物細胞が含まれる。また、ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質を生産する形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織も含まれる。

20

【0102】

(ヒアルロン酸の抽出)

ヒアルロン酸合成酵素活性を有するタンパク質と外因性の糖ヌクレオチド合成酵素活性を有するタンパク質とを同時に発現させ、ヒアルロン酸生産能を獲得させた形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織により生産されたヒアルロン酸を分離又は取得する方法としては、例えば、以下のような方法が挙げられる。

30

【0103】

上記形質転換植物細胞又は形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織を培養若しくは生育させ、ヒアルロン酸を生産させた後、適宜公知の方法によって植物抽出物を得ればよく、その植物抽出物にはヒアルロン酸が含まれていればよい。

【0104】

例えば、形質転換植物体又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織等であれば、乾燥させた後に粉碎して、適当な有機溶媒により抽出を行っても良い。そのヒアルロン酸を含む植物抽出液を濾過し、植物細胞を含まないヒアルロン酸の濾過溶液を得る。この溶液をダイアフィльтраーションによって精製し、低分子量の不純物を除去する。溶解したヒアルロン酸を含む濾過溶液を純水でダイアフィльтраーションし、濾液を連続して捨てることによりヒアルロン酸の分離が可能である。医療用の製品が必要である際には、溶液から核酸を沈殿させるという工程を更に行ってもよい。この工程は、例えば、塩化セチルピリジニウムの第4級アンモニウム化合物等の陽イオン界面活性剤を添加することによって行うことができる。

40

また、形質転換した植物細胞の培養液中に蓄積されたヒアルロン酸を、公知の分離法を用い精製しても良い。

【0105】

(ヒアルロン酸の利用)

本発明により取得されるヒアルロン酸は、化粧品及び医薬品の成分、又はバイオマテリ

50

アル素材等の用途に有用に利用できる。具体的には、化粧品保湿成分、又は、関節炎や慢性リウマチ、火傷や切り傷の治療薬や目薬の成分等として、有用に利用し得る。また、皮膚の老化を防止及び／又は改善する上で有用な機能性食品として利用しても良い。

【0106】

本発明のヒアルロン酸の製造方法により得られたヒアルロン酸を有効成分として含有する化粧料組成物を製造しても良い。例えば水溶液、油剤、乳液、懸濁液等の液剤、ゲル、クリーム等の半固形剤、粉末、顆粒、カプセル、マイクロカプセル、固形等の固形剤の形態で適用可能である。従来から公知の方法でこれらの形態に調製し、ローション剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏、硬膏、ハップ剤、エアゾル剤、坐剤、注射剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、シロップ剤、トローチ剤等の種々の剤型とすることができる。これらを身体に塗布、貼付、噴霧、飲用等により適用することができる。特にこれら剤型の中で、ローション剤、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾル剤等が皮膚外用剤に適している。化粧料としては、化粧水、美容液、乳液、クリーム、パック等の皮膚化粧料、メイクアップベースローション、メイクアップクリーム、乳液状又はクリーム状あるいは軟膏型のファンデーション、口紅、アイカラー、チークカラーといったメイクアップ化粧料、ハンドクリーム、レッグクリーム、ボディローション等の身体用化粧料等、入浴剤、口腔化粧料、毛髪化粧料とすることができる。通常、化粧料において使用される製剤化方法にしたがって、これらの剤型として製造することができる。

10

【実施例】

【0107】

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

20

【0108】

(実施例1) シロイヌナズナ由来UGD遺伝子の単離

シロイヌナズナにおいては、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (BT006380: AtUGD1、配列番号15) 遺伝子が単離され、活性のあることが示されている (Plant J. 2000 21(6):537-46.)。また、NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) のデータベース上には、UGDをコードすると推定されるシロイヌナズナ由来の3種類の遺伝子 (AF424576: AtUGD2 (配列番号17)、AY056200: AtUGD3 (配列番号19)、AY070758: AtUGD4 (配列番号21)) が示されている。これら4種類のUGD遺伝子をクローニングし、UGD活性の確認を行った。

30

【0109】

シロイヌナズナからRNeasy (QIAGEN) のプロトコールに従い、RNAを抽出した。逆転写反応は、トータルRNA 2 µgを5.5 µlの滅菌水に溶解し、10 µM

オリゴd(T)プライマー1 µlと混ぜ、70℃で10分間熱変性した。急冷した後、ReverTraAce kit (東洋紡) を用いて逆転写反応した。反応は、42℃ 30分、99℃ 5分で行った。

【0110】

シロイヌナズナ由来UGD遺伝子をPCRにより増幅するために、データベース上の4つの配列を参考としてPCRプライマーを設計した。発現ベクター

pMAL-c2(NewEngland Biolab)への導入に必要な制限酵素切断部位をプライマーに付加した。AtUGD1にはEcoRIまたはHindIII (配列番号23、配列番号24)、AtUGD2にはEcoRIまたはPstI (配列番号25、配列番号26)、AtUGD3にはEcoRIまたはPstI (配列番号27、配列番号28)、AtUGD4にはEcoRIまたはXbaI (配列番号29、配列番号30) を付加した。PCR

40

は、DNAポリメラーゼにKOD plus- (東洋紡) を用い、94℃ 2分、(94℃ 15秒、45℃ 30秒、68℃ 1分) 3サイクル、(94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 1分) 30サイクルの反応プログラムで行った。鋳型DNAには 逆転写反応産物1 µlを使用した。得られたPCR産物を電気泳動に供試した結果、いずれのPCRプライマーの組み合わせでも推定サイズにバンドが確認された。PCR産物を制限酵素 (AtUGD1: EcoRIおよびHindIII、AtUGD2、AtUGD3: EcoRIおよびPstI、AtUGD4: EcoRIおよびXbaI) で切断し、同様の制限酵素で処理したpM

50

AL-c2にLigation high (東洋紡) を用いてクローニングした。該連結反応液を用いて*Escherichia*

coli JM109株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン (50 μ g/ml) を含むLuria-Bertani (LB) 寒天培地 (バクトトリプトン

10 g/l、酵母エキス 10 g/l、塩化ナトリウム 5g/l、寒天 15g/l) に塗布後、37°Cで一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。挿入された断片の配列を、DNAシーケンサーにより解読し、増幅した遺伝子が配列番号15、17、19、21記載の遺伝子であることを確認した。以上より、プラスミドpMAL-c2/AtUGD1、pMAL-c2/AtUGD2、pMAL-c2/AtUGD3、pMAL-c2/AtUGD4が構築された。

10

以上より、シロイヌナズナにおいて、既に報告されていたAtUGD1以外にも、3種のUGD遺伝子が発現していることが明らかとなった。

【0111】

上記の発現プラスミドを含有する大腸菌JM109株をアンピシリン (50 μ g/mL) を含むLB液体培地で37°Cにて一晩培養した。アンピシリン (50 μ g/mL) および0.2%

グルコースを含むLB培地30mlに前培養液300 μ lを接種し、37°Cにて2時間培養した後、25°Cに温度を下げ、終濃度0.3mMのイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、組換えタンパク質の発現誘導を24時間行った。

【0112】

菌体からのMBP融合タンパク質の精製はMagExtractor-MBP- (東洋紡) を用いた。菌体を培養液1mlから遠心分離で回収し、超音波破碎により菌体を破碎し、粗抽出液を調製した。上記キットのプロトコールに従い、MBP融合タンパク質を精製した。

20

【0113】

図1は得られたMBP融合タンパク質のSDS-PAGEの結果を示す。いずれのクローンの酵素液にも推定サイズのバンドが確認された。

【0114】

次に得られたMBP融合タンパク質のUGD活性をTenhaken and Thulkeの報告 (Plant Physiol. 1996,

112:1127-34) に従い測定した。本方法はUGD反応によって生じるNADHの増加をAbs340の増加として捕捉する方法である。具体的には、UDP-グルコース (4mM)、NAD⁺ (1mM)、EDTA (1mM)、Tris-HCl (20mM) を含む溶液 (pH8.0) に、酵素液 (MBP-UGD融合タンパク質) 15 μ lを添加して37°Cで反応を行い、反応液の吸光度 (Abs340) を経時的に測定した。表1は、上記MBP融合タンパク質の酵素活性の測定結果を示す。

30

【0115】

【表 1】

	U/mg
AtUGD1	2.15
AtUGD2	1.32
AtUGD3	1.15
AtUGD4	0.25
cvUGD-HI	0.06
cvUGD-KA	0.14

【0116】

その結果、AtUGD1、AtUGD2、AtUGD3およびAtUGD4のすべての酵素液にUGD活性があることが確認され、シロイヌナズナにおいて、既に報告されていたAtUGD1に加え、上記のクローニングで得られたAtUGD2、AtUGD3およびAtUGD4のいずれの遺伝子もUGDをコードすることが示された。

【0117】

(実施例2) クロレラウイルス由来UGD遺伝子の単離

クロレラウイルス由来UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (cvUGD) 遺伝子をPCRにより単離するために、既に明らかになっているクロレラウイルスPBCV-1系統の配列情報を参考とし、配列番号31、配列番号32のプライマーを設計した。発現ベクター pMAL-c2へ導入するために、5' 端プライマーにEcoRI、3' 端プライマーにはPstIサイトを付加した。PCRは、DNAポリメラーゼにKOD plus-を用い、94℃ 2分、(94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 1分) 30サイクルの反応プログラムで行った。鋳型DNAにはクロレラウイルス弘前系統 (CVHI1)、角館系統 (CVKA1) のゲノムDNAを使用した。得られたPCR産物を電気泳動に供試した結果、いずれのPCRプライマーの組み合わせでも推定サイズにバンドが確認された。PCR産物をEcoRIおよびPstIで切断し、同様の制限酵素で処理したpMAL-c2にLigation highを用いてクローニングした。該連結反応液を用いてEscherichia coli JM109株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロ

ニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。

【0118】

挿入された断片の配列を、DNAシーケンサーにより解読し、CVHI1株およびCVKA1株由来の新規なUGD遺伝子を得、これを「cvUGD-HI遺伝子」および「cvUGD-KA遺伝子」と命名した。cvGFAT-HI遺伝子およびcvUGD-KA遺伝子配列を配列番号11、配列番号13に示す。以上より、プラスミドpMAL-c2/cvUGD-HI、pMAL-c2/cvUGD-KAが構築された。

【0119】

実施例1と同様に発現誘導およびMBP融合タンパク質の精製を行った。図2は得られたMBP融合タンパク質のSDS-PAGEの結果を示す。いずれのクローンの酵素液にも推定サイズのバンドが確認された。

10

【0120】

次に得られたMBP融合タンパク質のUGD活性を実施例1同様に測定した。表1は、上記MBP融合タンパク質の酵素活性の測定結果を示す。

【0121】

上述の方法により、UGD活性を測定した結果、cvUGD-HI、cvUGD-KAともに機能的な酵素をコードしていることが確認された。

【0122】

(実施例3) シロイヌナズナ由来GFAT遺伝子の単離

植物由来のGFAT遺伝子としては、トウモロコシ由来GFAT(Accession No.AY106905)遺伝子を単離した報告(WO 00/11192)があるが、その他の植物種においてはGFAT遺伝子は単離されていない。NCBI

20

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) のデータベース上には、既知の遺伝子と相同性の高いシロイヌナズナ由来のGFAT遺伝子(Accession No.NM_113314)が示されている。この塩基配列を配列表の配列番号9に示す。

【0123】

シロイヌナズナからRNeasy (QIAGEN) のプロトコールに従い、RNAを抽出した。逆転写反応は、トータルRNA 2 µgを5.5 µlの滅菌水に溶解し、10 µM オリゴd(T)プライマー1 µlと混ぜ、70℃で10分間熱変性した。急冷した後、ReverTraAce kit (東洋紡) を用いて逆転写反応をした。反応は、42℃ 30分、99℃ 5分で行った。

【0124】

30

シロイヌナズナ由来GFAT遺伝子をPCRにより増幅するために、データベース上の配列を参考とし、配列番号33、配列番号34のプライマーを設計した。無細胞発現ベクターpEU-NII(東洋紡)への導入のために、3' 端プライマーにSalIサイトを付加した。PCR は、DNAポリメラーゼにKOD -plus- を用い、94℃ 2分、(94℃ 15秒、45℃ 30秒、68℃ 1分) 3サイクル、(94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 1分) 30サイクルの反応プログラムで行った。鋳型DNAには 逆転写反応産物1 µlを使用した。得られたPCR産物を電気泳動に供試した結果、推定サイズにバンドが確認された。PCR産物を制限酵素SalIで切断し、制限酵素EcoRVおよびSalIで処理したpEU-NIIにLigation highを用いてクローニングした。該連結反応液を用いてEscherichia

coli JM109株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 µg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。以上より、プラスミドpEU-NII/AtGFATを構築した。

40

【0125】

挿入された断片の配列を、DNAシーケンサーにより解読し、増幅した遺伝子が配列番号9記載の遺伝子であることを確認した。以上より、シロイヌナズナにおいて、GFAT遺伝子が発現していることが明らかとなった。

【0126】

PROTEIOS (登録商標) (東洋紡) により、AtGFAT遺伝子のタンパク質発現を行った。具体的には、5 µgのプラスミドpEU/AtGFATを鋳型としてT7

50

RNA Polymeraseで37℃、4時間反応を行い、mRNAを合成した。その後、6 μgのmRNAをwheat germ extractと混合し、重層法で26℃、24時間反応した。反応溶液をサンプルバッファー (50mM

Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、10% glycerol、0.6% βメルカプトエタノール) に懸濁し、5分間煮沸した後、発現したタンパク質をSDS-PAGE解析に供試した。推定サイズ (約75kDa) のバンドが確認され、AtGFATタンパク質が発現していることが示された (図3)。

【0127】

タンパク質発現液をGFAT反応に供試した。具体的にはフルクトース-6-リン酸 (15mM)、L-グルタミン (15mM)、EDTA(1mM)、DTT(1mM)、KH₂PO₄(60mM)を含む溶液 (pH7.0) にタンパク質発現液50 μlを添加して、37℃で4時間反応させた。Morgan&Elson法の改良法である Reissig法 (J.Biol.Chem,1955,217(2),959-66) を用いて反応液中のグルコサミン-6-リン酸を測定し、GFAT活性を評価した。結果を図4に示す。コントロールであるpEU-NII/DHFRではグルコサミン-6-リン酸は検出されなかったが、pEU-NII/AtGFATではグルコサミン-6-リン酸の増加が見られ、タンパク質発現液の中に活性型のGFAT酵素が存在することが確認された。

【0128】

以上より、シロイヌナズナにおいて、AtGFAT遺伝子が機能的な酵素をコードしていることが明らかとなった。

【0129】

(実施例4) クロレラウイルス由来GFAT遺伝子の単離

クロレラウイルス由来グルタミン：フルクトース-6-リン酸 アミドトランスフェラーゼ遺伝子 (cvGFAT) をPCRにより単離するためにPCRプライマーを作製した。既に明らかになっているクロレラウイルスPBCV-1系統の配列情報を参考とし、GFAT推定領域の外側100bpから増幅できるように、配列番号35、配列番号36のプライマーを設計した。PCRは、DNAポリメラーゼにKOD -plus- を用い、94℃ 2分、(94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 1分) 30サイクルの反応プログラムで行った。鋳型DNAにはクロレラウイルス弘前系統 (CVHI1)、角館系統 (CVKA1) のゲノムDNAを使用した。得られたPCR断片をPCR-Scriptクローニングベクター (Stratagene) にクローニングした。挿入された断片の配列を、DNAシーケンサーにより解読し、CVHI1株およびcvKA1株由来の新規なGFAT遺伝子を得、これを「cvGFAT-HI遺伝子」および「cvGFAT-KA遺伝子」と命名した。cvGFAT-HI、cvGFAT-KAの遺伝子配列を配列番号5、配列番号7に示す。

【0130】

配列番号5、7で示されるcvGFAT-HI、cvGFAT-KA遺伝子のオープンリーディングフレーム領域を無細胞タンパク質合成用ベクターに導入し、タンパク質発現を行った。

【0131】

cvGFAT-HI遺伝子を含むpCRscriptを鋳型に配列番号37、配列番号38で示されるプライマーを用い、前記条件でPCRを行った。cvGFAT-KA遺伝子を含むpCRscriptを鋳型に配列番号37、配列番号39で示されるプライマーを用い、前記条件でPCRを行った。PCRは、DNAポリメラーゼにKOD -plus-を用い、94℃ 2分、(94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 1分) 30サイクルの反応プログラムで行った。PCR産物をXbaIで切断処理し、pEU-NIIベクターのEcoRVサイトとXbaIサイトにクローニングした。該連結反応液を用いてEscheri

chia coli DH5α株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μg/mlを含むLuria-Bertani (LB) 寒天培地 (バクトトリプトン 10 g/l、酵母エキス 10 g/l、塩化ナトリウム 5g/l、寒天 15g/l) に塗布後、37℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。以上より、プラスミドpEU-NII/cvGFAT-HIおよびpEU-NII/cvGFAT-KAを構築した。

【0132】

pEU-NII/cvGFAT-HIおよびpEU-NII/cvGFAT-KAを用いて、実施例3同様にPROTEIOS (登録商標) により、タンパク質発現を行った。発現したタンパク質をSDS-PAGE解析にて確認し

た結果、推定サイズ（約65kDa）のバンドが確認され、cvGFATタンパク質が発現していることが示された（図3）。

【0133】

実施例3同様にタンパク質発現液をGFAT反応に供試した。結果を図4に示す。コントロールであるpEU/DHFRではグルコサミン-6-リン酸は検出されなかったが、pEU/cvGFAT-HIではグルコサミン-6-リン酸の増加が見られ、タンパク質発現液の中に活性型のGFAT酵素が存在することが確認された。

【0134】

（実施例5） クロレラウイルス由来HAS遺伝子のpBI121へのクローニング

クロレラウイルス由来ヒアルロン酸合成酵素遺伝子（cvHAS、配列番号1）を植物形質転換ベクター（以下発現ベクターと称することもある）pBI121(Jefferson et al., 1987, EMBO J, 6, 3901-3907)にクローニングするために配列番号40、配列番号41で示されるプライマーを作製した。PCR

は、cvHASを含むプラスミドDNAを鋳型に使用し、DNAポリメラーゼにKOD -plus- を使い、94℃ 2分、（94℃ 15秒、45℃ 30秒、68℃ 1分）3サイクル、（94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 1分）30サイクルの反応プログラムで行った。得られたPCR断片を精製し、BamHIおよびDraIで切断した。続いて、発現ベクターpBI121へのcvHASの挿入は、pBI121を制限酵素SacIで処理後、Blunting

High(東洋紡)で平滑処理した後、BamH I で処理し、制限酵素処理したcvHAS遺伝子をクローニングした。該連結反応液を用いてEscherichia coli DH5 α 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。以上より、cvHASを含むpBI121/cvHAS (pBIHAと称することもある) が作製できた。

（実施例6） クロレラウイルス由来GFAT遺伝子のpBI121へのクローニング

配列番号42、配列番号38で示されるプライマーを用い、cvGFAT-HIを含むプラスミドDNAを鋳型としてPCRを行った。KOD -plus- を使い、94℃ 2分、（94℃ 15秒、50℃ 30秒、68℃ 1分）2サイクル、（94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 1分）28サイクルの反応プログラムで行った。PCRで得られた断片をBamH I で処理した。続いて、発現ベクターppBI121へのcvGFAT-HIの挿入は、pBI121をSacIで処理後、Blunting Highで平滑処理した後、BamH I で処理し、上記の制限酵素処理したcvGFAT-HI遺伝子をクローニングした。該連結反応液を用いてEscherichia coli DH5 α 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。以上より、cvGFAT-HIを含むpBI121/cvGFAT-HI (pBIGFと称することもある) が作製できた。

【0135】

（実施例7） クロレラウイルス由来GFAT遺伝子およびHAS遺伝子のpBluescriptへのサブクローニング

pBIHAをPvuII、PstIの順に制限酵素処理し、pBluescript上のPstI、SmaIサイトにサブクローニングし、pBluescript/35S-cvHAS-NOS (pBSHAと称することもある) を作製した。

【0136】

pBIGFをPvuII、SphIの順に制限酵素処理した。Blunting High(東洋紡)で平滑処理した後、pBluescript上のEcoRVサイトにサブクローニングし、pBluescript/35S-cvGFAT-NOS (pBSGFと称することもある) を作製した。

【0137】

pBSGFをKpnI、NotIの順に制限酵素処理した。Blunting High(東洋紡)で平滑処理した後、SpeI処理、平滑処理、脱リン酸の順に処理したpBSHAに35S-cvGFAT-NOSをサブクローニングし、pBluescript/cvHAS-cvGFAT (pBSHGと称することもある) を作製した。

【0138】

(実施例8) クロレラウイルス由来GFAT遺伝子およびHAS遺伝子のpBI121へのクローニング

pBSHGをKpnI、NotIの順に制限酵素処理し、cvHAS-cvGFATの発現カセットを切り出し平滑処理した。続いて、発現ベクターpBI121へのcvHAS-cvGFATの挿入は、pBI121を制限酵素SacIおよびHindIIIで処理した後、Blunting

Highで平滑処理し、上記の制限酵素処理したcvHAS-cvGFAT遺伝子をクローニングした。該連結反応液を用いてEscherichia coli DH5 α 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。以上より、cvHAS-cvGFATを含むpBI121

10

/cvHAS-cvGFAT (pBIHGと称することもある) が作製できた。

【0139】

(実施例9) エレクトロポレーションコンピテントセルの作製

アグロバクテリウムLBA4404 (Agrobacterium tumefaciens strain LBA4404) の単一コロニーを5 mLのLB培地に植菌し、28 $^{\circ}$ Cで1晩振盪培養した。この培養液を、500mLのLB培地に植菌し、600

nmにおける濁度が0.5になるまで28 $^{\circ}$ Cで振盪培養した。培養液を遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)により集菌して上清を除去し、菌体を洗浄するため

500 mLの滅菌水を加えて懸濁し、再度遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)により集菌して上清を除去した。この操作を2回繰り返した後、沈殿に

20

20 mLの冷却した10%グリセロール溶液を加えて懸濁し、遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)により集菌して上清を除去した。沈殿に3

mLの冷却した10%グリセロール溶液を加えて懸濁し、40 μ Lずつ1.5mL遠心管に分注して、液体窒素で凍結させてから-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0140】

(実施例10) アグロバクテリウムLBA4404株へのpBIHGの導入

A. tumefaciens LBA4404のエレクトロポレーションコンピテント細胞 (Invitrogen) 40 μ lに発現プラスミドpBIHG (200 μ g/ml) 1 μ lを混合した懸濁液を、あらかじめ氷中で冷却した電極間距離1mmのキュベットに注入し、パルス電場 (1.8kV、25 μ F、200 Ω)を印加した。直ちにSOC500 μ lを加え、28 $^{\circ}$ Cにて3時間培養した後、カナマイシンを含むLBプレート培地に塗布し、25 $^{\circ}$ Cで3日間培養し、pBIHGを含むアグロバクテリウムを得た。

30

【0141】

(実施例11) pBIHGを含むアグロバクテリウムLBA4404株によるタバコの感染

タバコ (Nicotiana tabacum SR-1) の形質転換は、アグロバクテリウムを用いるリーフディスク法 (山田康之、岡田吉美編、「植物バイオテクノロジーII」、東京化学同人、1991年)に従った。カナマイシン50mg/Lを含む5mLのLB

培地で28 $^{\circ}$ Cにて1晩培養したpBIHG、またはpBIHAをそれぞれ含むアグロバクテリウムの培養液に、タバコのリーフディスクを3分間浸した後、濾紙上で余分な菌体を除去し、

MS (Murashige and Skoog) 無機塩 (Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant., 15, 473) に3%

40

スクロース、B5ビタミン、1mg/L ベンジルアミノプリン、1mg/L ナフタレン酢酸および0.3% グランガムを添加し、pH5.7に調整した分化培地に静置し、28 $^{\circ}$ Cにて2日間、暗所で静置した。感染させたリーフディスクを滅菌水で3回洗浄し、濾紙上で余分な水分を除去した後、抗生物質としてカナマイシン (100mg/L) およびクラフォラン (250mg/L) を含む分化培地に静置し、25 $^{\circ}$ Cにて16時間光条件下でカルスの形成を誘導した。誘導開始3週間後に、形態的に正常なシュートを選び、茎葉を含んだ状態で切り出し、カナマイシン (100mg/L) およびクラフォラン (250mg/L) を含む発根培地 (MS無機塩、3%

スクロース、B5ビタミンおよび0.3% グランガム、pH5.7)に移し、25 $^{\circ}$ Cにて16時間光条件下で発根を誘導した。2週間後に発根が認められたシュートを新鮮な発根培地に移し替え

50

、茎葉の生育したラインが得られた。

【0142】

(実施例12) 形質転換タバコの生産したヒアルロン酸の定量

上述のアグロバクテリウムによる感染で得られた形質転換タバコの葉約100mgを2ml容のチューブに移し、200 μ lのバッファー (20mM Tris-HCl pH7.5、0.2M NaCl、1mM EDTAおよび10mM 2MEを含む)を加えて懸濁し、400mgのステンレスビーズ(直径4.8mm)を加えた。ビードスマッシュ(和研薬BS-12)を用いて、チューブを振とう攪拌処理することにより、タバコの葉を破碎処理した(4,000rpm, 2分)。破碎処理後の液を遠心し(15,000rpm, 10分)、上清を粗抽出液として回収した。粗抽出液を水で希釈し、測定サンプルとして用いた。ヒアルロン酸の定量は、ヒアルロン酸プレート「中外」(富士レビオ)を用いて行った。その結果を図5に示す。cvHAS-cvGFAT遺伝子を導入した形質転換タバコでは、cvHAS遺伝子を導入した形質転換タバコと比較して、ヒアルロン酸生産性が有意に向上していた。

10

(実施例13) クロレラウイルス由来UGD遺伝子のpBI121へのクローニング

配列番号43、配列番号44で示されるプライマーを用い、cvUGD-HIを含むプラスミドDNAを鋳型としてPCRを行った。KOD -plus-を用い、94°C 2分、(94°C 15秒、50°C 30秒、68°C 1分)2サイクル、(94°C 15秒、60°C 30秒、68°C 1分)28サイクルの反応プログラムで行った。PCRで得られた断片をBamH I およびSac I で処理した。続いて、発現ベクターpBI121へのcvUGD-HIの挿入は、pBI121をSac I で処理後、BamH I で処理し、上記の制限酵素処理したcvUGD-HI遺伝子をクローニングした。該連結反応液を用いてEscherichia

20

a coli DH5 α 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37°Cで一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。以上より、cvUGD-HIを含むpBIUGが作製できた。

【0143】

(実施例14) クロレラウイルス由来UGD遺伝子のpBluescriptへのサブクローニング
pBIUGをEcoR I、HindIIIで制限酵素処理し、pBluescript上のEcoR I、HindIIIサイトにサブクローニングし、pBSUGを作製した。

【0144】

pBSUGをSpeI処理した後、Blunting Highで平滑処理し、SpeIサイトを破壊した。続いて、pBSHAをNot I 処理、平滑処理、Kpn I 処理し35S-cvHAS-NOSを切り出した。pBSUGを、Xho I 処理、平滑処理、Kpn I 処理し、切り出した35S-cvHAS-NOSを連結し、pBSHUを作製した。pBSGFをSalI処理、平滑処理、Not I 処理し、35S-cvGFAT-NOSを切り出した。pBHUを、Spe I 処理、平滑処理、Not I 処理し、切り出した35S-cvGFAT-NOSを連結し、pBSHUGを作製した。

30

【0145】

(実施例15) クロレラウイルス由来UGD遺伝子、GFAT遺伝子、およびHAS遺伝子のpBI121へのクローニング

合成DNAを用い、pBI121のHindIIIサイト下流にSma I サイト、EcoR I サイトの上流にKpn I サイトをそれぞれ付加した改変pBI121を作製した。pBSHUGをNotI処理、平滑処理、Kpn I 処理し、連結したHAS、UGDおよびGFATの発現カセットを切り出し、Sma I およびKpn I で切断処理した改変pBI121にクローニングした。該連結反応液を用いてEscherichia coli DH5 α 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37°Cで一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出した。以上より、HAS、UGDおよびGFATの発現カセットを含むpBIHUGを作製できた。

40

【0146】

(実施例16) pBIHUGを導入した形質転換タバコの実験およびヒアルロン酸の定量
発現プラスミドpBIHUGを用いて、実施例10、11に示した方法と同様に、アグロバクテ

50

リウムLBA4404株へのpBIHUGの導入、およびpBIHUGを含むアグロバクテリウムLBA4404株によるタバコリーフディスクへの感染を行った結果、HAS、UGD、およびGFAT遺伝子の導入が確認されたタバコが20ライン確認された。実施例12に示した方法と同様にサンプルを調製し、ヒアルロン酸を測定した結果を図6に示す。HAS、UGDおよびGFAT遺伝子を導入した形質転換タバコでは、cvHAS遺伝子を導入した形質転換タバコ、またはcvHAS-cvGFAT遺伝子を導入した形質転換タバコと比較して、ヒアルロン酸生産性が有意に向上していた。

【0147】

(実施例17) 形質転換タバコ(T1世代)の生産したヒアルロン酸の定量

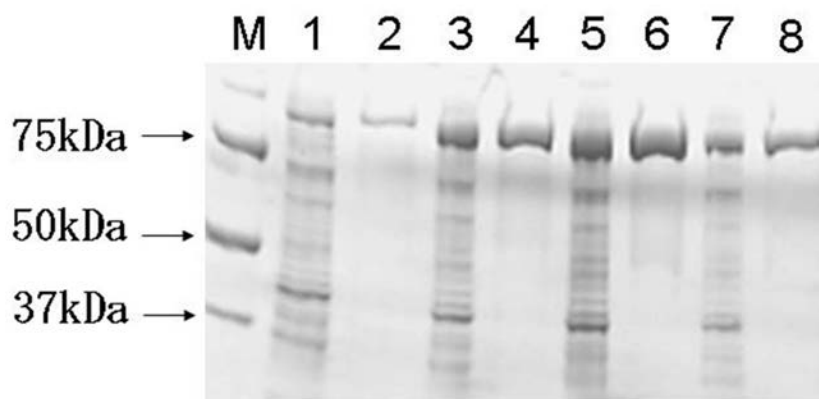
実施例12で作製したcvHAS-cvGFAT遺伝子を導入した形質転換タバコから種子を採取し、カナマイシン(100mg/L)を含むMS分化培地に播種した。成長した形質転換タバコ(T1世代)から実施例12に示した方法と同様に粗抽出液を調製し、ヒアルロン酸を測定した結果、T0世代と同等のヒアルロン酸生産性が確認された。

【産業上の利用可能性】

【0148】

本発明によれば、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子が植物内で発現され、更に、植物内でヒアルロン酸が高度に生産される。従来よりも、更に高度にヒアルロン酸を生産可能な植物または植物培養細胞、その作製方法、及び発現ベクターを提供することができる。従って、植物で生産された安全なヒアルロン酸を低コストで提供することができることから、産業界に大きく寄与することが期待される。

【図1】



M:マーカー

1:AtUGD4 (菌体破砕液)

2:AtUGD4 (精製タンパク質)

3:AtUGD2 (菌体破砕液)

4:AtUGD2 (精製タンパク質)

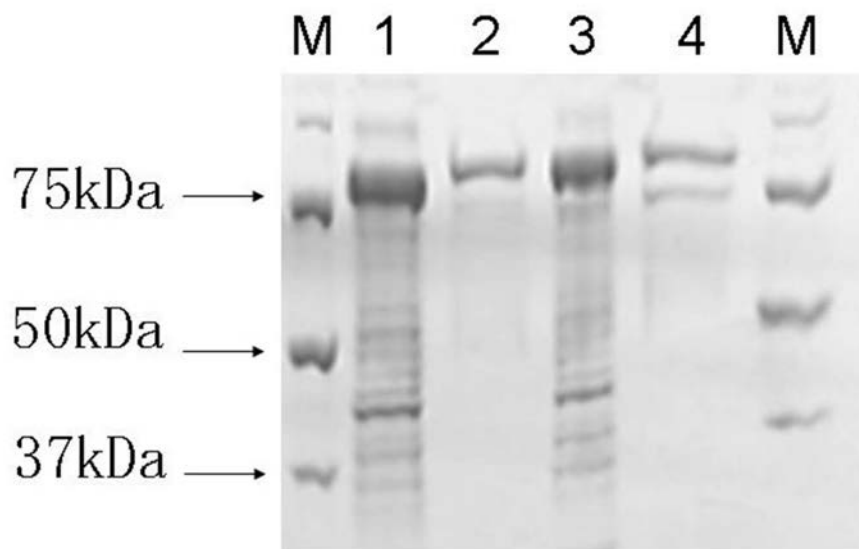
5:AtUGD3 (菌体破砕液)

6:AtUGD3 (精製タンパク質)

7:AtUGD1 (菌体破砕液)

8:AtUGD1 (精製タンパク質)

【図 2】



M: マーカー

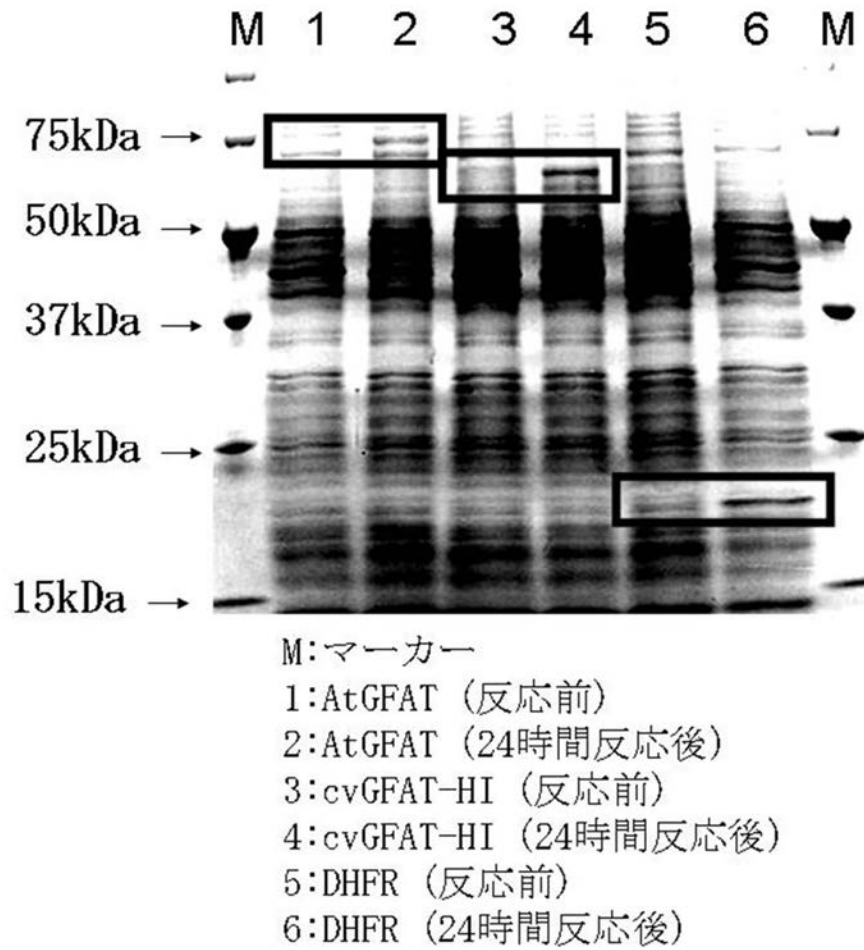
1: cvUGD-HI (菌体破砕液)

2: cvUGD-HI (精製タンパク質)

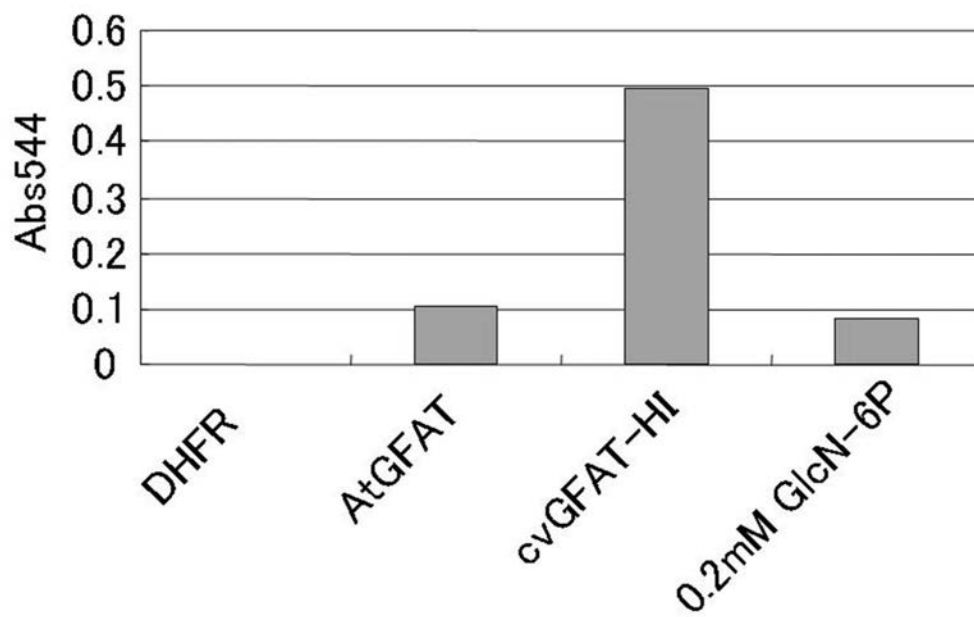
3: cvUGD-KA (菌体破砕液)

4: cvUGD-KA (精製タンパク質)

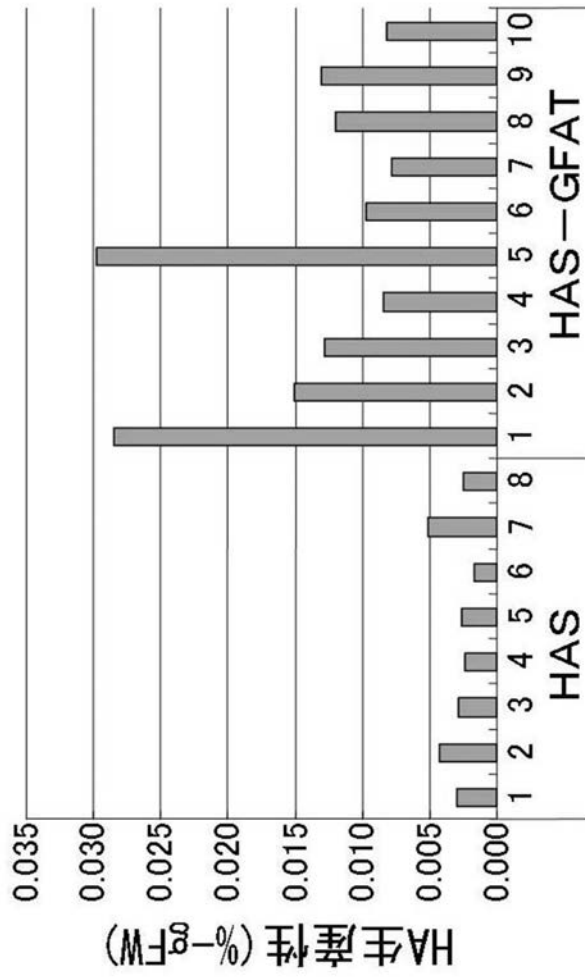
【図 3】



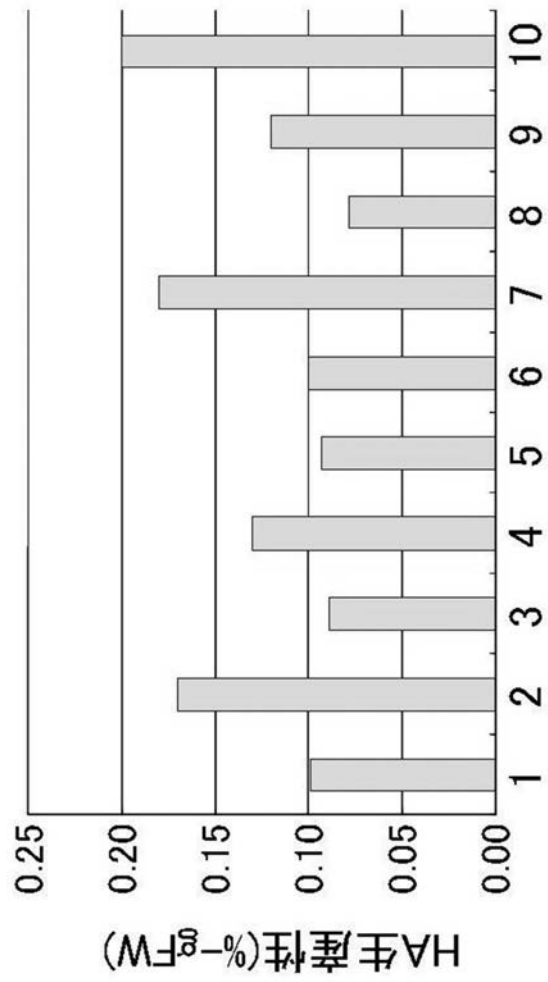
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

[0004935359000001.app](#)

フロントページの続き

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 国際公開第2005/012529 (WO, A1)
特表2001-521741 (JP, A)
国際公開第2006/032538 (WO, A1)
特開2006-204260 (JP, A)
Virol., 250(1998), p.388-396
Virol., 257(1999), p.15-23
Appl. Environ. Microbiol., 71(7)(2005.7), p.3747-3752
Plant J., 21(6)(2000), p.537-546
Arabidopsis thaliana glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)/ sugar binding / transaminase (AT3G24090) mRNA, complete cds., Database DDBJ/EMBL/GenBank[online], Accession No. NM_113314, 25-JAN-2005 uploaded, [retrieved on 12-Nov-2010], URL, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/18404036?sat=OLD04&satkey=6488194>>
J. Biosci. Bioeng., 99(6)(2005.6), p.521-528

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
A01H 5/00
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)