(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3782442号
(P3782442)
(45)発行日　平成18年6月7日(2006.6.7)　(24)登録日　平成18年3月17日(2006.3.17)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 9/02	(2006.01)	C12N	9/02	
C12N 9/10	(2006.01)	C12N	9/10	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 23/00	(2006.01)	C12P	23/00	

請求項の数 7　(全 143 頁)

(21)出願番号	特願平3-506139
(86)(22)出願日	平成3年3月4日(1991.3.4)
(65)公表番号	特表平5-504686
(43)公表日	平成5年7月22日(1993.7.22)
(86)国際出願番号	PCT/US1991/001458
(87)国際公開番号	WO1991/013078
(87)国際公開日	平成3年9月5日(1991.9.5)
審査請求日	平成10年3月4日(1998.3.4)
審判番号	不服2001-12898(P2001-12898/J1)
審判請求日	平成13年7月23日(2001.7.23)
(31)優先権主張番号	487,613
(32)優先日	平成2年3月2日(1990.3.2)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	525,551
(32)優先日	平成2年5月18日(1990.5.18)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　503259381
ビーピー・コーポレーション・ノース・アメリカ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国イリノイ州６０５５５，ワレンヴィル，ウィンフィールド・ロード　４１０１
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100071124
弁理士　今井　庄亮
(74)代理人　100076691
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人　100075236
弁理士　栗田　忠彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】遺伝子操作した宿主におけるカロテノイドの生合成

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＡＴＣＣ寄託番号４０７５４を有するプラスミドｐＡＲＣ１４０Ｎの約１．２４ｋｂｐのＰｖｕＩＩ－ＥｃｏＲＩ制限フラグメント内に存在する、
エルウィニア・ヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）の酵素フィトエン・シンターゼの構造遺伝子を規定するヌクレオチド配列を含む単離されたＤＮＡセグメント。

【請求項２】

ＡＴＣＣ寄託番号４０７５４を有するプラスミドｐＡＲＣ１４０Ｎの約１．２４ｋｂｐのＰｖｕＩＩ－ＥｃｏＲＩ制限フラグメント内に存在する、
エルウィニア・ヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）の酵素フィトエン・シンターゼの構造遺伝子を規定する少なくとも約１０００ｂｐを有するヌクレオチド配列を含む単離されたＤＮＡセグメント。

【請求項３】

ＡＴＣＣ寄託番号４０７５６を有するプラスミドｐＡＲＣ２８５の約１．０４ｋｂｐのＮｃｏＩ－ＢａｍＨＩ制限フラグメント内に存在する、
エルウィニア・ヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）の酵素フィトエン・シンターゼの構造遺伝子を規定するヌクレオチド配列を含む単離されたＤＮＡセグメント。

【請求項４】

ＡＴＣＣ寄託番号４０７５６を有するプラスミドｐＡＲＣ２８５の約１．０４ｋｂｐのＮｃｏＩ－ＢａｍＨＩ制限フラグメント内に存在する、
エルウィニア・ヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）の酵素フィトエン・シンターゼの構造遺伝子を規定する少なくとも約１０００ｂｐを有するヌクレオチド配列を含む単離されたＤＮＡセグメント。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか１項に記載された外来ＤＮＡセグメントと、適合性の宿主生物内で該酵素の発現を行わせるのに適当なプロモーターとが機能的につながれたベクターを含む組換えＤＮＡ分子。
【請求項６】
酵素フィトエン・シンターゼの製造方法であって、
ａ．請求項５に記載の組換えＤＮＡ分子で形質転換された、原核もしくは真核宿主細胞の培養を栄養培地中で開始し：そして
ｂ．該細胞がフィトエン・シンターゼの蛋白質分子を発現するために十分な時間、該培養を続ける；の各工程を含む方法。
【請求項７】
フィトエンの製造方法であって、
ａ．（ｉ）ＡＴＣＣ寄託番号４０７５５を有するプラスミドｐＡＲＣ４１７ＢＨの約１０３０ｂｐのＮｃｏＩ－ＥｃｏＲＶ制限フラグメント、ＡＴＣＣ寄託番号４０７５７を有するプラスミドｐＡＲＣ４９８Ｄの約１０００ｂｐのＮｃｏＩ－ＰｖｕＩＩ制限フラグメント及びＡＴＣＣ寄託番号４０７５８を有するプラスミドｐＡＲＣ４８９Ｂの約１１５０ｂｐのＮｃｏＩ－ＰｖｕＩＩ制限フラグメント内に存在するＤＮＡセグメントからなる群から選択され、エルウィニア・ヘルビコラの酵素ゲラニルゲラニル・ピロホスフェート・シンターゼの構造遺伝子を規定する少なくとも８５０ｂｐのヌクレオチド配列を含むＤＮＡセグメント；および（ｉｉ）請求項１～４のいずれか１項に記載のＤＮＡセグメントを含む、一つもしくはそれ以上の発現ベクターで形質転換された原核もしくは真核宿主細胞の培養を栄養培地中で開始し；そして
ｂ．該細胞がフィトエンを発現するために十分な時間、該培養を続ける；の各工程を含む方法。
【発明の詳細な説明】
発明の説明
（技術的分野）
本発明はカロテノイド生合成に関するものである。より具体的には、本発明は、ゲラニルゲラニルピロフォスフェート、およびカロテノイド類であるリコペン、β-カロテン、ゼアキサンチン、および、ゼアキサンチンジグルコシドの合成をそれぞれ触媒する酵素、ゲラニルゲラニルピロフォスフェート(GGPP)合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペン合成酵素、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼをコードするエルウィニア・ヘルビコラ(Erwinia herbicola)の6遺伝子の単離、解析、および発現に関するものであり、これらの合成産物(ゼアキサンチンまで)は次の化合物の直接の前駆体となる。本発明はまた、これらのエルウィニア・ヘルビコラの酵素遺伝子を、大腸菌(Escherichia coli)やアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)などの原核生物宿主、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)のような酵母などの真核生物宿主、アルファルファやタバコなどの高等植物で発現させる方法、および、GGPPやこれらのカロテノイドの調製法に関するものである。
(発明の背景)
カロテノイドは、通常8個のイソプレン(C_5)ユニットが繋がっている40炭素(C_{40})テルペノイドである。ユニットの連結は、分子の中心で逆になっている。通称および略号を本開示では使用し、最初に出て来た箇所で括弧でIUPACが推奨する半規則的な名称を示す。
カロテノイドは多様な用途のある色素である。

フィトエン(7,8,11,12,7',8',11',12'-ψ,ψ-カロテン)は、カロテノイド生合成経路における最初のカロテノイドであり、炭素数20の前駆体、ゲラニルゲラニルピロフォスフェート(GGPP)の2量体化によって生じる。フィトエンは皮膚疾患の治療に有効であり(米国特許第4,642,318号)、それ自身が有色カロテノイドの前駆体である。フィコマイセス・ブラケスレーアヌス(Phycomyces blakesleeanus) carBなどの、ある種の変異体を除いては、現在のところ、いかなる生物学的過程によってもフィトエンを産生する方法はない。

いくつかの生物種では、赤色カロテノイドであるリコペン(ψ,ψ-カロテン)が生合成経路においてフィトエンの次に産生される。例えば、リコペンは熟したトマトに特徴的な赤色を与える。

リコペンは食物の着色料として有用である。リコペンはいくつかの細菌、菌類、および緑色植物においては他のカロテノイドの生合成の中間産物でもある。

リコペンは水素8原子の除去による4回の連続的な脱水素反応によって、フィトエンから生合成が行われる。フィトエンから水素を除去する酵素はフィトエンデヒドロゲナーゼである。1種以上のフィトエンデヒドロゲナーゼがフィトエンからリコペンへの変換に用いられ、また、脱水素されたフィトエン中間産物の誘導物からリコペンへの変換も知られている。たとえば、ロドバクター・スファエロイデス(Rhodobacter sphaeroides)のある株はフィトエンから6個の水素原子を除去してニューロスポレンを産生する、フィトエンデヒドロゲナーゼを含む。

ここで注目するのは、のフィトエンをリコペンに変換する単一のデヒドロゲナーゼである。この酵素は1モルのフィトエンから4モルの水素を除去するものであり、以後フィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hと呼ぶ。1モルのフィトエンから3モルの水素を除去するロドバクターのフィトエンデヒドロゲナーゼは以後フィトエンデヒドロゲナーゼ-3Hと呼び、ここで述べる2つの酵素の区別が容易にできるようにする。

リコペンはいくつかの細菌、菌類、およびすべての緑色植物において、カロテノイドの生合成の中間産物である。普遍的な前駆体であるファルネシルピロフォスフェートからのリコペンの合成に用いられるカロテノイド特異的な遺伝子群には、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hのような酵素をコードするものが含まれている。

β-カロテンは、エルウィニア・ヘルビコラのカロテノイド生合成経路で3番目に産生されるカロテノイドである。これは、多くの細菌、菌類、およびほとんどの緑色植物でも合成される。

β-カロテンはマーガリンやバターの着色料、ビタミンA合成の材料に使用され、また、最近ある種の癌に対して阻害的な効果を持つことが示唆されている。

例えば、将来または過去を調べる疫学的研究により、血清または血漿中にβ-カロテンが含まれている量が少ないことが、肺癌の以後の進行と関連があることが常に示されてきた。レチノールは肺癌の危険性に同様には影響しないので、β-カロテンはビタミンAへの変換とは関係無く阻害的効果を示すことが明らかになった。A.ジーグラー(Ziegler)、Amer. Instit. Nutr.,出版022/3166/89、116 (1989)。

β-カロテンは、よく理解されていない方法で、不飽和カロテノイドの環状化によって産生される。ブラムレー(Bramley)ら、Current Topics in Cellular Regulation 29:291:297 (1988)中。リコペンを蓄積するがγ-カロテンは蓄積しない変異体のみしか得られていないことから、植物でも微生物出も、リコペンからβ-カロテンへの変換を担うのは単一のサイクラーゼであると考えられている。一般に、この環状化に関与する酵素は膜内在性タンパク質であることが見いだされている。

現在、β-カロテンを商業的に産生する方法には、ニンジンからの単離、化学合成(イスラー(Isler)ら、米国特許第2,917,539号(1959))、およびホアネフォラトリスポラ(hoanephora trispora)での微生物合成(ザジック(Zajic)、米国特許第2,959,521号(1960)および第3,128,236号(1964))が含まれる。

ゼアキサンチン(β,β-カロテン-3,3'-ジオール)は、エルウィニア・ヘルビコラのカロテノイド生合成経路で4番目に産生されるカロテノイドである。黄色の色素であるゼアキサ

ンチンは、現在、家禽業界で着色料として用いられている。
ゼアキサンチン産生の化学合成法は存在するが、効率が悪く、現在あるバイオマスによる方法とは商業的には競争力がない。目下のところ、ゼアキサンチンの商業的な材料はトウモロコシ殻粒、トウモロコシグルテン粗びき粉、マリーゴールドの花弁である。トウモロコシ殻粒中のゼアキサンチン量の平均は約0.001パーセント(乾燥重量)であり、トウモロコシグルテン粗びき粉中の平均は約0.01パーセント(乾燥重量)である。これらすべての材料は生産水準が低く一定しないことが特徴である。
ゼアキサンチンジグルコシドはエルウィニア・ヘルビコラのカロテノイド生合成経路で5番目に産生されるカロテノイドであり、食物の着色料としても有用でありゼアキサンチンと類似した黄色である。
カロテノイドは多様な細菌、菌類、藻類、および高等植物で合成される。現時点では、わずかに2、3の植物が商業的なカロテノイド産生のために広く用いられている。しかしながら、これらの植物におけるカロテノイド合成の生産性は比較的低く、カロテノイド産生には高額の費用がかかることになる。
生合成の生産能力を増加させる一つの方法は、組換えDNA技術を適用することである。したがって、組換えDNA技術によって、カロテノイド一般、およびゼアキサンチンとそのジグルコシドを特異的に産生させることが望ましい。これにより、質、量、および、最も適した、効率のよい産生用生物の選択の制御が可能になる。後者は商業的産生の経済性、したがって消費者に対する適用性に関して特に重要である。たとえば、大規模なファーメンターで培養するS.セレビシエなどの酵母、アルファルファやタバコなどの高等植物は、以下に述べるようにカロテノイド産生のために改変することができる。
カロテノイド合成が可能な生物、およびこのような試みに使用可能な遺伝子源はエルウィニア・ヘルビコラであり、この生物はカロテノイド産生のための遺伝子をプラスミド上(チリー(Thiry), J. Gen. Microbiol., 130: 1623 (1984))、あるいは染色体上(ペリー(Perry)ら、J. Bacteriol., 168: 607 (1986))に有すると考えられている。エルウィニア・ヘルビコラは通性嫌気性細菌である、腸内細菌科のグラム陰性細菌である。実際、最近公開されたヨーロッパ特許出願0 393 690 AI(1990年4月20日公開;以下、「EP 0 393 690」として引用する)で、エルウィニア・ウレドバラ(Erwinia uredovara)20D3 (ATCC19321)由来のDNAをカロテノイド分子の調製に使用することが報告されている。
以下で詳細に述べるように、本発明はカロテノイド分子の調製のため、エルウィニア・ヘルビコラEHO-10 (ATCC 39368)由来のDNAおよびその合成に用いられる酵素を利用する。ここで用いたエルウィニア・ヘルビコラEHO-10はエルウィニア・バルネリス(Erwinia vulneris)とも呼ばれる。
この属は通常3つの種に分類される。3つのうち、ヘルビコラ群は典型的にカロテノイドであることが示されている、黄色色素を形成する種(たとえばE.ヘルビコラ)を含む。
これらの細菌は、植物表面の腐蝕細菌として、また多くの植物病原菌による病変中の二次生物として存在する。これらはまた、土中、水中、およびヒトを含む動物の日和見病原菌としても見いだされる。
正確な生物体での機能は、エルウィニア・ヘルビコラに産生される色素からの情報にまだ頼らねばならない。ペリーら、J. Bacteriol., 168, 607(1986)は、その時点では知られていなかった黄色色素の産生に関与する遺伝子が少なくとも7種のポリペプチドをコードする約13キロベース(kb)の配列中に存在すること、および、その黄色色素の発現はサイクリックAMPに媒介されていることを示した。トゥベソン(Tuveson), J. Bacteriol., 170:4675 (1988)は、エルウィニア・ヘルビコラからクローニングされ、大腸菌株で発現させたこれらの遺伝子により、近紫外光および特定の光毒性分子による宿主の不活化に対するある程度の保護が与えられることを示した。
大腸菌およびS.セレビシエは外来遺伝子の発現に通常用いられるが、収量を最適化し、技術的な維持手段を最小限にとどめるためには、高等植物を用いることが望ましい。
(発明の概要)
本発明の一つの局面は、エルウィニア・ヘルビコラのGGPP合成酵素(DNA類似物も含む)、

フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼをコードする遺伝子のそれぞれを生物活性のある形で発現させることのできる構造遺伝子またはそれを改変したDNAを規定するヌクレオチド配列を含むDNA断片を単離することである。

本発明の別の局面は、エルウィニア・ヘルビコラから単離した上述の外来DNA断片または改変DNAを機能するような形で連結したベクターを含む組換えDNA分子である。この外来DNA断片は、上述のエルウィニア・ヘルビコラの酵素のいずれか一つを発現できる構造遺伝子をコードする。また、適合する宿主生物中で該酵素の発現を行わせるために適したプロモーターも含む。例えば、特に望ましいベクターとしては、プラスミドpARC417BH、pARC489B、pARC489D、pARC285、pARC140N、pARC145G、pARC496A、pARC146D、pATC228、pATC1616、pARC1509、pARC1510、pARC1520、pARC404BH、pARC406BH、pARC145H、およびpARC2019がある。

本発明のさらなる局面は、それぞれ上述のE.ヘルビコラ酵素を調製する方法である。この方法は栄養培地で、細胞と適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子で形質変換した原核生物または真核生物宿主細胞の培養を開始することを含む。このベクターは上述の酵素のいずれかをコードする構造遺伝子を規定するエルウィニア・ヘルビコラから単離された外来DNA断片またはその改変DNAが機能するように連結されている。この培養液は細胞が酵素を発現するのに十分な時間、維持される。

本発明のさらに別の局面は、直接の前駆体から望みの生産物を供給する原核生物または真核生物宿主細胞の栄養培地中において培養を開始させることを含む、GGPP、フィトエン、リコペン、β-カロテン、ゼアキサンチンおよび/またはゼアキサンチンジグルコシドを産生する方法であり、該原核生物または真核生物宿主細胞は前駆体を望みの産物に変換する酵素を発現できる構造遺伝子を含む、ここで述べた1種以上の組換えDNA分子で形質変換したものである。培養液は、宿主細胞が酵素を発現し、発現された酵素が与えられた前駆体を産物に変換するのに十分な期間維持する。組換えDNA分子は、(i)ゲラニルゲラニルピロフォスフェート合成酵素の構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列、(ii)フィトエン合成酵素の構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列、(iii)フィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列、(iv)リコペンサイクラーゼの構造遺伝子をを規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列、(v)β-カロテンヒドロキシラーゼの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列、および/または、(vi)ゼアキサンチングリコシラーゼの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列、を上述のように含む1種類以上のエルウィニア・ヘルビコラの外来DNAまたはその改変DNA断片が機能するように連結されている、宿主細胞に適合した発現ベクターを含む。培養液は、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)および/または(vi)の望みの構造遺伝子産物である酵素を細胞が発現し、望みの産物を形成するのに十分な期間、維持する。

本発明のさらに別の局面は、除草剤ノルフルラゾンからの高等植物の保護を行う方法である。ここで、保護される高等植物は、エルウィニア・ヘルビコラの酵素フィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの構造遺伝子をコードする組換えDNA分子または実質的に同じ生物活性を示す酵素をコードするそのDNA類似体で形質変換される。形質変換された植物は、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hが発現されるのに十分な時間維持し、形質変換した植物は除草用の量のノルフルラゾンで処理する。特に望ましい態様では、本発明で用いられるすべての組換えDNAはエルウィニア・ヘルビコラ由来のものである。本発明の別の望ましい態様では、上述の組換えDNA分子が用いられ、プロモーターは大腸菌に関してはRec7、S.セレビシエなどの酵母に関してはPGK、GAL10、およびGAL1、高等植物に関してはCaMV 35Sである。

そのほかの望ましい態様では上述の調製法があり、それにおいて形質変換された宿主は大腸菌などの原核生物、あるいはS.セレビシエなどの真核生物、アルファルファやタバコなどの高等植物のいずれかである。化学的な前駆体として、および効果的で明らかに無害な食物着色料としてのGGPPおよびカロテノイドの有用性のため、組換えDNA技術の助けによ

りトランスジェニックな生物材料から商業的に有効な量のこれらの物質を産生できることは、本発明から得られる主要な利益である。これらの利益を実現するため、上記の局面と態様を本発明で詳細に述べる。さらなる態様および発明の利点は、ここに含める開示全体を読むことにより、本分野の技術者には明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

第1図はプラスミドpARC376上にあるエルウィニア・ヘルビコラ遺伝子群を利用するカロテノイド生合成経路の流れ図である。

第2図は、第2-1図、第2-2図、および第2-3図からなり、ゲラニルゲラニルピロフォスフェート(GGPP)合成酵素の構造遺伝子の特定の望ましいDNA断片のヌクレオチド塩基配列である(SEQ ID NO:1)。塩基配列は慣習的に左から右に、5'末端から3'末端の向きに、1文字のヌクレオチド塩基コードを用いて示している。

ここで示した構造遺伝子の5'末端の読み枠は、ヌクレオチド配列の下の推測されるタンパク質のアミノ酸残基配列(SEQ ID NO:2)によって示されており、各アミノ酸残基に対応する3塩基のコドンの直下に各アミノ酸残基を示す3文字コードを示すようにしてある。DNA配列の右側の番号は、示したDNA配列中のヌクレオチド塩基の位置を示す。ここで図に示したすべての構造遺伝子は同様に示し、アミノ酸開始位置はここでは図に示すように約124番目のDNAの開始メチオニン残基(Met)から始まっている。

重要ないくつかの制限酵素部位をDNA配列上に示す。これらは酵素をコードする遺伝子構築操作における操作部位を表す。

第3図は第3-1図、第3-2図、および第3-3図からなり、より望ましい、構造が均一でないエルウィニア・ヘルビコラGGPP合成酵素のDNA(SEQ ID NO:3)と予想されるアミノ酸残基(SEQ ID NO:4)を示したものである。ここで、発現されたタンパク質は示した様に、約150番目のMet残基から開始され、プラスミドpARC489Bに存在するDNA構築物のEcoRV部位(約1153)の内側で終結するが、該遺伝子はプラスミドpARC489Dに存在するDNA構造内のBalI部位(約1002)で終結する。短いアミノ末端配列MetAlaGluPhe(約150-161)はpARC306Aではヘテロであり、第2図に示されるようにDNAの124から150位由来の天然の配列と置換されている。

第4図は第4-1図、第4-2図、第4-3図からなり、フィトエン合成酵素の構造遺伝子のヌクレオチド(SEQ ID NO:5)およびアミノ酸(SEQ ID NO:6)配列を示している。Met開始コドン(図示したように約16位)は第5図のpARC376の約6383位に対応する。第4図の約1093位のBamHI部位は第5図のpARC376の約5302位に対応する。図に示した約8位のBglII制限酵素部位は天然のDNAには存在せず、後で述べるように付け加えたものである。

第5図は、第1図で模式的に示したように、ファルネシルピロフォスフェートからカロテノイドを合成するのに必要とされる、大文字で示した完全な酵素遺伝子群を含むプラスミドpARC376を模式的に示している。転写の向き(矢印)は、逆向きに転写されるβ-カロテンヒドロキシラーゼ(F)を除いては、すべての酵素構造遺伝子に関して同じであることは注意を要する。重要な制限酵素部位も示してある。フィトエン合成はGGPP合成酵素(A)とフィトエン合成酵素(E)によって触媒される。Dで示した遺伝子はフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hをコードする。B、C、およびFで示した遺伝子はそれぞれゼアキサンチングリコシラーゼ、リコペンサイクラーゼ、およびβ-カロテンヒドロキシラーゼの各酵素をそれぞれコードしている。遺伝子EとFの重なり合った部分は斜線で示している。

第6図はRec7プロモーターを含むプラスミドpARC306Aの模式図である。このプラスミドはRec7プロモーターに隣接してマルチクローニング部位と、5'および3'転写終結ループを含む。制限酵素部位のおよその位置も示している。

第7図は、S.セレビシエのフォスフォグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーターをBglII部位に機能的に連結させたものを含むプラスミドpARC135を模式的に示したものである。プラスミド上の多様なそのほかの特徴も示している。

第8図は、部分的な制限酵素マップを含む、pSOC713ベクターを模式的に示したものである。

第9図は、部分的な制限酵素マップを含む、酵母で導入した遺伝子を発現させるための酵母/大腸菌シャトルベクターであるプラスミドpARC145Bを模式的に示したものである。

第10図は、ベクターpARC145Gの模式図であって、基本的には上述のpARC145Bであり、二つの望ましい遺伝子、すなわちGGPP合成酵素とフィトエン合成酵素の5'末端をそれぞれ逆向きのプロモーターGAL10とGAL1に、機能する形で連結したものである。フィトエン合成酵素は3'末端にPGKターミネーターも含む。
第11図は、第11-1図、第11-2図、第11-3図、第11-4図からなり、エルウィニア・ヘルビコラのフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの構造遺伝子のDNA(SEQ ID NO:7)と予想されるアミノ酸残基(SEQ ID NO:8)を示している。Metコドン(7位に示されている)は第5図のプラスミドpARC376の7849位に対応する。
第12図は、部分的な制限酵素マップを含む、ベクターpSOC925の模式図である。
第13図は、部分的な制限酵素マップを含む、プラスミドpARC146の模式図である。
第14図は、部分的な制限酵素マップを含む、プラスミドpARC146Dの模式図である。
第15図は、第15-1図、第15-2図、第15-3図、および第15-4図からなり、プラスミドpARC146D上にあるエルウィニア・ヘルビコラのフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの構造遺伝子のDNA(SEQ ID NO:9)および予想されるアミノ酸残基(SEQ ID NO:99)の配列を示している。
第16図は、部分的な制限酵素マップを含む、プラスミドpATC228の模式図である。この図では、A-Fは次の配列を模式的に示している:A=tacプロモーター、B=フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H遺伝子、C=pMB1 ori、D=アンピシリン耐性遺伝子、E=クロラムフェニコール耐性遺伝子、F=R1162 ori。
第17図は、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H酵素のタバコ葉緑体およびそのほかの植物の葉緑体への輸送のための、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H構造遺伝子の5'末端に連結させた輸送ペプチド(SEQ ID NO:98)、およびDNA(SEQ ID NO:10)の配列と、コード領域を示している。この配列中の69位と72位のヌクレオチドの上の星印は、NarI部位を導入するために用いたTからG、およびAからGへの置換を示している。
第18図は、部分的な制限酵素マップを含む、約15.6kbのプラスミドpATC1616の模式図である。この図では、A-Iは次の配列を模式的に示している:A=CaMV 35Sプロモーター、B=輸送ペプチド配列、C=フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H遺伝子、D=NOSポリアデニル化部位、E=pBR322 ori、F=ori T、G=テトラサイクリン耐性遺伝子、H=oriV、I=カナマイシン耐性遺伝子。
第19図は、第19-1図、第19-2図、および第19-3図からなり、エルウィニア・ヘルビコラのリコペンサイクラーゼ構造遺伝子のDNA(SEQ ID NO:11)、および予想されるアミノ酸残基(SEQ ID NO:13)の配列を示している。
Metコドン(19位に示されている)は、第5図のプラスミドpARC376の9002位に対応する。制限酵素部位SphIとBamHIをPCRを用いて遺伝子の5'および3'末端に導入した。酵母での発現に用いた、遺伝子操作を加えた遺伝子の配列(SEQ ID NO:12)の変化をもとの配列の下に太字で示している。遺伝子の5'末端の、もとの開始コドンGTGをATGコドンに改変した。2番目のアミノ酸残基Argは、もとはAGGコドンによってコードされていたが、Argアミノ酸残基をコードすることを保存したままCGGコドンに改変した。
第20図は、第20-1図、第20-2図、第20-3図はからなり、第5図に示されているpARC376の4886位から5861位までのDNA断片に対応する、β-カロテンヒドロキシラーゼの構造遺伝子を含む天然のエルウィニア・ヘルビコラDNA断片のDNA配列(SEQ ID NO:14)を示している。Met開始コドンは図示したように25位にあり、第5図の4991位に対応する。
第21図は、第21-1図、第21-2図、第21-3図からなり、エルウィニア・ヘルビコラの遺伝子操作したβ-カロテンヒドロキシラーゼの構造遺伝子のDNA(SEQ ID NO:15)および予想されるアミノ酸残基(SEQ ID NO:16)の配列を示している。Metコドン(25位に示されている)は、第5図のプラスミドpARC376上の4991位に対応する。制限酵素部位NcoIおよびSmaIが実施例21で述べられるように遺伝子の5'および3'末端に導入された。遺伝子操作を加えた遺伝子の配列の変化は太字で示している。遺伝子の5'末端で、天然の2番目および3番目の残基は-Leu-Val-から-Val-Leu-に改変された。
第22図は、1カ所しかない制限酵素部位を示している部分的な制限酵素マップを含む、プラスミドpARC300Eの模式図を示している。

第23図は、1カ所しかない制限酵素部位を示している部分的な制限酵素マップを含む、プラスミドpARC300Mの模式図を示している。
第24図は、1カ所しかない制限酵素部位を示している部分的な制限酵素マップを含む、プラスミドpARC300Tの模式図を示している。
第25図は、第25-1図、第25-2図、および第25-3図からなり、遺伝子操作したエルウィニア・ヘルビコラのゼアキサンチングリコシラーゼ構造遺伝子のDNA(SEQ ID NO:97)および予想されるアミノ酸残基(SEQ ID NO:17)の配列を示している。
(発明の詳細な説明)
A. 用語の定義
アミノ酸:ここで同定されているすべてのアミノ酸残基は天然のL-配置である。標準的なポリペプチド命名法、J. Biol. Chem. 243:3557-59, (1969)に従い、アミノ酸残基の略号は、以下の対応表に示したものを使用している。

対応表

シンボル		アミノ酸
1 文字	3 文字	
Y	Tyr	L-チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	L-フェニルアラニン
M	Met	L-メチオニン
A	Ala	L-アラニン
S	Ser	L-セリン
I	Ile	L-イソロイシン
L	Leu	L-ロイシン
T	Thr	L-スレオニン
V	Val	L-バリン
P	Pro	L-プロリン
K	Lys	L-リジン
H	His	L-ヒスチジン
Q	Gln	L-グルタミン
E	Glu	L-グルタミン酸
W	Trp	L-トリプトファン
R	Arg	L-アルギニン
D	Asp	L-アスパラギン酸
N	Asn	L-アスパラギン
C	Cys	L-システイン

すべてのアミノ酸残基配列はここでは、左から右への方向はアミノ末端からカルボキシ末端への慣習的な向きという法則によって示されている。
発現:構造遺伝子がポリペプチドを産生する際の転写および翻訳を含む、細胞内過程の組み合わせ。
発現ベクター:構造遺伝子が機能するように連結された場合に、該遺伝子の発現を制御する調節因子を形成しているDNA配列。
機能するように連結または挿入される:構造遺伝子が発現ベクターの制御下に置かれるように、発現ベクターなどの、別のDNA(あるいは適当な場合にはRNA)断片に構造遺伝子が正しい読み枠で共有結合で連結されること。
プロモーター:遺伝子の発現調節要素を与え、RNAポリメラーゼが特異的に結合し、その遺伝子のRNA合成(転写)を開始するDNA配列またはDNA配列群上の認識部位。
組換えDNA分子:通常は天然で共には見いだされない、少なくとも2つのヌクレオチド配列を含むハイブリッドDNA配列。
構造遺伝子:ポリペプチド、すなわちアミノ酸残基配列として発現されるDNA配列。
ベクター:細胞中で複製可能なDNA分子および/またはそれに別のDNA断片を複製が行われるように機能する形で連結させることができる。プラスミドはベクターの一例である。

B. 導入

色素のなかで最も広範な群を構成しているカロテノイドはすべての光合成生物に存在しており、光合成装置の不可欠な部分となっている。
すべてのテルペノイドの最初の特異的な前駆体であるメバロン酸(mevalonic acid)は、アセチル-CoAからHMG-CoA (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA)を介して合成され、それ自身は普遍的なイソプレン単位であるイソペンテニルピロフォスフェート(IPP)に変換される。IPPのジメチルアリルピロフォスフェートへの異性化、およびIPPを添加する一連の縮合反応の後、第1図の経路によってゲラニルゲラニルピロフォスフェート(GGPP)が形成される。GGPPの形成はカロテノイド生合成の第1段階である。
細菌エルウィニア・ヘルビコラでは、第1図に示すように2段階でフィトエンが生合成されることが見いだされている。最初の段階では、ファルネシルピロフォスフェート(FPP)とイソペンテニルピロフォスフェート(IPP)の縮合によりゲラニルゲラニルピロフォスフェート(GGPP)が形成される。この反応は酵素ゲラニルゲラニルピロフォスフェート合成酵素(GGPP合成酵素)によって触媒される。この第1段階の直後にテイル・トゥー・テイルのGGPPの2量化がフィトエン合成酵素の触媒によって行われ、フィトエンが形成される。したがって、この経路は、GGPPがプレフィトエンピロフォスフェート(シクロプロピレンを含む分子)を形成し、その後にフィトエンが形成されるという、公開されたヨーロッパ特許出願0 393 690号で報告されている経路とは異なっている。
リコペンはエルウィニア・ヘルビコラで産生される第2のカロテノイドであることが見いだされて居る。エルウィニア・ヘルビコラに産生される第3のカロテノイドは酵素リコペンサイクラーゼによる、リコペンの環状化で形成されるβ-カロテンである。エルウィニア・ヘルビコラ経路の4番目のカロテノイドは、β-カロテンから産生されるゼアキサンチンである。第5のカロテノイドであるゼアキサンチンジグルコシドはゼアキサンチンから産生される。
本発明はカロテノイド生合成経路のこれらの過程、この経路のカロテノイド生合成酵素をコードするエルウィニア・ヘルビコラの遺伝子を単離する方法、および、特に操作を加えなければこれらの物質を合成しないような宿主生物に、GGPPとカロテノイド産生の方法および可能性を、比較的少量または特殊化した局在で、実行するための組換えDNA技術によるこの経路の適用に関するものである。
以下の開示は、エルウィニア・ヘルビコラからのカロテノイド合成遺伝子の単離、これらの遺伝子の遺伝子操作、および大腸菌、酵母、菌類、高等植物におけるクローニングと発現に適合したプラスミドへのそれらの挿入の詳細な説明を与えるものである。また、適当な酵素の調製法およびこれらの多様な宿主中におけるGGPPとカロテノイド産生の方法も開示される。

プラスミド構築物は幾つかの宿主系に関して例証されている。しかしながら、本発明の遺伝子を使用する同様な構築物は、本分野でよく知られているように実質的にいかなる宿主系でも使用可能である。

本発明の構造遺伝子または単離され、精製されたDNA断片は、二つの制限酵素部位に挟まれ、しばしば列挙した塩基対数を含む制限断片として呼ばれる。本発明の構造遺伝子も、図中の配列およびそのような遺伝子の多様型(後述)を含むように定義され、該多様型遺伝子は以下で述べるストリンジェンシー条件下で図中の遺伝子とランダムではくハイブリダイズする。各問題の遺伝子はランダムにではなくハイブリダイズする多様型DNA配列を含み、特定の酵素をコードし、適当な宿主に適切に導入され、発現させた場合にもコードされた酵素の生物活性を持つ分子を産生する。

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションは、他の変数のなかでも、配列の同一性(相同性)、配列中のG＋C含量、緩衝液の塩濃度、配列の長さおよび2本鎖解離温度(Tm)の関数である。マニアティス(Maniatis)ら、Molecular Cloning,コールドスプリングハーバー研究所、コールドスプリングハーバー、N.Y. (1982)、388ページ参照。

同様な配列長の場合の、緩衝液塩濃度と温度は、ハイブリダイゼーション技術で配列同一性(相同性)を評価するのに有効な変数を与える。たとえば、少なくとも90パーセントの相同性がある場合には、ハイブリダイゼーションは20×SSCから希釈した6×SSCなどの緩衝塩液中で68℃で行われる(マニアティスら、上述、447頁)。サザンブロットの最終の洗浄に用いる緩衝塩液は低濃度、たとえば0.1×SSCで、また比較的高温、たとえば68℃で使用可能であり、2つの配列はハイブリッド2量体を形成するであろう。上述のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を併せて使用する場合、高ストリンジェンシー、または高ストリンジェンシー条件という。

2つの配列が少なくとも80パーセントの相同性を持つ場合には、適度に高いストリンジェンシー条件を用いることができる。ここで、ハイブリダイゼーションは6×SSCを用いて約50-55℃の温度で行う。最終の洗浄の塩濃度はおよそ1-3×SSCで約60-68℃の温度を用いる。これらのハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を適度に高いストリンジェンシー条件と呼ぶ。

低いストリンジェンシー条件は、少なくとも40パーセントの相同性が2つの配列に存在する場合のハイブリダイゼーションに用いることができる。ここで、ハイブリダイゼーションは6×SSCを用いて約40-50℃の温度で行い、最終の洗浄緩衝液の塩濃度は約6×SSCを約40-60℃の温度で非ランダムなハイブリダイゼーションを行わせる。これらのハイブリダイゼーションと洗浄条件を低いストリンジェンシー条件と呼ぶ。

図に示した遺伝子のDNA配列と少なくとも80パーセント、より望ましくは少なくとも90パーセント同一のヌクレオチド配列を含む、単離されたDNAまたはRNA断片は、本発明の期待するものである。このようなヌクレオチド配列は、ここで述べるようにプラスミドの一部として、または宿主ゲノムに内在化させることにより宿主細胞中に存在させると、これも少なくとも適度に高いストリンジェンシー条件で非ランダムにハイブリダイズし、これは生物活性のある酵素をコードし、発現するものであって、実質的に同一の生物活性を示す、図示した配列の多様型DNAとして考察する。

生きている生物中では、タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸残基配列は直接、タンパク質をコードする構造遺伝子のデオキシリボ核酸配列と、遺伝暗号を介して関連している。したがって、構造遺伝子は、それがコードするアミノ酸残基配列、すなわちタンパク質またはポリヌクレオチドによって規定され得る。

すなわち、よく知られている遺伝暗号の縮重により、同じアミノ酸残基配列をコードするさらなるDNAおよび対応するRNA配列を調製することが可能であり、しかしながら2つの配列は高いストリンジェンシーではハイブリダイズしないが、適度に高いストリンジェンシーではハイブリダイズする程度に、上述の遺伝子配列とは十分に異なっている。さらに、他のエルウィニア・ヘルビコラ株に、構造遺伝子のアリル多様体が存在する可能性もあり、これも有用であるが、適度に高いストリンジェンシーでのみハイブリッド2量体分子を形成する。

(1)図のDNA配列によって発現される酵素分子と同じ生物活性を実質的に示す酵素分子をコードしており、(2)少なくとも適度に高いストリンジェンシーでこれらの図のうちのひとつのDNA配列とハイブリダイズし、(3)これらの図のDNA配列と少なくとも80パーセント、より望ましくは少なくとも90パーセントの同一性を持つDNAまたはRNA配列は、多様型DNA配列として定義される。このように、DNA多様体または多様型DNA配列は、RNA配列を含むものとして定義される。

E.ヘルビコラとE.ウレドボラのDNA配列を比較すると、公開されたヨーロッパ特許出願0 393 690号は、E.ウレドボラ由来のDNAプローブは高ストリンジェンシー条件ではE.ヘルビコラ由来のDNAとハイブリダイズしないと報告している。現在の研究では、該公開されたヨーロッパ特許出願とここで開示する配列との同一性は約55パーセントから約70パーセントの範囲であることが示唆されており、β-カロテンヒドロキシラーゼの2つの遺伝子間の同一性は約65パーセントであった。45から30パーセントのミスマッチの塩基対があること、および高ストリンジェンシー条件でヘルビコラとウレドボラのDNAがハイブリダイズしなかったという報告から考えて、報告されたE.ウレドボラのDNA配列とここで述べるE.ヘルビコラのDNAは区別が可能であり、産生される類似の酵素は多様型ではない。

望みのGGPPまたはカロテノイド酵素をコードし、発現できる多様型DNA分子は、他の生物からハイブリダイゼーションおよび、ここで述べる機能的選択基準を用いて得ることができる。たとえば、カロテノイドを産生することが知られている、または示され得る微生物、菌類、藻類、または高等植物は、DNA源として用いられる。選択された生物の全DNAを抽出し、マニアティスら、Molecular Cloning,コールドスプリングハーバー研究所、コールドスプリングハーバー、N.Y. (1982) 270-294ページで述べられている方法を用いてλgt11などのλファージにゲノムライブラリーを構築する。

ファージライブラリーは次に、図のエルウィニア・ヘルビコラDNAの配列を持つニックトランスレーションを行って放射性標識したDNAプローブを用いて、標準的な手法で、適度に高い、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件でスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーション法により適当な構造遺伝子が同定されれば、本文中で述べるような、および分子生物学の技術者にはよく知られているような他の方法で、構造遺伝子DNA断片を単離し、塩基配列を決定し、適当な組換え分子で発現できるように遺伝子操作を行い、生物活性のある酵素を産生させることが可能である。

DNA配列多様体が“生物活性を持つ”酵素または“実質的に同一の生物活性”を持つ酵素をコードすることは、ここで述べるような酵素を多様体DNA配列が産生するかどうかによって決定される。したがって、GGPP合成酵素または与えられた前駆体基質分子を望みの産物に変換するカロテノイド生合成酵素を発現するDNA多様体配列は、生物活性を持つと定義される。生物活性のある酵素の、多様体DNA配列からの発現は、望みの産物の産生によりアッセイすることが可能である。

本発明のDNA断片は、したがって、図のエルウィニア・ヘルビコラのGGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、あるいはゼアキサンチングリコシラーゼをコードするDNA配列、または多様型DNAを含む。望ましい態様では、そのDNA断片は、他のいかなるカロテノイド合成酵素をコードする配列からも分離しているDNA断片中に酵素をコードするDNA配列を含む。より望ましくは、DNA断片は、エルウィニア・ヘルビコラGGPP合成酵素またはカロテノイド生合成酵素の構造遺伝子を含み、発現産物が望みのカロテノイドを消費する、あるいはカロテノイド産生を阻害するような機能的遺伝子とは分離されている。

C. GGPP およびカロテノイド生合成に関する酵素をコードする遺伝子群

1. カロテノイド遺伝子クラスターの単離

プラスミドpARC376は、ペリー(Perry)ら、J. Bacteriol. 168:607 (1986)によって細菌エルウィニア・ヘルビコラEHO-10(エシェリヒア バルネリス(Escherichia vulneris; ATCC 39368)から単離された約13kbの染色体DNA断片を含み、大腸菌に導入されると大腸菌細胞が黄色色素を産生するようにする。プラスミドpARC376は該論文の著者らにはプラスミドpPL376と呼ばれていた。pARC376の制限酵素地図は第5図に示されている。

色素の産生を担うプラスミド上の構造遺伝子は、第5図に示すように、制限酵素部位PstI(約4886位)とBglII(約12349位)で区切られている約7900塩基対のDNA断片上に存在する。大腸菌細胞にGGPPおよびカロテノイドのフィトエンからゼアキサンチンジグルコシドまでを産生させる、全部で6種の関連した遺伝子がこの約7900bp領域上に存在し、ゼアキサンチンジグルコシドはプラスミドpARC376に含まれるカロテノイド経路で同定されている最後の産物である。

ゼアキサンチンジグルコシドまでのカロテノイド産生の生合成経路を第1図に示す。大腸菌細胞、およびここで宿主として予測するすべての細胞は、天然にイソプレノイド中間産物であるファルネシルピロフォスフェート(FPP)を合成する。ゲラニルゲラニルピロフォスフェート(GGPP)合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼの遺伝子はpARC376の約7900bpのDNA断片内に位置している。プラスミドpARC376で形質変換した大腸菌細胞は、内在するFPPの一部を、プラスミドにコードされた酵素を用いてカロテノイドに変換することができる。

以下で述べるのは、GGPPおよびカロテノイド合成を担う本発明の遺伝子を含む、個々の構造遺伝子、および大腸菌、S.セレビシエなどの酵母、および高等植物でのカロテノイド生合成に関与するように行われた組換えDNA操作の説明である。

2. GGPP合成酵素遺伝子とプラスミド構築

a. DNA断片

エルウィニア・ヘルビコラのGGPP合成酵素の構造遺伝子およびそのDNA多様体を規定する少なくとも850塩基対のヌクレオチド配列を含む、単離され、精製されたDNA断片は、本発明で用いられる一つの構造遺伝子である。典型的な、有用なDNA断片は約850から約1150塩基対を含み、より望ましいDNA断片は約850から約1000塩基対を含む。天然の配列は約924bpを含む。より長いDNA断片も用いられるが、それについては後で述べる。

プラスミドpARC376のBglII部位(約12349)からEcoRV部位(約11196)までにわたる約1153bpの断片を、第5図に示す。GGPP合成酵素の望ましい構造遺伝子は、第5図に示された約1153bpのBglIIからEcoRV制限酵素断片内にあり、上述の約924bpの天然の構造遺伝子を含む。この構造遺伝子はプラスミドpARC417BHの約1030bpのNcoI-EcoRV制限酵素断片に含まれている。

驚くべきことに、天然の酵素のアミノ末端13残基を除去し、pARC306Aベクター由来の外来の4アミノ酸残基で置き換えたものである、アミノ末端が短いこの酵素をコードする組換え構造遺伝子は、天然のアミノ末端13残基をコードする領域を含む組換えで産生された酵素よりも活性が高かった(約2倍)。このより活性の高い酵素は、第3図に示された約1000bpを含むGGPP合成酵素の構造遺伝子をによってコードされ、プラスミドpARC489Bの約1150bpのNcoI-PvuII制限酵素断片に含まれている。

さらに驚くべきことには、GGPP合成酵素分子のカルボキシ末端を短縮することにより、酵素がさらに活性を強くした。したがって、3'BalI-EcoRV断片を除去した第3図のGGPP合成酵素の構造遺伝子の使用は、これまで得られたなかで最も活性の強いGGPP合成酵素を与えた。この約850bpの構造遺伝子は、pARC489Dの約1000bpのNcoI-PvuII制限酵素断片内にある。このGGPP合成酵素遺伝子は最もここで望ましいものである。上述の実験の詳細は以下で述べる。

EP 0 393 690の中で、E.ウレドボラ由来のDNA配列1は、そこではプレフィトエンピロフォスフェートからフィトエンへ変換するための遺伝子をコードしていると示されている。そのヨーロッパ出願のDNA配列は、ここで示すGGPP合成酵素と約59パーセントの同一性を持つ。このE. ウレドボラDNA配列1は、上述のGGPP合成酵素遺伝子の類似遺伝子であり、ここでGGPPを調製するために用いることも可能である。

b. 組換えDNA分子

本発明でまた有用なのは、上述のように、GGPP合成酵素を発現できる構造遺伝子を規定する外来のDNA断片、および、適合する宿主生物中の酵素をコードする遺伝子の発現を引き起こすのに重要なプロモーターをベクターに機能するように連結させた組換えDNA分子で

ある。ベクターとプロモーターは本出願の別の箇所で述べる。特に望ましいプラスミドベクターには、pARC417BH、pARC489B、pARC489D、およびpARC145Gが含まれる。

3．フィトエン合成酵素遺伝子とプラスミド構築

a．DNA断片

エルウィニア・ヘルビコラのフィトエン合成酵素の構造遺伝子を規定する少なくとも約927bpのヌクレオチドを含む単離し、精製したDNA断片およびそのDNA多様体も本発明でGGPPからのフィトエン産生に用いられる。この構造遺伝子は典型的には927bpの天然の配列を含む約1000から約1250bpを含むが、以下で述べるようにより長い断片を含むこともできる。フィトエン合成酵素の構造遺伝子は、プラスミドpARC376の6383位から5457位の間に位置する(第5図)。

ここで有用なフィトエン合成酵素は少なくとも第4図に示した配列を含む。望ましい態様では、構造遺伝子は、約8位(BglII部位)から約15位(NcoI部位)までの第4図に示した上流の配列も含む。

望ましいフィトエン合成酵素遺伝子は、プラスミドpARC285の約1112bp NcoI-EcoRI断片の中にある。この約1112bp断片の中に、望みの構造遺伝子をコードする約1040bp NcoI-BamHI断片も含まれている。

最も望ましい構造遺伝子は、第4図の約8位から約15位と約841位から約1040位までのヌクレオチド塩基配列を含み、約1090bpを含んでいる。この最も望ましい遺伝子は、pARC140Nの約1176bpのHpaIからBamHI制限酵素断片および約1238bpPvuII-EcoRI断片に含まれ、また、プラスミドpARC140Rの約1088bp BglII-EcoRI断片にも含まれている。

b．組換えDNA分子

上述のようにフィトエン合成酵素を発現できる構造遺伝子を規定する外来のDNA断片を機能するような形で連結したベクター、適合する宿主生物中で遺伝子の発現を引き起こすのに適したプロモーターを含む、組換えDNA分子も本発明で有用である。この組換え分子のベクターおよびプロモーターもここで述べられるものである。特に望ましいプラスミドベクターには、pARC285、pARC140N、pARC145Gが含まれる。

4．フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H遺伝子とプラスミド構築

a．DNA断片

本発明の別のDNA断片は、エルウィニア・ヘルビコラの酵素フィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hを発現できる構造遺伝子を規定する配列を含む少なくとも約1470bpを含むヌクレオチド配列を含む単離されたDNA断片およびそのDNA多様体も、本発明の別のDNA断片である。酵素フィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hはフィトエンをリコペンに変化する。このフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hは約51,000ダルトンの分子量を持つ。天然のフィトエンデヒドロゲナーゼ-4H構造遺伝子は、約1470bpを含み、プラスミドpARC376の7849位から6380位の間に位置する。

典型的な、有用なDNA断片は、第5図に示されたpARC376由来の約1891bp AvaI(8231)からNcoI(6342)DNA断片中に存在する。以下で述べるように、より長いDNA断片も用いられる。

望ましいDNA断片は、第11図に示した約15位から約1470位までのヌクレオチド塩基配列を含む。特に望ましいDNA断片は、第11-1図の約5位の操作を加えたNcoI部位(開始Met残基)と、第11-4図の約1470位の間の塩基を含み、プラスミドpARC496Aの約1505bp NcoI-NcoI制限酵素断片(NcoI断片)、プラスミドpARC146Dの約1508bp SalI-SalI制限酵素断片(SalI断片)、および、プラスミドpATC228に存在する約1506bp SphI-NcoI断片に存在する。約1508bp SalI断片の配列を第15図に示す。

さらに特に望ましいDNA断片は、プラスミドpATC1616に存在する約2450bp XbaI-XbaI断片である。この断片は、上述の約1506bpのSphI-NcoIフィトエンデヒドロゲナーゼ-4H遺伝子の5'末端に正しい読み枠で機能するように連結されている、タバコ　リブロースビスフォスフェートカルボキシラーゼ-オキシゲナーゼの葉緑体輸送ペプチド(以下、葉緑体輸送ペプチドと呼ぶ)(約177bp)をコードする約1683bpの部分を含む。この約1683bpの断片はその5'末端が約450bp CaMV 35Sプロモーター配列に、その3'末端は約300bpのNOSポリアデニル化配列が隣接している。

このDNA断片は、高等植物でのフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの発現、およびタバコなどで発現されたフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの葉緑体への輸送に使用できる。タバコなどの高等植物にプラスミドpATC1616を含むA.ツメファシエンスを感染させると、プロモーター、輸送ペプチド-フィトエンデヒドロゲナーゼ-4HおよびNOS配列のDNAがゲノムに取り込まれ、得られた植物を除草剤ノルフルラゾン耐性にする。

5'と3'末端の双方に同じ制限酵素切断配列がある制限酵素断片はしばしば単一の制御酵素で呼ばれることに注意すること。したがって、上で約1505bpのNcoI-NcoI制限酵素断片と呼ばれているものは、ここでは1505bp NcoI断片とも呼ばれる。同様に、約1508bpのSalI-SalI断片は、約1508bp SalI断片とも呼ばれ、約2450bp XbaI-XbaI断片は約2450bp XbaI断片とも呼ばれる。

b. 組換えDNA分子

上述のようにフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hを発現できる構造遺伝子を規定する外来のDNA断片を機能するような形で連結したベクター、適合する宿主生物中で遺伝子の発現を引き起こすのに適したプロモーターを含む、組換えDNA分子も本発明で有用である。構造遺伝子は上述のヌクレオチド塩基配列を持つ。特に望ましいプラスミドは、pARC496A、pARC146D、pATC228、およびpATC1616である。

5. リコペンサイクラーゼ遺伝子とプラスミド構築

a. DNA断片

エルウィニア・ヘルビコラの酵素リコペンサイクラーゼを発現する構造遺伝子を規定する配列を含む少なくとも1125塩基対を含むヌクレオチド配列を含む単離されたDNA断片およびそのDNA多様体も本発明で使用される。この酵素リコペンサイクラーゼは約39,000ダルトンの分子量を持ち、リコペンをβ-カロテンに変換する。典型的な、有用なDNA断片は少なくとも1125bpを含み、望ましくは少なくとも1150bpを含み、第5図に示されたプラスミドpARC376由来の約1548bp SalI(9340)からPstI(7792)DNA断片内にある。エルウィニア・ヘルビコラのリコペンサイクラーゼの天然の構造遺伝子は、約1125塩基対を含み、プラスミドpARC376の9002位から7878位の間に位置する。より長いDNA断片も以下に述べるように、使用される。

望ましいDNA断片は、第19図のパネル1および2に示されているように、約1位から1222位までのヌクレオチド塩基配列を含む。約1140bpのより望ましい配列はプラスミドpARC1509の約1142bp SphI-BamHI制限酵素断片に存在し、第19図に示されている。

さらに特に望ましいDNA断片は、約1319bpのNcoI-BamHI断片である。この断片は上述のSphI-BamHI 1142bpリコペンサイクラーゼ遺伝子の5'末端に正しい読み枠で機能するように連結されている、葉緑体輸送ペプチドをコードする部分約177bpを含んでいる。このDNA断片は、高等植物でのリコペンサイクラーゼの発現、および発現されたリコペンサイクラーゼのタバコなどの葉緑体への輸送に用いることができる。

b. 組換えDNA分子

上述のようにリコペンサイクラーゼを発現できる構造遺伝子を規定する外来のDNA断片を機能するような形で連結したベクター、適合する宿主生物中で遺伝子の発現を引き起こすのに適したプロモーターを含む、組換えDNA分子も本発明で有用である。構造遺伝子は上述のヌクレオチド塩基配列を持つ。特に望ましいプラスミドは、pARC1510、pARC1520、およびpARC1509である。

6. β-カロテンヒドロキシラーゼ遺伝子とプラスミド構築

a. DNA断片

エルウィニア・ヘルビコラの、ゼアキサンチンを合成する酵素β-カロテンヒドロキシラーゼを発現する構造遺伝子を規定する配列を含む少なくとも531塩基対、より望ましくは約878塩基対を含むヌクレオチド配列を含む単離されたDNA断片およびそのDNA多様体も本発明で使用される。天然の酵素は、プラスミドpARC376の4991位から5521位の間にコードされている。

一つのヌクレオチド塩基配列は、第20図の約1位からSmaI部位の約894位までに対応し、望ましくは1位から752位に対応する。より望ましくは、用いられるDNA断片は第21図に示さ

れている25位から897位までのものである。後者の配列はプラスミドpARC406BHに含まれる約87-bp NcoIからSmaIのDNA断片からなる。使用されるDNA断片は、第5図に示したプラスミドpARC376の約870塩基対の(4991)から(5861)DNA断片内に存在する。
さらに特に望ましいDNA断片は、次の遺伝子配列から構成されている約1797bpを含むXbaI-XbaI断片である:(a)約450bp CaMV 35Sプロモーター、(b)葉緑体輸送ペプチドをコードする177bpの配列で、次の(c)の5'末端に正しい読み枠で機能するように連結されているもの、(c)約870bpのβ-カロテンヒドロキシラーゼ遺伝子、および(d)約300bpのNOSポリアデニル化配列。このXbaI断片はプラスミドpGA482にクローニングすることができ、得られたプラスミドはA.ツメファシエンスの形質変換に用いられる。得られた、形質変換されたA.ツメファシエンスは次に、タバコなどの高等植物の形質変換に用いられ、その場合、輸送ペプチドが連結した酵素が発現され、ゼアキサンチン産生のために葉緑体に輸送される。
b. 組換えDNA分子
上述のようにエルウィニア・ヘルビコラの酵素β-カロテンヒドロキシラーゼを発現できる構造遺伝子を規定する外来のDNA断片を機能するような形で連結したベクター、適合する宿主生物中で遺伝子の発現を引き起こすのに適したプロモーターを含む、組換えDNA分子も本発明で有用である。構造遺伝子は上述のヌクレオチド塩基配列を持つ。特に望ましい組換えDNA分子には、約874bp NcoI-SmaI断片を含む大腸菌プラスミドpARC404BH、同じ制限酵素断片を持ちRec7プロモーターで制御される大腸菌プラスミドpARC406BH、および、GAL1またはGAL10の制御下、またはPGKの制御下にありURA3で終結するβ-カロテンヒドロキシラーゼを、およびGAL1およびGAL10プロモーターの制御によりGGPP合成酵素およびフィトエン合成酵素をS.セレビシエで発現させるように考案されたプラスミドpARC145Hが含まれる。7. ゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子とプラスミド構築
a. DNA断片
エルウィニア・ヘルビコラの、ゼアキサンチンジグルコシドを合成する酵素ゼアキサンチングリコシラーゼを発現する構造遺伝子を規定する配列を含む少なくとも531塩基対、より望ましくは約1200塩基対を含むヌクレオチド配列を含む単離されたDNA断片およびそのDNA多様体も本発明で使用される。天然のエルウィニア・ヘルビコラのDNA配列は、プラスミドpARC376の10232位から9033位の間にコードされている。ゼアキサンチングリコシラーゼをコードする望ましいDNA断片は、プラスミドpARC2019の約1390bpのNdeI-AvaI断片である。E.ヘルビコラの構造遺伝子のDNA配列は第25図に示されている(SEQ ID NO:97)。
さらに特に望ましいDNA断片は、次の遺伝子配列によって構成される約2127bpを含むXbaI-XbaI断片中にある:(a)約450bpのCaMV 35Sプロモーター、(b)次の(c)の5’末端に正しい読み枠で機能するように連結されている、葉緑体輸送ペプチドをコードする177bpの配列、(c)約1200bpのゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子、および(d)約300bpのNOSポリアデニル化配列。このXbaI断片はプラスミドpGA482にクローニングすることができ、得られたプラスミドはA.ツメファシエンスの形質変換に用いられる。得られた、形質変換されたA.ツメファシエンスは次に、タバコなどの高等植物の形質変換に用いられ、その場合、輸送ペプチドが連結した酵素が発現され、ゼアキサンチンジグルコシド産生のために葉緑体に輸送される。
b. 組換えDNA分子
上述のようにエルウィニア・ヘルビコラの酵素ゼアキサンチングリコシラーゼを発現できる構造遺伝子を規定する外来のDNA断片を機能するような形で連結したベクター、適合する宿主生物中で遺伝子の発現を引き起こすのに適したプロモーターを含む、組換えDNA分子も本発明で有用である。構造遺伝子は上述のヌクレオチド塩酸配列を持つ。特に望ましい組換えDNA分子には、約1390bp NdeI-AvaI断片を含む大腸菌プラスミドpARC2019、Rec7プロモーターで制御される大腸菌プラスミド、および、GAL1、GAL10、またはPGKの制御下でゼアキサンチングリコシラーゼが発現されるようにに考案されたプラスミドが含まれる。
8. DNAサイズ
前述のDNA断片は最小長、および全長を持つものとして記載してある。最小長は特定のタ

ンパク質酵素をコードする配列を持つDNA断片の長さとして定義される。ここで開示した6種の遺伝子のそれぞれのコード配列が添付の図に示されているので、遺伝子の最初のATGコドンから始まり、各遺伝子の終始コドンまたはその直下で終わる、単離されたDNA断片およびその多様体を、実施例で述べるように、in vitroミュータジェネシスによって調製することができる。したがって、望みの制限酵素部位を開始コドンの部位あるいはその上流に、および終止コドンの部位またはその下流に遺伝子操作で導入し、上述のほとんどのものより短い構造遺伝子を調製し、切断し、単離することができるようになる。

本分野ではよく知られているように、必要なDNA配列が存在するかぎり、(開始および終止シグナルを含み)、さらなる塩基対をその断片のどちらの末端にも付け加えることが可能であり、その断片はそれでもタンパク質の発現に使用することができる。これはもちろん、機能するように連結されているDNA配列断片中に、発現を抑制するもの、発現されるべき望みの酵素を消費するさらなる産物を発現すること、望みの酵素に産生される目的の産物を消費する産物を発現すること、あるいはDNA断片の構造遺伝子を阻害することがないということを仮定している。

したがって、DNA断片がこのような阻害的なDNA配列を持たない限りは、本発明のDNA断片は2.000-15,000塩基対の長さをとり得る。組換えDNA分子、特に発現ベクターの最大長は、望ましい場合には、複製及び発現に必要な最小DNA配列すべてが存在すれば、主に簡便性と、宿主細胞に受け入れられるベクターの長さに支配される。最小のベクターサイズはよく知られている。このような長いDNA断片は望ましくないが、使用することはできる。

実施例4bはGGPP合成酵素とフィトエン合成酵素の構造遺伝子を含む数千塩基対のDNA断片をフィトエンの産生に使用できることを示している。実施例9bに見られるようにフィトエンデヒドロゲナーゼ-4H産生の場合にも同じ状況である。実施例9bで用いたDNA断片は、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、及びフィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼの遺伝子、およびゼアキサンチン産生のための他の構造遺伝子を含む。しかしながら、リコペンを利用するリコペンサイクラーゼの遺伝子は、機能するリコペンサイクラーゼが産生されずリコペンが蓄積するように、弱められた。同様な状況は実施例16bで述べられており、それにおいてプラスミドpARC376上にもともと存在するβ-カロテンヒドロキシラーゼが機能しないようにしたところ、β-カロテンが蓄積することが見いだされた。

9. プラスミドの構築

b. DNA断片

前述の酵素タンパク質をコードするDNA断片は、例えば、マテウチ(Matteucci)ら、J. Am. Chem. Soc.,103:3185 (1981)のフォスフォトリエステル法などの化学的方法によって合成することができる。(ここで引用した技術の開示はここに参考として含める。)もちろん、化学的にコード配列を合成することにより、天然のアミノ酸残基配列をコードする配列の適当な塩基を置換することにより、簡単にいかなる望みの修飾も行うことができる。しかしながら、前に述べた配列を含むDNA断片が望ましい。

さらに、酵素タンパク質を含む構造遺伝子を含むDNA断片は、これらの遺伝子を含む組換えDNA分子(プラスミドベクター)から得ることができる。例えば、プラスミド型の組換えDNA分子pARC417BH、pARC489B、pARC489C、pARC285、およびpARC140Nはそれぞれ GGPP合成酵素とフィトエン合成酵素タンパク質の異なる部分をコードするDNA配列を含み、いずれかのタンパク質を生物活性のある形で発現するのに必要なDNA配列を完全に持つ。プラスミドpARC145Gは両方の酵素をコードするDNA断片を含む。さらに、プラスミド型の組換えDNA分子pARC496A、pARC146D、pATC228、およびpATC1616はそれぞれ、生物活性を持つフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hタンパク質をコードするDNA配列を含む。同様に、プラスミド型組換えDNA分子pARC1509、pARC1510、およびpARC1520はそれぞれ生物活性を持つリコペンサイクラーゼタンパク質をコードするDNA配列を持つ。また、プラスミド型組換えDNA分子pARC404BH、pARC406BH、およびpARC145Hはそれぞれ、生物活性を持つβ-カロテンヒドロキシラーゼタンパク質をコードするDNA配列を含み、プラスミドpARC2019は生物活性を持つゼアキサンチングリコシラーゼをコードするDNA配列を含む。

プラスミドpARC417BH、pARC489B、pARC489D、pARC285、pARC140N、およびpARAC145Gは、ブダペスト条約に従い、1990年2月26日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(12301、パークローン・ドライブ、ロックビル、MD 20852)に寄託され、それぞれ受託番号として40755、40758、40757、40756、40759、および40753が与えられた。プラスミドpARC496A、pARC146D、pATC228は、ブダペスト条約に従い、1990年5月11日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(12301、パークローン・ドライブ、ロックビル、MD 20852)に寄託し、それぞれ受託番号として40803、40801、および40802で登録された。プラスミドpATC1616は同様に1990年5月15日に寄託され、受託番号40806として登録された。また、プラスミドpARC1509、pARC1510およびpARC1520はブダペスト条約に従い、1990年7月27日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(12301、パークローン・ドライブ、ロックビル、MD 20852)に寄託し、それぞれ受託番号として40850、40851、および40852として登録された。プラスミドpARC404BH、pARC406BH、およびpARC145Hは同様に1991年1月16日に寄託され、ATCC受託番号40943、40945、および40944としてそれぞれ登録された。プラスミドpARC2019もブダペスト条約にしたがって1991年2月13日に寄託され、ATCC受託番号40974を与えられた。

ゼアキサンチングリコシラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、リコペンサイクラーゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、GGPP合成酵素、およびフィトエン合成酵素をコードするDNA配列を含むDNA断片は、既知の方法を用いて、上述の寄託されたプラスミドの各々由来の適当な制限酵素断片を切り出し、機能するように連結することによって調製可能である。この方法で作製された本発明のDNA分子は、典型的には粘着末端、すなわち、分子の二本鎖部分から“突出した”一本鎖部分を持つ。平滑末端を持つ分子も使用可能ではあるが、本発明のDNA分子に粘着末端が存在することが望ましい。

上述のDNA断片に対応するリボ核酸(RNA)も使用される。

c. 組換えDNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片を機能するような形でベクターに連結させて上述の寄託したものなどのプラスミドを形成させることによって作製される。特に望ましい組換えDNA分子は以下の実施例で詳細に述べる。GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼおよび/またはゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子の発現を行わせることのできるベクターは、ここで“発現ベクター”と呼ぶ。

上述の発現ベクターは、プロモーターを含む発現調節因子を含んでいる。ポリペプチドをコードする遺伝子は、プロモーター配列がRNAポリメラーゼの結合および望みのポリペプチドをコードする遺伝子の発現が行われるように、機能できるような形で発現ベクターに連結される。ポリペプチドをコードする遺伝子の発現に有用なのは、ポツコウスキー(Poszkowski)ら、EMBO J.,3:2719 (1989)およびオデール(Odell)ら、Nature, 313:810 (1985)に記載されているような誘導可能な、ウイルス性、合成、構成的なプロモーター、および、チュア(Chua)ら、Science, 244:174-181 (1989)が示したような、時間的制御、空間的制御、および時間-空間的制御をうけるプロモーターである。

どの発現ベクター、そして究極的にはどのプロモーターにポリペプチドをコードする遺伝子を機能するように連結するかという選択は、望まれる機能的な性質、例えばタンパク質発現の位置および時期、および形質変換される宿主細胞に直接依存する。組換えDNA分子を構築する技術には、本来備わっている、既知の制約がある。しかしながら、本発明の実施に有用なベクターは、ポリペプチドをコードする遺伝子が機能する形でDNA断片に連結されているならば、その複製、および望ましくは発現も(発現ベクターの場合)を行うことができる。

望ましい態様の一つでは、ベクターは原核生物のレプリコン、すなわち、それが原核生物宿主細胞に染色体外の形質変換がなされると、組換えDNA分子の自律複製および維持がなされるという能力を持つDNA配列を含む。このようなレプリコンは本分野ではよく知られている。

原核生物のレプリコンを含むこれらのベクターも、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、

フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、またはゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子が、形質変換された場合に大腸菌などの宿主細胞で発現を行わせることのできる原核生物プロモーター領域を含むこともできる。細菌宿主と適合性のあるプロモーター配列は、典型的には、本発明のDNA断片の挿入のための一つ以上の便利な制限酵素部位を含むプラスミドベクター内に与えられる。このようなベクタープラスミドの典型的なものは、バイオラッド・ラボラトリーズ社(リッチモンド、CA)から入手可能なpUC8、pUC9、およびpBR329、また、ファルマシア社(ピスカタウェイ、NJ)から入手可能なpPL、およびpKK223-3がある。大腸菌などの原核生物細胞で用いるのに特に望ましいプロモーターは、プラスミドベクターpARC306A、pARC496A、およびpARC136に存在するRec7プロモーターであり、外から与えたナリジキシン酸によって転写誘導される。

真核生物と適合する発現ベクター、望ましくは酵母細胞と適合するもの、さらに望ましくは高等植物細胞と適合するものもここで用いることができる。このような発現ベクターは、本発明の組換えDNA分子を形成させるためにも使用可能である。S.セレビシエなどの酵母で使用するためのベクターは、よく知られているように、エピソーム系または挿入用のものを使用することができる。真核生物細胞の発現ベクターは本分野ではよく知られており、いくつかの業者から入手可能である。

通常は、このようなベクターは望みのDNA断片とプロモーター配列の挿入のために一つ以上の便利な制限酵素部位を含む。S.セレビシエで使用されるプロモーターの例としては、S.セレビシエのフォスフォグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター、および逆方向に配置されたプロモーターGAL10とGAL1が含まれる。

高等植物で遺伝子を発現させるのに有用な、典型的なベクターは本分野ではよく知られており、ロジャーズ(Rogers)ら、Meth. in Enzymol.,153:253-277(1987)に記述された、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)の腫瘍誘導(Ti)プラスミド由来のベクターが含まれる。しかしながら、フロム(Fromm)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:5824 (1985)に報告された、pCaMVCN転移調節ベクターを含む、いくつかの他の発現ベクター系も植物で機能していることが知られている。プラスミドpCaMVCN(ファルマシア社、ピスカタウェイ、NJから入手可能)は、カリフラワーモザイクウイルスCaMV 35Sプロモーターを含む。遺伝子の高等植物への導入は、以下で詳細に述べる。

本発明の組換えDNAを作製するために、レトロウイルスの発現ベクターも使用される。ここで用いる場合、“レトロウイルス発現ベクター”とは、レトロウイルスゲノムのロング・ターミナル・リピート(LTR)領域由来のプロモーター配列を含むDNA分子をいう。

これらのカロテノイド産物の幾つかは、食物生産および着色に関連しているので、レトロウイルス発現ベクターは真核生物細胞内で複製不能なものが望ましい。レトロウイルスベクターの構築とその使用は、バーマ(Verma)、PCT出願第WO87/00551号、およびクッキング(Cocking)ら、Science, 236:1259-62 (1987)に記載されている。

望ましい態様では、ポリペプチドをコードする遺伝子を発現させるのに用いるベクターは、植物細胞中で効果的である選択マーカー、望ましくは薬剤耐性選択マーカーを含む。望ましい薬剤耐性マーカーの一つは、その遺伝子の発現によりカナマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ロジャーズら、Methods For Plant Molecular Biology(A.ワイスバッハ(Weissbach)とH.ワイスバッ編集、アカデミックプレス社、サンディエゴ、CA(1988)に記載されている、ノパリン合成酵素プロモーター、Tn5ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼII、およびノパリン合成酵素の3'非翻訳領域を含むキメラ遺伝子である。別の望ましいマーカーは、トランスポゾンTh9由来の、アッセイ可能なクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(cat)遺伝子である。

相補的な粘着末端または平滑末端を介して、ベクターにDNAを機能できるように連結させるための多様な方法が開発されている。例えば、相補的なホモポリマー領域をDNA断片に結合させて、ベクターDNAに挿入することが可能である。次に、ベクターとDNA断片を相補的ホモポリマーテイルの間で水素結合によりつなげ、組換えDNA分子を形成させる。

あるいは1種類以上の制限酵素部位を含む合成リンカーを用いてDNA断片を発現ベクターに

連結させることもできる。バクテリオファージT4 DNAリガーゼなどの、平滑末端の連結反応を触媒できる酵素の存在下で、平滑末端のDNA断片を大過剰量の合成リンカーとインキュベートすることによって、合成リンカーを平滑末端のDNA断片につなげる。このように、反応産物は、それぞれの末端に合成リンカーを持つDNA断片である。これらのDNA断片を適当な制限酵素で切断し、合成リンカーの末端と適合する部位をつくる酵素で切断しておいた発現ベクターに連結する。多様な制限酵素部位を含む合成リンカーは、ニュー・イングランド・バイオラブス(ベバリー、MA)を含む多数の販売会社から商業的に入手することができる。

本発明でさらに使用されるのは、上述の組換えDNA分子の対応物であるRNAである。

d. 高等植物への遺伝子の導入

ポリペプチドをコードする遺伝子を、多細胞高等植物に導入する方法は、アグロバクテリウムを媒介した植物形質変換、プロトプラスト形質変換、花粉への遺伝子導入、生殖器官への注射、および未成熟胚への注射が含まれる。これらの方法はそれぞれ異なる利点、欠点を持つ。したがって、ある植物種に遺伝子を導入するある特定の方法が他の植物種でも最も効果的であるとは限らないが、特定の植物種に有効な方法はよく知られている。

アグロバクテリウムを介した遺伝子転移は、DNAが植物組織全体に導入されるので、植物への遺伝子導入に広く適した系であって、それによってプロトプラストからの完全な植物への再生の必要がバイパスされる。アグロバクテリウム媒介発現ベクターの植物細胞へのDNA導入のための使用は、本分野ではよく知られている。たとえば、フラリー(Fraley)ら、Biotechnology, 3:629 (1985)、およびロジャーズら、Methods in Enzymology, 153:253-277 (1987)を参照のこと。さらに、Ti-DNAの挿入はほとんど再構成が行われない、比較的正確な方法である。導入されるDNA領域は境界配列によって規定され、シュピールマン(Spielmann)ら、Mol. Gen. Genet., 205:34 (1986)およびジョルゲンセン(Jorgensen)ら、Mol. Gen. Genet., 207:471 (1987)に示されているように、介在DNAを通常は植物ゲノムに挿入される。

細菌のアグロバクテリウム形質変換ベクターは、大腸菌でもアグロバクテリウムでも複製可能であり、クレー(Klee)ら、Plant DNA Infectious Agents, T.ホーン(Hohn)とJ.シェル(Schell)編集、シュプリンガー-フェルラグ、ニューヨーク(1985) pp.179-203で述べられているように、容易に操作が加えられる。

さらに、アグロバクテリウム媒介遺伝子導入のためのベクターに関する最近の技術的な進歩により、多様なポリペプチドをコードする遺伝子を発現させられるベクターの構築を容易にするために、ベクター中の遺伝子の配置と制限酵素部位が改善された。ロジャーズら、Methods in Enzymology, 153:253(1987)に述べられたベクターは、挿入されたポリペプチドをコードする遺伝子の直接の発現のため、プロモーターおよびポリアデニル化部位に隣接した便利なマルチリンカー部位を持ち、本発明の目的に適している。

アグロバクテリウム媒介形質変換が効果的であるこれらの植物種において、遺伝子導入の容易さと明らかにされている性質から、この方法が推薦される。しかしながら、バイテビア(Bytebier)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84:5345(1987)で述べられているように、アグロバクテリウムベクターを用いてアスパラガスのトランスジェニック植物は作製されたが、アグロバクテリウムの天然の宿主として単子葉植物はほとんどない。したがって、コメ、トウモロコシ、およびコムギなどの商業的に重要な穀物の場合には別の方法で形質変換を行わなければならない。

高等植物はカロテノイドを産生する能力を持つ。すべての植物でカロテノイド合成は葉緑体で行われる。カロテノイド生合成は植物内で高度に制御されている。マソナー(Masoner)ら、Planta 105:267 (1972);フォロシュ(Frosch)ら、Planta、148:279(1980);モーア(Mohr)、Photosysnthesis V. Chloroplast Development,pp.869-883(1981);エールミューラー(Oelmueller)ら、Planta 164:390(1985);ハープスター(Harpster)ら、Physiol. Plant. 64:147(1985);シュタインミューラー(Steinmueller)ら、Molecular Form and Function of the Plant Genome, pp.277-290(1986)。したがって、組換えDNA技術を内在性のカロテノイド生合成を増大させるために利用できる可能性は、新しいアプローチを用いない限り

疑問である。しかしながら、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼの遺伝子を用いて、細胞質中でゼアキサンチンおよびゼアキサンチンジグルコシド合成を誘導することは、天然にはカロテノイドは細胞質で合成されないとしても、可能性のあるアプローチである。

植物の葉ディスクや他の組織へのアグロバクテリウム介在形質変換は、アグロバクテリウムが天然に感染する植物種に限定される。したがって、アグロバクテリウム介在形質変換が最も効果的なのは双子葉植物である。しかしながら、上述のように、アグロバクテリウムを用いたアスパラガスの形質変換も行うことができる。例えば、バイテビアら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:5345(1987)参照。

植物プロトプラストの形質変換は、リン酸カルシウム沈澱、ポリエチレングリコール処理、エレクトロポレーション、およびこれらの組み合わせによって行われる。例えば、ポトリクス(Potrykus)ら、Mol. Gen. Genet., 199:183(1985);ロルズ(Lorz)ら、Mol. Gen. Genet.,199:178(1985);フロム(Fromm)ら、Nature,319-791(1986);内山ら、Mol. Gen. Genet.,204:204(1986);カリス(Callis)ら、Genes and Development, 1:1183(1987);マルコッテ(Marcotte)ら、Nature, 335:454(1988)参照。

これらの系の他の植物種への適用は、その植物種のプロトプラストからの再生能に依存する。プロトプラストからの穀物類の再生の実例は、藤村ら、Plant Tissue Culture Letters, 2:74(1985);トリヤマら、Theor. Appl. Genet., 73:16(1986);山田ら、Plant Cell Rep.、4:85(1986);アブダラ(Abdullah)ら、Biotechnology, 4:1087(1986)参照。

プロトプラストから再生できない植物種の形質変換を行うためには、完全な細胞または組織にDNAを導入する方法を用いることができる。例えば、未成熟胚または移植片からの穀物類の再生は、バシル(Vasil)、Biotechnology、6:397(1988)に報告されているように、成功している。さらに、“粒子ガン”または高速微小噴射技術を使用することができる。このような技術を用いることで、クライン(Klein)ら、Nature,327:70(1987);クラインら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:8502(1988);マッケベ(McCabe)ら、Biotechnology、6:923(1988)で報告されているように、小さな金属粒子の表面上で、DNAを細胞壁を貫通して細胞質へ持ち込むことができる。金属粒子は細胞のいくつかの層を貫き、組織移植を行うことなく、形質変換を行えるようになる。

金属粒子を用いてトウモロコシ細胞の形質変換は成功しており、タバコや大豆の形質変換で繁殖力のある、安定な形質変換体が得られている。組織移植片の形質変換により、プロトプラスト段階の通過の必要性を回避でき、したがってトランスジェニック植物の作製が短時間で行えるようになる。

ゾウ(Zhou)ら、Methods in Enzymology、101:433(1983);D.ヘス(Hess)、Intern Rev. Cytol., 107 367(1987);ルオ(Luo)ら、Plant Mol. Biol. Reporter, 6:165(1988)で報告されているように、直接DNAを花粉に入れることによって、DNAを植物に導入することもできる。ペナ(Pena)ら、Nature, 325:274(1987)に記載されているように、ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、DNAを植物の生殖器官に注入することによって得られる。ノイハウス(Neuhaus)ら、Theor. Appl. Genet., 75:30(1987);およびベンブルック(Benbrook)ら、Proceedings Bio Expo 1986、バターワース、ストーンハム、MA、pp.27-54(1986)に述べられているように、DNAを直接細胞の未成熟胚および乾燥させた胚の再水和物に注入することもできる。

単一の植物プロトプラストまたは多様な移植片からの植物の再生は、本分野ではよく知られている。例えば、Methods for Plant Molecular BiologyA.ワイスバッハとH.ワイスバッハ編集、アカデミック・プレス社、サンディエゴ、CA(1988)参照。この再生と増殖過程は、形質変換体細胞および新芽の選択、形質変換体新芽の根の定着、および土での植物の成長の過程を含む。

アグロバクテリウムによって葉移植片から導入された外来遺伝子を含む植物の再生は、ホルシュ(Horsch)ら、Science, 227:1229-1231(1985)に報告されたように行う。この方法では、形質変換体は選択試薬の存在下で、フラリーら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80:4

803(1983)に述べられている用に形質変換された植物種の新芽の再生を誘導する培地で、増殖させる。
この方法で典型的には、2から4週間で新芽ができ、これらの形質変換体新芽は次に適当な、選択試薬と細菌の増殖を阻害する抗生物質を含む、根を誘導する培地に移す。選択試薬の存在下で根付いた形質変換体新芽は植物体を形成し、つぎに土または別の培地に植え継いで根を成長させる。これらの方法は、本分野ではよく知られているように、用いる植物種によって変えられる。
高等植物では、形質変換された要素は操作をくわえられ、土や栽培された植物、たとえば熔岩、破砕したサンゴ、ミズゴケなどで成熟させる。
たとえば、アグロバクテリウム介在ベクターを用いて種からトランスジェニック植物を作製するなど、組織培養法を用いない方法も使用される。
一つ以上の目的の6種の酵素タンパク質;すなわち、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼを含む本発明の植物は、本分野の技術者にはよく知られた方法で栽培される。本発明のトランスジェニック植物はどれも、それが含む目的のカロテノイドを単離するために栽培することができる。
栽培後、トランスジェニック植物は、カロテノイド産物を回収するために収穫される。この収穫過程は、全植物、または植物の葉、または根のみを収穫することからなる。この過程は植物を殺すか、あるいはトランスジェニック植物の必須ではない部分を収穫する場合には、残りの植物は栽培を続けることができる。
望ましい態様では、この収穫過程はさらにつぎの過程を含む:
(i)トランスジェニック植物の少なくともカロテノイドを含む部分をホモジナイズし、植物パルプを調製し、カロテノイドを含むパルプを直接、または動物飼料で用いられるように乾燥させたペレットまたはタブレットを用いる;
(ii)有機溶媒などの適当な溶媒で、あるいは超臨界抽出(ファバチ(Favati)ら、J. Food Sci., 53:1532(1988)およびその引用文献)により、植物パルプからカロテノイドを抽出する;および、
(iii)その溶液または懸濁液からカロテノイドを単離する。
少なくともトランスジェニック植物の一部はホモジナイズされ、本分野の技術者にはよく知られた方法で植物パルプを調製する。このホモジナイゼーションは機械により、あるいは化学的方法で、トランスジェニック植物部分が小片に破砕されて植物パルプが形成されるまで、手動で行うことができる。この植物パルプは、目的のカロテノイド、前駆体の残り、細胞内粒子、および細胞質内容物の混合物である。このパルプは乾燥させ、圧縮してペレットまたはタブレットにして食べるか、あるいは利益を得る、すなわちパルプの抽出過程を行うことができる。
カロテノイドは上述の植物パルプから抽出して溶液または懸濁液にすることができる。このような抽出過程は通常行われ、本分野の技術者にはよく知られている。例えば、抽出過程は適当な溶媒に植物パルプを浸す、または染み込ませることからなる。この適当な溶媒は植物パルプ中に存在するカロテノイドを溶解または懸濁し、カロテノイドを含む溶液または懸濁液が調製される。このような抽出過程に有用な溶媒は、本分野の技術者にはよく知られており、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン(THF)、ヘキサンおよびクロロホルムなどのいくつかの有機溶媒、およびそれらを組み合わせたものが含まれる。ピーナツ、トウモロコシ、ダイズなどの植物油もこの抽出に用いられる。
細菌、酵母、菌類、および他の下等生物由来のカロテノイドの単離(回収)は以下、
A.ツメルファシエンスと大腸菌を用いて示す。おおまかには、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼの構造遺伝子で形質変換した細胞を適当な条件で、目的のカロテノイドが十分に合成される期間培養する。カロテノイドを含む細胞、望ましくは乾燥状態のものを化学的または機械的に破砕し、破砕した細胞から、上

述のような液体有機溶媒を用いてカロテノイドを抽出し、カロテノイドを含む液体溶液または懸濁液を調製する。その後、溶液または懸濁液から、クロマトグラフィーなどの通常の方法によってカロテノイドを単離する。
カロテノイドは、カロテノイド単離の技術者にはよく知られている方法を用いて、溶液または懸濁液から単離される。これらの方法は、多様な溶媒への溶解度に基づいて、カラムクロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー技術を含むが、それに制限されるものではない。
D. カロテノイド生合成酵素の調製法
1. 序
a. 形質変換された細胞と培養
本発明は、本発明の組換えDNA分子、のぞましくはGGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼを発現できる組換えDNAで形質変換された宿主細胞に関するものでもある。これらの6種の酵素をカロテノイド生合成酵素と呼ぶ。
宿主細胞は原核生物でも真核生物でもよい。細菌細胞が望ましい原核生物宿主細胞であり、例えばBRLライフテクノロジーズ社(ガイタースブルク、MD;BRL)から入手可能な大腸菌HB101株などの大腸菌株が典型的である。望ましい真核生物宿主細胞には酵母、植物細胞、またはプロトプラスト、望ましくは高等植物由来の細胞が含まれる。望ましい真核生物宿主細胞には、フィリップ・ヒーター博士(Phillip Hieter)、ジョーンズ・ホプキンス大(バルチモア、MD)から入手した、実施例5で述べるYPH499などのS.セレビシエ細胞が含まれる。
本発明の組換えDNA分子による適当な細胞宿主の形質変換は、典型的に用いるベクターの型に依存する既知の方法で行う。原核生物の形質変換に関しては、例えばコーエン(Cohen)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、69:2110(1972);およびマニアティスら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー研究所、コールド・スプリング・ハーバー、NY(1982)を参照のこと。組換えDNAを含むレトロウイルスベクターによる植物細胞の形質変換に関しては、例えばバーマ、PCT出願番号WO87/00551、1987では、植物組織からプロトプラストを単離し、プロトプラストのゲノム中にプロウイルス型(二本鎖)のレトロウイルスゲノムを挿入した。形質変換したプロトプラストはカルス組織となり。トランスジェニック植物中で再生した。プロトプラストおよびその子孫から得られた植物は、そのゲノム中に組換えレトロウイルスベクターの遺伝物質を含んでおり、タンパク質産物を発現する。
形質変換が成功した細胞;すなわち、本発明の組換えDNA分子を含む細胞は、既知の技術で同定することができる。例えば、本発明の組換えDNAの導入によって得られた細胞をクローン化し、モノクローン性のコロニーを作らせることができる。これらのコロニー由来の細胞を回収し、破砕してそのDNA内容物を用いて、サザン(Southern)、J. Mol. Biol., 98:503(1975)あるいはベレン(Berent)ら、Biotech.,3:208(1985)に報告されているような方法を用いて、組換えDNAの存在を調べることができる。
組換えDNAの存在を直接調べることに加えて、組換えDNAが特異的なタンパク質抗原の発現を行わせている場合には、既知の免疫学的方法によって形質変換の成功を確認することができる。例えば、発現ベクターで形質変換が行われている細胞は、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、あるいはゼアキサンチングリコシラーゼの抗原性を示すタンパク質を産生するであろう。
本発明で大腸菌の形質変換が成功したことを確認するのは、フィトエンを除いては比較的簡単である。形成されたカロテノイドを含むコロニーは、常に着色された色素の形成によって特徴づけられる。例えば、β-カロテン、ゼアキサンチンおよびゼアキサンチンジグルコシドは黄色で、リコペンは赤色を示す。
b. 酵素の産生法
カロテノイド生合成酵素の調製法が、本発明で用いられる。この方法は、栄養培地で、形

質変換した原核生物または真核生物宿主細胞の培養を始めることを含む。宿主細胞は、望みのカロテノイド生合成酵素の構造遺伝子を規定する前述の外来DNA断片に適当する発現ベクターが機能するような形で連結されている、組換えDNA分子で形質変換される。
本発明はさらに、宿主細胞がカロテノイド生合成酵素タンパク質分子を発現するのに十分な時間維持された培養液も含み、そのタンパク質は望むならば、精製された形で回収され得る。形質変換された宿主細胞を培養するのに有用な栄養培地は、本分野ではよく知られており、いくつかの販売業者から入手可能である。宿主細胞および栄養培地のさらなる説明は、以下の部分で与えられる。
さらなる局面では、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼなどのいずれかまたは他のカロテノイド生合成酵素の存在下で、一つのカロテノイド生合成酵素を調製する方法である。この方法は、宿主細胞がGGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4H、リコペンサイクラーゼ、β-カロテンヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチングリコシラーゼの構造遺伝子のいずれかまたはすべてを規定する上述の外来性DNA断片に、機能するように連結された適合する発現ベクターでも宿主細胞が形質変換されている点を除いては、上述の方法と実質的には同一である。
形質変換した宿主細胞は、1種以上の6種の構造遺伝子を含む単一の発現ベクターを含むことができる。宿主はまた、それぞれ1種以上の酵素の構造遺伝子をそれぞれ含む2つの発現ベクターで形質変換することもできる;例えば、一つは少なくともβ-カロテンヒドロキシラーゼあるいはゼアキサンチングリコシラーゼで、もう一つは他の4種(または5種)の酵素の少なくとも一つをそれぞれ含む、あるいは3種の発現ベクターで行うこともできる;例えば、一つは少なくともβ-カロテンヒドロキシラーゼあるいはゼアキサンチングリコシラーゼで、他の2つは他の4種(または5種)の酵素の少なくとも一つをそれぞれ含む4種の発現ベクターでの形質変換の例として、少なくとも一つの発現ベクターはβ-カロテンヒドロキシラーゼまたはゼアキサンチングリコシラーゼをコードする構造遺伝子を含み、他のベクターはそれぞれ他の構造遺伝子の各々を少なくともひとつ含んでいる。宿主細胞は5種類のベクターで形質変換することもできる；すなわち、一つの発現ベクターは4つの酵素の最初の一つをコードする遺伝子を含み、別のベクターは少なくとも最後の2つの遺伝子を含む。6ベクター系もゼアキサンチングリコシラーゼの産生に使用することができ、それにおいて宿主は6種の酵素のそれぞれを含むベクターで形質変換する。

2．カロテノイドの調製法

カロテノイドは、直前の前駆体基質分子を望みのカロテノイドに変換するカロテノイド生合成酵素をコードする構造遺伝子を規定する上述の外来性DNA断片に、適合する発現ベクターが機能するように連結されているものを含む組換えDNA分子で形質変換した原核生物または真核生物細胞を栄養培地で培養を始めることを含み、それにおいて細胞は発現されるカロテノイド生合成酵素の基質である直接の前駆体分子を与える。細胞培養液は、望みのカロテノイド生合成酵素を形質変換した細胞が産生(発現)するのに十分な期間、また、与えられた直接の前駆体基質分子を発現された酵素が望みのカロテノイドに変換するのに十分な期間維持する。産生されたカロテノイドはその後にここで述べるように回収することができる。高等植物では、栄養培地(および多くの場合、直接の前駆体分子である酵素基質)は植物自身によって供給され、開始される培養は発芽した種、プロトプラスト、あるいは前の培養液からの移植片でもよい。
宿主細胞がそれ自身でカロテノイド生合成酵素または直接の前駆体基質分子を産生しない場合の一つの態様では、適当な遺伝子をコードし、発現する一つ以上の外来性組換えDNA分子でこれらの細胞を形質変換することにより、細胞に必要とされるカロテノイド生合成分子が与えられそれにより適当な酵素と前駆体基質分子が細胞に与えられる。例えば、大腸菌では普遍的な前駆体FPPからGGPPを合成するのに、GGPP合成酵素の外来性構造遺伝子が必要とされ、GGPP(直接の前駆体基質)をフィトエンに変換するためにはフィトエン合成酵素の外来性構造遺伝子が必要とされる。したがって、少なくとも二つの外来性組換えDNA分子がカロテノイドの産生に必要である。

第1図で示される次のカロテノイドであるリコペンを目的とする場合には、上述の形質変換した細胞はさらにフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hをコードし、発現する外来性組換えDNA分子で形質変換しなければならない。このような形質変換されている細胞をさらに形質変換することは、調製されることが望ましい第1図に示された各カロテノイドに関して必要とされる。したがって、ここで述べた6種の構造遺伝子の形質変換により、ゼアキサンチンジグルコシドの産生が達成される。形質変換に用いた外来性の構造遺伝子は単一の組換えDNA分子上にあっても、以下に示すように複数の組換え分子上にあってもよい。

フィトエンを産生するための一つの局面では、組換えDNA分子は外来性DNA断片に宿主細胞に適当する一つ以上の発現ベクターを機能するように連結したものを含む発現系を含んでおり、該外来性DNA断片は(i)上述のGGPP合成酵素の構成遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド配列、および(ii)上述のフィトエン合成酵素の構成遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列が含まれている。特に望ましい発現ベクタープラスミドpARC145GはGGPP合成酵素とフィトエン合成酵素の双方の構成遺伝子を含み、S.セレビシエでフィトエンを産生する。

リコペンを産生するための別の局面では、組換えDNA分子は望ましくは外来性DNA断片に宿主細胞に適当する一つ以上の発現ベクターを機能するように連結したものを含む発現系を含んでおり、該外来性DNA断片は(i)上述のGGPP合成酵素の構成遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド配列、(ii)上述のフィトエン合成酵素の構成遺伝子を規定する配列に対するヌクレオチド塩基配列、および、(iii)フィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの構成遺伝子を局面では配列に対応するヌクレオチド塩基配列が含まれている。このように、フィトエンは発現系によって酵素が発現されることにより、宿主細胞に供給される。

特に望ましい局面においては、GGPP合成酵素、フィトエン合成酵素、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの構成遺伝子は、単一の発現ベクター上に機能するように連結されており、望ましくは同じプロモーターの制御下におかれる。別の望ましい局面では、2つの発現ベクター、すなわちGGPP合成酵素とフィトエン合成酵素の構成遺伝子を含む1つのベクターと、フィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの構成遺伝子を含むもう一つのベクターが用いられる。さらに別の望ましい局面では、3つの発現ベクターが用いられる。酵母と植物では同一のプロモーターを各遺伝子に使用可能であるが、各遺伝子に独立のプロモーターが必要である。

実施例9bは3種すべての遺伝子を含む単一の発現ベクター(pARC376-Ava102)を用いて大腸菌宿主細胞でリコペン産生を行わせたことを示している。同様に、プラスミドpARC489Dに含まれている非常に活性の高いGGPP合成酵素とプラスミドpARC140Nに含まれているフィトエン合成酵素を、プラスミドpARC496A上のフィトエンデヒドロゲナーゼ-4H構造遺伝子と別に、あるいはともに、大腸菌に形質変換しプ、3種すべての機能的な構造遺伝子を含む宿主大腸菌細胞を作製することができる。ここで、プラスミドpARC489DとpARC140Nの発現は普遍的な細胞性前駆体を必要とされるフィトエンに変換するのに必要な酵素を供給し、フィトエンはプラスミドpARC496Aに発現されるフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hの活性によってリコペンに変換される。同様に、実施例10は、発現産物が細胞にフィトエンを与えるプラスミドpARC145G、および、供給されたフィトエンをリコペンに変換するフィトエンデヒドロゲナーゼ-4Hを発現するプラスミドpARC146Dの双方で形質変換された宿主S.セレビシエ細胞でのリコペン産生について述べている。

実施例１は、すべての５つの遺伝子を含む単一の発現プラスミドベクターpARC288を用いた、大腸菌およびＡ．ツメファシエンス宿主細胞におけるゼアキサンチン生産を説明している。実施例２１は、β-カロテンの生産に必要とされるすべての４つの遺伝子を含むが、β-カロテン・ヒドロキシラーゼの欠失した発現ベクターpARC279を用いた、大腸菌宿主細胞におけるゼアキサンチン生産を説明している。プラスミドpARC279を含む大腸菌はさらにプラスミドpARC406BHで形質転換され、その後、細胞は適切な選択培地上で生育させられた。ゼアキサンチンが生産された。

同様に、GGPPシンターゼ遺伝子はプラスミドpARC489Dに含まれており、フィトエン・シンターゼ遺伝子はプラスミドpARC140Nに含まれており、またフィトエン・デヒドロゲナーゼ

-4H遺伝子は、プラスミドpARC496Aで見られ、プラスミドpARC1510に提供されるリコペン・サイクラーゼ構造遺伝子は、すべての５つの機能的構造遺伝子を含む、形質転換された宿主大腸菌遺伝子を調製するために、プラスミドpARC406BHに提供されるβ-カロテン・ヒドロキシラーゼ構造遺伝子と個別にあるいは一緒に形質転換することができる。ここで、プラスミドpARC489D、pARC140N、pARC496CおよびpARC1510の発現は、普遍的な細胞の前駆物質をリコペンおよびその次にβ-カロテンに変換し、必要とされるフィトエンに変換し、これはそれに続いてプラスミドpARC406BHにより発現されるβ-カロテン・ヒドロキシラーゼの作用によってゼアキサンチンに変換される。同様に、実施例２２は、その発現産物がGGPPシンターゼ、フィトエン・シンターゼおよびβ-カロテン・ヒドロキシラーゼを細胞に供給するプラスミドpARC145Hならびに、フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4Hおよびリコペン・サイクラーゼの両者を発現するpARC1520で形質転換したS. cerevisiae宿主細胞におけるゼアキサンチン生産を説明している。したがって、ゼアキサンチン生合成に必要とされるすべての酵素は、これらの２つのプラスミドに見られる。

ゼアキサンチン・ジグルコシドの調製についてのさらにもうひとつの態様において、組換えDNA分子が、(i)GGPPシンターゼの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列および、(ii)フィトエン・シンターゼの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列ならびに、(iii)フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4Hの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列および、(iv)リコペン・サイクラーゼの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列と、(v)β-カロテン・ヒドロキシラーゼの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列ならびに、ゼアキサンチン・グリコシラーゼの構造遺伝子を規定する配列に対応するヌクレオチド塩基配列からなる異種DNA断片を操作することにより連結した、宿主細胞に適合したひとつ以上の発現ベクターから構成される発現系を含むことが好ましい。したがって、ゼアキサンチンはこの発現系によって発現された酵素により宿主細胞に供給されるのである。

とりわけ好ましい態様において、GGPPシンターゼ、フィトエン・シンターゼ、フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4H、リコペン・サイクラーゼ、β-カロテン・ヒドロキシラーゼ、およびゼアキサンチン・グリコシラーゼの構造遺伝子は、操作することによって単一の発現ベクターに連結され、同じプロモーターの調節下にあることが好ましい。もうひとつの好ましい態様において、GGPPシンターゼ、フィトエン・シンターゼ、フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4H、リコペン・サイクラーゼ、およびβ-カロテン・ヒドロキシラーゼの構造遺伝子を一方のベクターにもち、他方のベクターにゼアキサンチン・グリコシラーゼの構造遺伝子をもつ、２つの発現ベクターが用いられる。さらにそのほかの好ましい態様において、２種類、３種類、４種類、５種類あるいは６種類の発現ベクターが用いられる。酵母および植物はそれぞれの遺伝子に同種のプロモーターを用いることができるが、それぞれの遺伝子に対して個々にプロモーターを必要とする。

実施例１は、すべての６種類の遺伝子を含む、単一の発現ベクターpARC376を用いた大腸菌内でのゼアキサンチン・ジグルコシドの産生および回収を説明している。実施例26は、ゼアキサンチン生産に必要とされるすべての５種類の遺伝子を含む発現ベクターpARC288および、ゼアキサンチン・グリコシラーゼの遺伝子を含むプラスミドpARC2019を用いた、大腸菌宿主細胞におけるゼアキサンチン・ジグルコシド生産を説明している。したがって、pARC288を含む大腸菌は、さらにプラスミドpARC2019で形質転換され、その後この細胞は適当な選択培地中で生育させられた。ゼアキサンチン・ジグルコシドが生産され、回収された。

同様に、プラスミドpARC489Dに含まれる非常に活性の高いGGPPシンターゼ遺伝子および、プラスミドpARC140Nに含まれるフィトエン・シンターゼ遺伝子、プラスミドpARC496Aで見られるフィトエン・デヒドロゲナーゼ-4H遺伝子、プラスミドpARC1510で見られるリコペン・サイクラーゼ構造遺伝子、ならびにプラスミドpARC406BHで見られるβ-カロテン・ヒドロキシラーゼ構造遺伝子はプラスミドpARC2019に見られるゼアキサンチン・グリコシラーゼ遺伝子と別々あるいは一緒に形質転換され、すべての６種類の機能的な構造遺伝子を含む形質転換された宿主大腸菌細胞を調製することができる。ここで、プラスミドpARC48

9D、pARC140N、pARC496AおよびpARC406BHの発現は、普遍的な細胞性前駆体を、求められているフィトエンに変換するために必要とされる酵素を提供し、このフィトエンはリコペンとそれに次いでβ-カロテンに変換され、これはゼアキサンチンに変換され、次いでプラスミドpARC406BHによって発現されるゼアキサンチン・グリコシラーゼの作用によって、ゼアキサンチン・ジグルコシドに変換される。同様に実施例２７は、その発現産物がGGPPシンターゼ、フィトエン・シンターゼおよびβ-カロテン・ヒドロキシラーゼを細胞に提供するプラスミドpARC145Hと、フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4Hおよびリコペン・サイクラーゼの両者を発現するプラスミドpARC1520ならびに、ゼアキサンチン・グリコシラーゼを発現するプラスミドで多重形質転換されたS. cerevisiae宿主細胞における、ゼアキサンチン・ジグルコシド生産を説明している。したがって、ゼアキサンチン・ジグルコシド生合成に必要とされるすべての酵素は、これらの３種のプラスミドに見られる。

構造遺伝子の発現順序は重要ではなく、そのため、例えばGGPPシンターゼはフィトエン・シンターゼの構造遺伝子の５’（上流）側に位置することも、あるいはその逆も可能である。

もうひとつの態様として、この方法はただ１種類のカロテノイド合成遺伝子を含む発現ベクターを含む形質転換宿主細胞の利用によるカロテノイド生産をも意図している。ここで、栄養培地は宿主細胞に即座に利用可能な前駆体基質分子を供給するために、それらの宿主細胞は発現された酵素の前駆体基質を提供することができる。この栄養培地は、よく知られたミセルあるいは顆粒状にして必要量の前駆体を含むことができる。

この態様のもうひとつの観点は、フィトエン・シンターゼ、フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4H、リコペン・サイクラーゼβ-カロテン・ヒドロキシラーゼおよび、ゼアキサンチン・グリコシラーゼの生産のために１種類、２種類、３種類、４種類あるいは５種類の発現ベクターで形質転換した宿主細胞を意図している。ここで、GGPPは上述の栄養培地から形質転換した宿主細胞に供給され、この形質転換された宿主細胞は、形質転換された構造遺伝子を用いることにより、GGPPを必須のフィトエン、次いでリコペン、β-カロテン、ゼアキサンチンおよびゼアキサンチン・ジグルコシドに変換する。無論、ゼアキサンチン・ジグルコシドよりもカロテノイドが必要とされる場合、細胞はこの５種類の遺伝子のすべてのうちのいくつかの種類の遺伝子で形質転換され、GGPPは培地によって細胞に供給される。

ここで意図されたカロテノイド生産法のいずれにおいても、形質転換された宿主が求められるカロテノイドの生産あるいは蓄積を阻害するような、外的に供給されたDNA断片を含まないことが理解される。したがって、例えば、ゼアキサンチンが調製されるべき場合、ゼアキサンチンをゼアキサンチン・ジグルコシドに変換する生物学的に活性なゼアキサンチン・グリコシラーゼをコードするDNAは外から供給されないため、ゼアキサンチンが蓄積する。

Ｅ．実施例

以下の実施例は本発明の領域を説明する意図のものであって、限定するものではない。カロテノイド生合成一般、GGPPシンターゼおよびフィトエン・シンターゼに関する研究は実施例１から７で論じられ、リコペンに関する研究は実施例８から１４で論じられ、β-カロテンに関する研究は実施例１５から２０で論じられ、ゼアキサンチンに関する研究は実施例２０から２５で論じられ、また実施例２６から３０ではゼアキサンチン・ジグルコシドが論じられる。

すべての組換えDNA技術は、特にことわりのない限りマニアティスら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual,コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、NY(1982)に述べられた標準的な実験法にしたがって行われた。すべての制限酵素およびその他の酵素は供給者の指示にしたがって用いられた。DNA塩基配列決定はサンガーら、Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74:5463-7 (1977)の基本的なジデオキシ法の改変法を用い、M13シングルストランドDNAにおいて行われた。BRLライフ・テクノロジーズ社、ガイサーズブルグ、MDのシークエンシング・キットが用いられた。DNA配列は、インテリジェンティックス社のＩＧ・スーツで分析された。

大腸菌あるいはＳ．セレビシエ遺伝子で操作された酵素の酵素アッセイはGGPPシンターゼとフィトエン・シンターゼに関しては実施例２ｅで、フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4Hについては実施例８ｇで、リコペン・サイクラーゼに関しては実施例１５ｆで供給されている方法にしたがって行われた。
カロテノイドは、実施例４で供給されている方法にしたがって大腸菌かあるいはＳ．セレビシエから、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて抽出および分析された。ゼアキサンチン・ジグルコシドの特性は、実施例４で供給された方法にしたがって行われた質量分析器で確認された。ゼアキサンチンの特性は、質量分析器で行われた。その他のカロテノイドの同定はHPLCからの溶出、UV-可視光スペクトル分析および既知のフィトエン、リコペンおよびβ-カロテン標準物質との比較によって確認された。
プラスミドpARC306Aの誘導可能なRec7プロモーター系を用いた、異なる遺伝子によってコードされる大腸菌内のタンパク質の大腸菌における生産法は、実施例２ｄで述べられている。これらのタンパク質は、すでに述べられた酵素アッセイにおいて用いられたものである。この方法は、タンパク質を充分量生産してそのN-末端を決定するためにも用いられた。
実施例２１から２５は、ゼアキサンチンの生産について述べている。実施例２１は、β-カロテン・ヒドロキシラーゼの操作が可能で、直ちに移動可能な構造遺伝子の構築について述べており、一方、実施例２２はプラスミドpARC404BHを作製するためのプラスミドpARC306Aへのその構造遺伝子の導入を説明しており、これは、プラスミドpARC279とともに大腸菌細胞内におかれたとき、ゼアキサンチンの生産を引き起こす。
実施例２６から３０は、ゼアキサンチン・ジグルコシドの生産について述べている。実施例２６はゼアキサンチン・グリコシラーゼの操作が可能で、直ちに移動可能な構造遺伝子の構築について説明しており、これはプラスミドpARC288とともに大腸菌内におかれたときゼアキサンチン・ジグルコシドの生産を起こす。
実施例１．　エルウィニア　ヘルビコラ プラスミドpARC376におけえる、カロテノイド生合成経路遺伝子の存在確認
ａ．　大腸菌
それ自身は色素を生産することができない大腸菌細胞は、プラスミドpARC376で形質転換した場合極めてはっきりとした黄色となる（第５図）。この観察された黄色の原因である色素は細胞から抽出され、UV-VISスペクトルおよび質量スペクトルのデータからゼアキサンチンおよびゼアキサンチン・ジグルコシドであることが示された。
生育培地中のジフェニルアミンの存在下では色素の形成は強力に阻害されるため無色の細胞となり、これはごく微量のフィトエンしか蓄積していないことが見いだされている。ジフェニルアミンはフィトエン・デヒドロゲナーゼ-4Hの反応を阻害することがしられている。これはこれらの形質転換細胞においてカロテノイド経路が機能していることを初めて示すものであった。対数増殖期中期にある細胞を集め、これらの細胞からカロテノイドを抽出したところ、フィトエン、フィトフルエンおよびβ-カロテンの存在を示し、さらにこの細胞において機能的なカロテノイド経路合成が存在することを確定した。
ｂ．　Ａ．ツメファシエンス
エルウィニア　ヘルビコラのカロテノイドDNAを含むＡ．ツメファシエンスにおけるカロテノイド生産が研究された。プラスミドpARC376の種々の部位を含む３種類のプラスミドでＡ．ツメファシエンス株LBA4404を形質転換した。４種類の異なるカロテノイド、すなわちフィトエン、リコペン、β-カロテンおよびゼアキサンチンが生産された。
本研究で用いられた３種類のプラスミドは以下のものである：
１．　R1162複製開始点、カナマイシン耐性遺伝子(NPTII)およびエルウィニア　ヘルビコラのプラスミドpARC376-Aav103断片DNA（約8331-8842-10453の２つのAvaI制限酵素断片を削除し、（約13463の）HindIIIから（第５図の約3370の）EcoRI断片をプラスミドpSOC925にクローニングする事により生じた）を含むプラスミドpARC803（約17kb）（第１２図）；
２．　R1162複製開始点、カナマイシン耐性遺伝子およびエルウィニア　ヘルビコラのプ

ラスミドpARC376-Bam100断片DNA（約3442-4487-5302の２つのAvaI制限酵素断片を削除し、（約13463の）HindIIIから（第５図の約3370の）EcoRI断片をプラスミドpSOC925にクローニングする事により生じた）を含むプラスミドpARC274（約17kb）；
３．　R1162複製開始点、カナマイシン耐性遺伝子およびエルウィニア　ヘルビコラのプラスミドpARC376-Sal 8（実施例２ａ）および、（約13463の）HindIIIから（第５図の約11196の）EvoRVのGGPPシンターゼ遺伝子断片を含む、プラスミドpARC288（約18kb）。
これらのプラスミドで、以下の方法にしたがってアグロバクテリウムのコンピテント細胞を形成転換した。
１．　１つのアグロバクテリウムのコロニーを２から３ｍｌのＹＰ培地（10g/lバクトペプトン、10g/l酵母抽出物および5g/l NaCl,pH7）中で一夜（約１５時間）培養した。
２．　この一夜培養は、250rpm、２８℃で振とうしている250mlフラスコにいれた50mlの新鮮なＹＰ培地に移植され、培養は0.5から1.00D(A_{600})に達するまで生育させられた。
３．　この培養は氷上で５分間冷やされ、次に遠心により細胞が集められた。
４．　細胞は1mlの20mM塩化カルシウムに再懸濁された。
５．　約1μgのプラスミドDNAが0.1mlのこの細胞懸濁液に加えられ、この混合液は氷上で３０分間インキュベーションされた。
６．　この反応混合液は液体窒素中で１から２分間凍結され、次いで３７℃で５分間インキュベーションされた。
７．　1mlのＹＰ培地が添加され、この混合液は２８℃で２から４時間インキュベーションされた。
８．　この細胞は50μg/mlのカナマイシンを含むＬＢ培地（5g/l酵母抽出物、10g/lトリプトン、5g/l NaClおよび2g/lブドウ糖、pH7）にまかれた。
形質転換細胞は50μg/mlのカナマイシンを含むＬＢプレート（10g/lトリプトン、5g/l酵母抽出物、5g/l NaCl、2g/lブドウ糖および15g/lバクトアガー）上、２８℃で選択された。形質転換細胞は同じ富栄養培地上で２日間培養され、カロテノイド抽出のため集菌および乾燥された。カロテノイド抽出のため、0.5mlの水、2.5mlのアセトンおよび2.5mlのメタノールが乾燥細胞に添加された。室温で攪拌しながら１時間インキュベーションした後、カロテノイドを含む溶媒は濾過され、分離されたカロテノイドはHPLCで分析された。
大腸菌およびアグロバクテリウム両者によって生産されたカロテノイドは第１表に示されている。アグロバクテリウムによるカロテノイドの生産量は、同じプラスミドをもつ大腸菌細胞よりも約５から１０分の１（概算）しかなかった。

第１表

Ａ．ツメファシエンス　ＬＢＡ４４０４によって生産されるカロチノイド

プラスミド	主要なカロチノイド	
	大腸菌	アグロバクテリウム
ｐＡＲＣ８０３	リコペン	リコペン；フィトエン
ｐＡＲＣ２７４	β－カロチン	β－カロチン，（フィトエン）＊
ｐＡＲＣ２８８	ゼアキサンチン	ゼアキサンチン

＊ 微量成分

メイヤー、Rら、J.Bacteriol. 152:140 (1982)によって述べられたプラスミドR1162由来の複製開始点は、他のバクテリアにおける複製が可能な、広範な宿主域をもつプラスミドを構築するために、プラスミドpARC376に導入された。その結果できたプラスミドは、エルウィニア　ヘルビコラのカロテノイドDNAをロドバクター　スフェロイデスおよびそのカロテノイド変異体に導入するために用いられた。その結果は、エルウィニア　ヘルビコラカロテノイドDNAはロドバクター細胞において発現されなかったが、これはおそらくロドバクターのフィトエン・シンターゼ、フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4Hおよびニューロスポレン・デヒドロゲナーゼ変異体の相補がないためだろう。以下で述べられる、これより進んだ研究は、フィトエン・デヒドロゲナーゼ-4Hが宿主としてロドバクター細胞内で発現されることができることを示した。

実施例２．GGPPシンターゼ遺伝子

GGPPシンターゼ遺伝子は、以下の方法を用いてpARC376プラスミドから得られた。

ａ．　SalIによるpARC376の切断

プラスミドpARC376-Sal8は、２つのSalI断片が除かれた、プラスミドpARC376の誘導体である。これらの断片のひとつは、第５図に示されている約9340および約10432にあるSalI制限酵素部位によって囲まれた約1092bpの断片であり、他方の断片は第５図に示されている約10432および約14263によるSalI制限酵素部位によって囲まれた3831bp（大体のサイズ）の断片である。これは以下のようにして行われた。

プラスミドpARC376 DNAはアルカリ溶解法を用いて調製された。5μgのプラスミドDNAは供給者によって提供された高塩濃度緩衝液に150mM NaClを添加した緩衝液中でSalI(BRL)により、３７℃で１時間切断され、0.8%アガロースゲルで精製された。残った約10.2kbのプラスミドはゲルから電気溶出され、フェノール抽出を行い、エタノール沈澱された。ほぼ9340から14263の位置から上述のSalI断片を除去した後、残ったDNAはプラスミドpARC376-Sal8を作製するためにそれ自身で連結された。

ｂ．　pARC808の構築

GGPPシンターゼの遺伝子が削除されたエルウィニア　ヘルビコラDNAに存在するかを決定するために、プラスミドpARC376-Sal8が、大腸菌のプラスミドR1162誘導体であるプラスミドpSOC925にクローン化され、プラスミドpARC808が作製された。プラスミドpSOC925は、R1162由来の複製開始点、カナマイシン耐性を担うTn5由来のNPTII遺伝子および単一なHindIIIおよびEcoRI制限酵素部位を含んでいる。

簡単に説明すると、プラスミドpSOC925発現DNAベクターは、５単位のそれぞれの制限酵素HindIIIおよびEcoRI、ならびにマニアティスの中塩濃度緩衝液を含む溶液に対して、5μgのプラスミドDNAを混合することによって、クローニングのために調製された。この溶液は３７℃で２時間保温された。この溶液は制限酵素を不活性化させるために６５℃で加熱された。このDNAはフェノールとクロロホルム混合液によって抽出し、エタノール沈澱することによって精製された。

プラスミドpARC376-Sal8は同様な方法でHindIIIとEcoRIによって切断された。次に、プラスミドpARC376-Sal8の約348番のHindIII部位から約3379（第５図）番のEcoRI部位にあるエルウィニア　ヘルビコラDNAは、すでにHindIIIとEcoRIで切断されているプラスミドベクターpSOC925に連結された。

連結反応は、18μlの容量の中に約0.1μgのプラスミドベクターpSOC925と、約0.2μgのプラスミドpARC376-Sal8由来のエルウィニア　ヘルビコラのHindIIIからEcoRIの断片を含んでいた。2μlの10×連結緩衝液（IBI社）および２単位のT4リガーゼが添加された。この連結反応液は４℃で一夜（約１５時間）インキュベーションされた。連結されたDNAは標準的な方法（マニアティス）にしたがって、大腸菌HB101に形質転換された。これにより、プラスミドpARC808が生じ、このプラスミドはカナマイシン耐性をもコードしている。プラスミドpARC376-Sal8から切り出されたDNA断片は、GGPPシンターゼ遺伝子の上流にある内在性プロモーター配列を含んでいる。

挿入断片を含む陽性クローンは有望な陽性クローンを培養し、アルカリ溶解法（マニアティス）によりプラスミドDNAを単離し、この単離されたプラスミドDNAについて制御酵素分析を行うことによって同定された。このプラスミドDNAによって形質転換された大腸菌細胞は、観察およびHPLCならびにTLC分析によって決定されるように、発色性のカロテノイドを生産しなかった。以下で述べられる他の研究は、プラスミドpARC808がフィトエンを発色性のカロテノイド色素に変換することのできるエルウィニア　ヘルビコラ遺伝子を発現することを示した。

ｃ．pARC282の構築

第２番目のプラスミドは、プラスミドpARC376由来の、約1153bpのBglII（第５図の約12349の位置）からEcoRV（第５図の約11196の位置）断片を含む制限酵素断片を、pBR322のBamHIとHindIII部位に挿入し、プラスミドpARC282を作製することによって構築された。簡単に述べると、プラスミドpARC273は、BglII部位（約12349の部位）からEcoRV部位（約11196の部位）由来の、エルウィニア　ヘルビコラDNAを含んでいる。

プラスミドpARC273の中のEcoRV部位から下流の、約100bpの非コード領域にHindIII制限酵素部位があり、これはpARC273ベクターの一部である。ここで、約5μgのプラスミドpARC273が、中塩濃度緩衝液（マニアティス）中で５単位のそれぞれの制限酵素BglIIおよびHindIIIとともに、３７℃で２時間インキュベーションされた。5μgのベクターpBR322は、中塩濃度緩衝液（マニアティス）中で５単位のそれぞれの制限酵素BamHIおよびHindIIIとともに、３７℃で２時間インキュベーションされた。

プラスミドpARC273由来のBglIIからHindIIIの（マニアティス）中で５単位のそれぞれの制限酵素BglIIおよびHindIIIとともに、３７℃で２時間インキュベーションされた。プラスミドpARC273由来のエルウィニア　ヘルビコラのBalIIからHindIIIを含むDNA断片（約0.2mg）は、18μlの総容量中で、BamHItoHindIIIで切断されたプラスミドpBR322ベクター（約0.1μg）と混合された。2μlの10×連結緩衝液（IBI社）と２単位のT4リガーゼが添加され、反応物は４℃で一夜（約１５時間）インキュベーションされ、そして連結されたDNAはハニアティスの方法にしたがってコンピテント大腸菌HB101細胞に形質転換された。陽性クローンは、有望な陽性クローンを培養し、アルカリ溶解性（マニアティス）によりプラスミドDNAを単離し、このプラスミドDNAについて制限酵素分析を行うことによって同定された。

このプラスミドpARC282は大腸菌におけるアンピシリン耐性をコードしており、GGPPシンターゼのBglII部位から開始メチオニンコドンの間の、本来のエルウィニア　ヘルビコラプロモーターを含んでいるが、どのようなカロテイドの生産も引き起こすことはできない

。しかし、このプラスミドがプラスミドpARC808を含む大腸菌細胞に移され、この大腸菌細胞がカナマイシンおよびアンピシリン存在下で生育されると、黄色の色素であるゼアキサンチンの生産によって示されるようにカロテノイドが合成された。したがって、プラスミドはpARC282はプラスミドpARC376-Sal8から削除された必須遺伝子を含んでおり、この遺伝子が他のエルウィニア　ヘルビコラのカロテノイド遺伝子と共存することによって、大腸菌におけるカロテノイドの生産を回復することができた。

ｄ．その他のプラスミド構築

酵素アッセイは、HpaI（第２図のプラスミドpARC376の約12264の位置あるいは、約84の部位）からEcoRV（第５図の約11196の位置）を含む約1068bpの断片を、pARC306Aと呼ばれるプラスミドにクローニングする事によって構築されたプラスミドpARC491を含む、同様なプラスミド構築物について行われた。第６図にその制限酵素地図が描かれているプラスミドpARC306Aは約2519塩基対を含んでいる。このプラスミドはpUC18由来のポリリンカー領域と唯一のNcoI部位およびアンピシリン選択マーカー、ならびにpMB1複製開始点とＲｅc7プロモーターを含んでいる。このプラスミド構築物を含む細胞は、7.91nmol/分／mgタンパク質のレベルのGGPPシンターゼ活性を有していた。

ｅ．　DNA塩基配列決定

あるクローニング段階の正確さは、サンガーら、Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.74:5463-7(1977)によって述べられたジデオキシ法を用い、BRL社のシークエンシング・キットに含まれる製造者の指示にしたがって、挿入断片の塩基配列決定を行うことによって確認された。

第５図の約12349にあるBglII部位から、第５図の11196にあるEcoRV部位の間にある領域由来の約1153bpの制限酵素断片について決定された。これにより得られたDNA配列と、推定される部分的アミノ酸残基の配列は第２図に示されている（約1から1153の位置）。プラスミドpARC376（第５図）におけるGGPPシンターゼ遺伝子の転写の方向は反時計方向であり、BglII部位からEcoRV部位の方向に向っている。

ｆ．In Vitro突然変異誘起法

GGPPシンターゼの開始コドンはプラスミドpARC376の約12226ヌクレオチドの位置から、メチオニン（第２図の124の位置）をコードするATGコドンで始まる。NcoI制限酵素部位は、大腸菌CJ236が（ページ8.1.1の第３段階で）さらに20μg/μlのクロラムフェニコール存在下で培養されたことを除いては、Current Protocols In Molecular Biology,オースベルら編、ジョン・ワイリー＆サンズ、ニューヨーク、(1987)p.8.1.1-8.1.6に述べられている方法にしたがってin vitro突然変異誘起法を用いてGGPPシンターゼのこの部分に導入された。用いられたプライマーは以下のものである。

5'

3'

TCA GCG GGT AAC CTT GCC ATG GGG AGT GGC AGT AAA GCG　(SEQ ID NO:18)

Nco I 部位

突然変異は、DNA塩基配列決定あるいは新たに導入されたNcoI部位の存在によって確認された。この操作は天然の配列

TTG CAATGG TGA（SEQ ID NO:19）を

TTG CCATGG GGA（SEQ ID NO:20）に変え、

ここで、上および以下の実施例の強調文字は改変された塩基を示している。

新たに導入されたNcoI部位からEcoRV部位（約1029bp）の、この修飾された型のGGPPシンターゼ遺伝子は次に、プラスミドpARC306Aに挿入され、プラスミドpARC417BHが作製された。このプラスミドpARC417BHは、マルチプル・クローニング部位に隣接して大腸菌プロモーターRec7を含んでいる。プロモーター領域を欠く構造遺伝子は、このRec7プロモーターに隣接して導入されると大腸菌内で発現される。

プラスミドpARC417BHが大腸菌に導入されると、GGPPシンターゼ酵素活性は（GGOHとして

測定される）6.35nmol/分/mgタンパク質のレベルであることが分かった。これに加え、プラスミドpARC417BHがプラスミドpARC808を含む大腸菌細胞に導入されるとカロテイドが生産された。これは、GGPPシンターゼ遺伝子が同定され、遺伝的に操作されたことを示した。

ｇ．GGPPシンターゼ遺伝子の微調整

GGPPシンターゼ遺伝子を発現するために指示されたいくつかの構築物が、活性なGGPPシンターゼ酵素の発現を最適化するために作られた。再び、先に記載した方法にしたがってin vitro突然変異誘起法を用い、プライマー

5' 3'

CAT GGC GAA ATA GAA GCC ATG GGA CAA TCC ATT GAC GAT (SEQ ID NO:21)

Nco I 部位

を用いて、第２図の約124の位置にあるGGPPシンターゼ遺伝子の開始コドンから１７アミノ酸下流に当たる、プラスミドpARC376の約12264の位置にNcoI部位が導入された。したがって、この部位はそのATGコドンが第２図の配列の約175の位置で始まるメチオニンの上流側に位置した。天然のDNA配列

AAG TAATGA GAC（SEQ ID NO:22）は、

AAG CCATGG GAC（SEQ ID NO:23）に変換された。

１７個少ないアミノ末端のアミノ酸残基をコードする、この修飾されたGGPPシンターゼ遺伝子はプラスミドpARC306AのNcoI部位に挿入され、プラスミドpARC418BHが作製された。GGPPシンターゼアッセイがプラスミドpARC418BHで形質転換した細胞において行われたとき、どんな酵素活性も検出されなかった。それに加え、この修飾されたGGPPシンターゼがカロテイド合成に必要とされる酵素の遺伝子の残りを有するプラスミド、すなわち上述のプラスミドpARC808を含む大腸菌細胞に加えられた場合、カロテイドは全く合成されなかった。これは、GGPPシンターゼの１７個のＮ－末端アミノ酸が欠失することにより、機能のない酵素が生ずることを示した。

最後の構築は、GGPPシンターゼ遺伝子の5'端で行われた。NruI部位（プラスミドpARC376の約12187）からEcoRV部位（第２図のプラスミドARC376の約11196あるいは約162の位置から1153の位置）を通りプラスミドpARC282のHindIII部位のGGPPシンターゼ遺伝子から切り出された断片は、以下に述べられるプラスミドpARC489Bを作製するためにpARC306Aプラスミドに挿入された。

プラスミドpARC306Aは、EcoRIで切断された。このEcoRI末端は、マニアティスによって述べられた通常の方法にしたがって、DNAポリメラーゼＩのKlenow断片を用いて平滑端に変換された。プラスミドpARC282のNruI-HindIII部分切断断片由来のNruI平滑5'端は、プラスミドpARC306AのEcoRI部位に新たに生成された平滑端に対して、約18μｌの容量で0.2μｇのNruIからEcoRVのエルウィニア　ヘルビコラDNAとpARC306Aベクターとを混合することによって平滑連結された。2μｌの10×連結緩衝液（IBI社）および２単位のT4リガーゼが添加され、反応は４℃で一夜（約１５時間）インキュベーションされた。

その結果得られた部分的に連結されたプラスミドは、次にHindIIIで切断され、そのためEcoRI部位からHindIII部位の第６図で示されたポリリンカー領域が失われた。この結果できたHindIII粘着端は、次にプラスミドpARC489Bを生成するために連結された。

陽性クローンはプラスミドDNA単離（マニアティス）およびこのプラスミドDNAの制限酵素分析によって同定された。

プラスミドpARC489Bにおいて、GGPP遺伝子のはじめの１３アミノ酸残基をコードするDNAは削除された。プラスミドpARC306AでRec7プロモーターから下流でコードされるはじめの４アミノ酸残基および、新たに生成されたEcoRi平滑端はGGPPシンターゼの前部のNruI部位の上流におかれた。これによって、以下のようにしてGGPPシンターゼのN-端側のアミノ酸配列が改変された。アミノ酸配列の相違は次のようになっている。

天然のエルウィニア　ヘルビコラGGPPシンターゼの本来のアミノ酸配列。

MET VAL SER GLY SER LYS ALA GLY VAL SER PRO HIS ARG GLU ILE....

(SEQ ID NO:24)

プラスミドpARC489Bの修飾されたGGPPシンターゼのアミノ酸配列

MET ALA GLU PHE GLU ILE...

(SEQ ID NO:25)

この異種遺伝子に対して決められたDNA配列は、約150の位置から約1153の位置までが第３図に示されている。

プラスミドpARC489Bで形質転換された大腸菌細胞はGGPPシンターゼ活性についてアッセイされた。活性のレベルは12.15nmol/分/mgタンパク質であることが分かった。

プラスミドpARC489Bがカロテイド生産に必要な酵素をコードする遺伝子の残りを含むプラスミド、すなわちpARC808を含む大腸菌細胞に移されたとき、その細胞はカロテイドを生産した。したがって、この構築物はプラスミドpARC306A由来の異種遺伝子部分がはじめの４アミノ酸残基をコードし、GGPPシンターゼ遺伝子によってコードされるはじめの１３アミノ酸残基が欠失しているにもかかわらず、活性のある酵素をコードしていた。

上で述べたプラスミドpARC489BのDNA部分は、その5'末端のRec7プロモーターに隣接する４アミノ酸をコードする塩基と重複し、このプラスミドのポリリンカー領域の平滑化された前部のEcoRI部位まで広がっている。このDNA部分は第６図でプラスミドpARC306Aについて描かれているように、その5'末端のNcoI部位とHindIIIあるいはPvuII部位における反応によって切り出されることができる。

求められるGGPPシンターゼ遺伝子はPvuIIあるいはHindIII制限酵素部位を含まないものである。プラスミドpARC489BのHindIIIとPvuII部位の間の領域は、すべての読み枠において終止コドンを含んでいる。このDNAの3'端の切断にはPvuII部位を用いることが好ましい。したがって、求められるGGPPシンターゼDNA断片はプラスミドpARC489BのNcoIとPvuII制限酵素部位の間の約1150bpの中にあるとする事ができる。

次に、GGPPシンターゼ遺伝子の3'端が修飾された。この構築は、次のようにして行われた。NruI（約11187）-BalI（第５図の約11347）の２つの平滑端をもつ断片はプラスミドpARC306Aの特別に調製された型のものに挿入された。それから、プラスミドpARC306AはEcoRIで切断され、その結果生じた末端は、２つの平滑端を作製するためにDNAポリメラーゼIのKlenow断片を用いて平滑化された。平滑化されたNruI-BalI断片は操作することによってプラスミドpARC306Aベクターに連結され、プラスミドpARC489Dが形成された。このベクターはEcoRI部位を除き第６図に示されたプラスミドpARC306Aのポリリンカー制限酵素部位のすべてを含んでいた。

これによって生じたプラスミドpARC489DのGGPPシンターゼ遺伝子を含む部分はプラスミドpARC489Bが有していたものと同様な5'端を有しているが、3'端はプラスミドpARC489BのGGPPシンターゼ遺伝子よりも約151bp短くなっている。プラスミドpARC489Dの異種GGPPシンターゼ構造遺伝子の配列は150番から1002番までの位置について第３図に示されており、このDNAの5'端はプラスミドpARC489Bに存在するGGPPシンターゼ遺伝子の5'端と同じである。

プラスミドpARC306Aのマルチプル・クローニング領域のHindIII部位から約70bp下流にPvuII部位が存在する。GGPPシンターゼ遺伝子にはPvuII部位が全くない。したがって、GGPPシンターゼ構造遺伝子はプラスミドpARC489DなどのpARC306A由来のプラスミドから、約1000bpのNcoI-PvuII断片として他のプラスミドに移されることが可能である。

プラスミドpARC489Dは、大腸菌に形質転換された。非常に驚いたことに、この構築物は他のすべての型のGGPPシンターゼ遺伝子の中で最も高い酵素活性を与えた。この活性は予期しないほど高い23.28nmol/分/mgタンパク質であった。

プラスミドpARC489Dがプラスミドp ARC808を含む大腸菌細胞に導入されると、カロテイドが合成された。

前述のGGPPシンターゼ遺伝子構築物のいくつかの活性の比較が、下記の第２表に示されて

おり、ここにはR.スフェロイデス2.4.1にもとから存在する関連遺伝子の活性を含んでいる。これらの結果は、もとのプラスミドpARC376の活性の約35倍から130倍の増強を示している。

第２表

種々の遺伝子構築物のＧＧＰＰシンターゼ活性のＲ．スィェロイデスとの比較

構築物	活性(nmol/分/ mg 蛋白質)
R．スィェロイデス 2.4.1	０．２０
ｐＡＲＣ３７６	０．１８
ｐＡＲＣ４９１	７．９１
ｐＡＲＣ４１７ＢＨ	６．３５
ｐＡＲＣ４１８ＢＨ	０
ｐＡＲＣ４８９Ｂ	１２．１５
ｐＡＲＣ４８９Ｄ	２３．２８

ｈ．GGPPシンターゼの性質決定

プラスミドpARC489BとpARC489Dは大腸菌株JM101（BRL）に導入された。これらの細胞はRec7プロモーターを誘導するためにナリジキシ酸で処理され、これによりGGPPシンターゼ酵素の大量生産が行われた。これらの細胞からのタンパク質抽出物はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で分離された。これらの条件下で生産されるGGPPシンターゼは極めて大量であるため、これはSDS-PAGE系でクマシー・ブリリアント・ブルーによる染色で容易に同定可能である。単離され、実質的に精製されたGGPPシンターゼは、次に通常の方法によってゲルから回収されることができる。

プラスミドpARC489Bを含む細胞によって生産されたエルウィニア　ヘルビコラGGPPシンターゼは約35kDのサイズをもつタンパク質であり、完全な、本来の状態の分子であると考えられているが、プラスミドpARC489Dを含む細胞によって生産されたGGPPシンターゼは約33kDのサイズをもつタンパク質だった。したがって、5'の１３アミノ酸残基の欠失と、４残基からなる非エルウィニア　ヘルビコラ配列による置換は、BA1I部位とEcoRV部位の間の約151bpの3'側の欠失と併せて、約2kD小さいタンパク質を生産したが、しかし、本来の分子よりもはるかに活性が高かった。プラスミドpARC489Dに存在するGGPPシンターゼ構造遺伝子は大腸菌、Ｓ．セレビシエおよび高等植物においてGGPPシンターゼとして用いられるために最も好ましい遺伝子である。

ｉ．Rec7により引き起こされるタンパク質生産の導入

上述したプラスミドpARC417B、pARC489BおよびpARC489Dを用いた大腸菌におけるGGPPシンターゼの生産は、Rec7プロモーターを用いて行われた。以下で述べられるプラスミドpARC140Nを用いた、大腸菌内でのフィトエン・シンターゼ生産も、Rec7プロモーターを用いて行われた。形質転換された大腸菌細胞の生育のための培養条件は以下のものである。

新鮮な（２日以内）形質転換細胞を含むプレートから単コロニーが取られ、50μg/mlのアンピシリンを含むM9+CAGM培地（培地の組成に関しては下記の第３表を参照）で一夜（例えば15-18時間）、３０℃で培養した。細胞の培養は細胞を1:100で新鮮なM9+CAGM培地に希釈し、求められる温度に培養を維持することによって２７から３７℃の種々の温度で生育させられた。それぞれの培養は、大体求められる濃度の１と１／２になるまで（振とう

培養で、150-180クレット単位）生育させられた。次にこの培養は、終濃度50μg/mlまでナリジキシ酸を添加することによって誘導された。誘導されるべき培養1mlあたり、0.1NのNaOHに溶解した、新しく調製した10mg/mlナリジキシ酸保存溶液5μlが用いられた。誘導はナリジキシ酸添加後２から４時間続けられた。

第３表

A. M９＋ＣＡＧM培地組成

構成成分	グラム／リットル
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	１３．２
KH_2PO_4	３．０
NaCl	０．５
NH_4Cl	１．０
カザミノ酸（ディフコ）	１０．０
$MgSO_4$	０．３
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	０．００４
グルコース（振とうフラスコ）	３．０
チアミン－HCl	０．０２５
$FeCl_3$	０．００５４
$ZnSO_4$	０．０００４
$CoCl_2$	０．０００７
Na_2MoO_4	０．０００７

$CuSO_4$	0．0008
H_2BO_3	0．0002
$MnSO_4$	0．0005

B．　培地組成

振とうフラスコ用Ｍ９＋ＣＡＧＭ（１リットル）

９００ml	蒸留水	オートクレーブ
４０ml	２５×Ｍ９塩類	オートクレーブ
５０ml	２０％（Ｗ／Ｖ）カザミノ酸	濾過滅菌
６．４ml	４０％（Ｗ／Ｖ）グルコース	オートクレーブ
１．２ml	１Ｍ　ＭｇＳＯ	オートクレーブ
０．２５ml	０．１Ｍ　$CaCl_2$	オートクレーブ
０．２５ml	０．１％（Ｗ／Ｖ）チアミン－ＨＣｌ	濾過滅菌
０．１ml	１０，０００×微量ミネラル	濾過滅菌
０．１ml	１０，０００×鉄補強剤(Iron Supplement)	濾過滅菌

すべての構成成分は別々に滅菌され、室温まで冷却後混合すべきである。

C．２５×Ｍ９塩類（１リットル）

構成成分	グラム
$Na_2HPO_4．7H_2O$	３３０
KH_2PO_4	７５
NH_4Cl	２５

蒸留水で１リットルにする。

D．１０，０００×微量ミネラル（２００ml）

構成成分	グラム
$ZnSO_4$	0．8
$CoCl_2$	1．4
Na_2MoO_4	1．4
$CuSO_4$	1．6
H_2BO_3	0．4
$MnSO_4$	1．0

２００mlの水に溶解し、１滴の発煙ＨＣｌを加え、濾過滅菌する。

E．１０，０００×鉄補強剤

構成成分	グラム
$FeCl_3$	１０．８

２００mlの水に溶解し、１滴の発煙ＨＣｌを加え、濾過滅菌する。

それぞれの培養液は常に高い通気条件下におかれた。250mlのサイドアーム・フラスコに15mlの培養を入れたものが通常分析用に用いられ、ファーンバッハ(2.81)フラスコに330mlの培養を入れたものが、半調製的な場合に通常用いられた。
これまで調べられたタンパク質すべての生産は、誘導期の強力な通気に完全に依存している。

ｊ．酵素アッセイ
GGPPシンターゼは以下に述べられるようにして細胞の細胞質において調製された。
（１）細胞質の調製
増殖している細胞は細胞沈澱を形成するまで遠心された。この細胞沈澱物は、15mlのコニカル試験管に入れた10%グリセロール、0.1mM EDTAを含む50mMのリン酸カリウム緩衝液、pH7.0に再懸濁され、酸で洗浄したガラス・ビーズ（酵母細胞には425-600ミクロン、バクテリア二は75-150ミクロンのものがよく用いられる）とともに１分間ボルテックスにかけられ、氷上で１分間冷却された。これは、３回繰り返され、その後、細胞破砕物はもう１つの試験管に移され、４℃で17,000×g、60分間遠心された。次にこの上清は、４℃で150,000×g、60分間遠心された。そして、得られた上清は細胞質であった。
（２）GGPPシンターゼアッセイ
細胞質はIPP-イソメラーゼ活性を阻害するために、10uMのエポキシ-イソペンテニル・ピロリン酸(IPP)とともに、４℃で20分間プレインキュベーションされた。10mMヘペス緩衝液（pH7.0、1mM MgCl2,1mM DTT）中で、40uMのファルネシル・ピロリン酸(FPP)と40uMの14C-IPP(250,000dpm)を含む、1mlの総容量のプレインキュベーションした細胞質中のアッセイ混合液は37℃で30分間インキュベーションされた。
反応は、アッセイ混合液をあらかじめ（ドライアイス中で）冷却した試験管に移し、８時間凍結乾燥することによって止められた。乾燥された残留物は0.5mlの0.1Mグリシン緩衝液（pH10.4、1mM MgCl2,1Mm ZnCl2）に再懸濁され、２５単位のアルカリ・ホスファターゼにより、３７℃で３時間処理された。このアルカリ・ホスファターゼ反応は、ピロリン

酸をそれに対応するアルコールに変換し、これはヘキサンで抽出され、窒素蒸気のもとで乾燥するまで減圧乾燥され、150μlのメタノールに再懸濁された。
このメタノール溶液のうち75μlが85%メタノール：水(4:1)と15% THF:CH3CN(1:1)で平衡化したC-18エコノスフェア・アルテック分析カラム（4.6×250mm、5ミクロン粒子サイズ）に連結されたHPLCに注入された。1.5ml/分の流速で、20分間80%メタノール:水(4:1)と20% THF:CH3CNに至る直線濃度勾配により、このアルコールが分離された。HPLCは一連のラジオマッティク・フロー検出器に連結され、これは放射活性ピーク、例えばジェラニルジェラニオール(GGOH)ピークを積分する。比活性は与えられたアッセイ条件下におけるnmol GGOH生成/分/mgタンパク質で表された。タンパク質はBSAを標準物質としてブラッドフォード法によって決められた。

実施例３．フィトエン・シンターゼ遺伝子

ａ．PstIによるpARC376の切断

プラスミドpARC376-Pst122は、プラスミドpARC376（第５図）の約5807のPstI部位から、約5215の約59bpのPstIエルウィニア　ヘルビコラ DNA 断片を欠失し、２つの断片の大きい方の断片を再連結することによって作製された。求められるエルウィニア　ヘルビコラ DNA 断片を含むプラスミドpARC376-Pst122由来のEcoRI（約3370）からHindIII（約13463）断片はプラスミドpARC305Aにクローン化され、その結果プラスミドpARC139が生成した。
プラスミドpARC305Aは、pUC18由来のポリクローニング・リンカー、大腸菌においてクロラムフェニコール耐性を賦与するクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(CAT)およびpMB1複製開始点を含んでいる。プラスミドpARC305Aは、プラスミドpARC305AがCAT選択マーカーを含むが、pUC18はアンピシリン選択マーカーを含んでいる点を除いて、プラスミドpUC18と類似のプラスミドである。
この結果得られたエルウィニア　ヘルビコラ DNA は、プラスミドpARC139を作製するためにプラスミドpARC305Aに挿入され、大腸菌細胞に導入された際、予想されたように、カロテイドは全く生産されなかった。
フィトエン・シンターゼ遺伝子の損傷は、大腸菌細胞が発色性のカロテイドを全く生産できなくしてしまうだろう。したがって、この592bpの領域の欠損はフィトエン・シンターゼ遺伝子の削除された部分を含んでいる可能性がある。

ｂ．プラスミドpARC285の構築

プラスミドpARC285の構築は、プラスミドpARC376-Bam100由来の約1112bpのNcoIからEcoRIまでの断片を用いた。プラスミドpARC376-Bam100は、約3442から約4482の位置（第５図）のほぼ1045bpのBamHI断片、および約4487から約5302（第５図）の、ほぼ815bpのBamHI断片が削除されたプラスミドpARC376プラスミドの誘導体である。全体で約1860ヌクレオチドがpARC376プラスミドから除かれた。プラスミドpARC376からのBamHI断片を削除した結果、3'端の約5354の位置のBamHI部位は、本来プラスミドpARC376の約3370の位置にあったEcoRIの内側約72ヌクレオチドに置かれた。したがって、この結果生じた制限酵素断片は約1112bpを含み、それぞれ5'端と3'端でNcoIとEcoRI制限酵素部位に囲まれていた。
フィトエン・シンターゼ遺伝子は約1040bpのNcoIからBamHI制限酵素断片（それぞれ第５図の約6342と5302の位置に対応する）に含まれているが、それは約1112bpのNcoIからEcoRI断片として他のプラスミドにクローン化することができる。約1112bpのNcoIからEcoRIの断片を、プラスミドpARC376-Bam100から切り出し、プラスミドpARC306AのNcoIからEcoRI部位にクローン化し、プラスミドpARC285が作製した。このように、フィトエン・シンターゼ遺伝子に関連した部分は約1112bpのNcoIからEcoRI断片として、プラスミドpARC285から切り出すことができる。

ｃ．プラスミドpARC140Nの構築

NcoI（約6342の位置）部位を囲む領域の分析は、NcoI部位の内側のメチオニンコドンは１３アミノ酸残基上流のもうひとつのメチオニンコドンをもつオープン・リーディング・フレームの中にあることを明らかにした。このメチオニンコドンのすぐ上流には、原核生物の遺伝子の開始コドンの上流でしばしば見いだされるリボソーム結合部位(AGGA)に対する

コンセンサス配列が存在した。
この上流のメチオニンが本当の開始コドンなのかを決めるために、上述のようにin vitro突然変異誘起法を用いて、BglII部位がNcoI部位内のメチオニンコドンからすぐ上流に導入された。一方の末端にNcoI突出部をもち、他方にBglII突出部を含む２種類の相補的ポリヌクレオチド配列が作製された。この配列は以下の通りである。

BglII NcoI

5' (SEQ ID NO:26) 3'

GATCTAAAATGAGCCAACCGCCGCTGCTTGACCACGCCACGCAGAC

ATTTTACTCGGTTGGCGGCGACGAACTGGTGCGGTGCGTCTGGTAC

3' (SEQ ID NO:27) 5'

２種類の相補的シングル・ストランドポリヌクレオチド配列は互いにハイブリダイゼーションされ、約1040bpのNcoIからBamHIのフィトエン・シンターゼ遺伝子領域を含む約1112bpのNcoI-EcoRI断片に連結され、プラスミドpARC135にクローン化された。
プラスミドpARC135（第７図に示されている）は、唯一のBglII部位で分離される酵母のPGKプロモーターと終結配列を含む、pUC18ベクターからなっている。
まず、PGK遺伝子を含む酵母（Ｓ．セレビシエ）の約3.1kbのHindIII断片がpUC18のHindIII部位にクローン化され、プラスミドpSOC117が作製された（ここではpARC117とも呼ばれる）。つぎに、mp19M13クローンに含まれるPGK遺伝子の開始ATGコドンの上流に、BglIII部位がオリゴヌクレオチド突然変異誘起法によって導入され、下で強調文字で示された改変が生じた。

本来のPGK配列： Met Ser Leu

....ACAACAAAATATAAAAACA ATG TCT TTA

(SEQ ID NO:28)

新たなPGK配列：

....ACAACAAGATCTAAAAACA ATG TCT TTA

(SEQ ID NO:29)

BglII部位

そして、導入されたBglIII PGK部位をもった約1.1kbのBstXI断片がmp19クローンから切り出され、プラスミドpSOC117の相同なBstXI断片を置換するために用いられた。最後に、PGK構造遺伝子の大半を含むBglII断片はBglII切断により除かれ、このプラスミドはプラスミドpARC135を得るために再連結された。プラスミドpARC135はNcoIとEcoRIで切断され、この結果得られた遺伝子は以下で述べるように、この後操作され、プラスミドpARC140Rを生じたが、これはBglII部位においてＳ．セレビシエのホスフォグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーターを含んでいる。
プラスミドpARC140Rの構築のための実験法は、以下に述べられている。
Ａ．２種類のオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション／アニーリング（オリゴヌクレオチドプローブは、5'端がリン酸化されていない。）
１）２種類の相補的オリゴヌクレオチドプローブは、以下のものを含む25μlの溶液中でアニールされた。
10μlのオリゴヌクレオチド #1 （約1μg）
10μlのオリゴヌクレオチド #2 （約1μg）
1.65μlの1M Tris-C12（pH8.0）
2.5 μlの100mM MgCl2

0.45μlの水
２）このプローブ溶液は65℃で10分間インキュベーションされた。次に、これは次の処方にしたがって冷却された。
55℃で20分
42℃で20分
37℃で20分
室温（24℃）で30分
Ｂ．約1040bp(NcoIからBamHI)の配列を含む、プラスミドpARC285のNcoIからEcoRIの約1112bp断片が切り出され、ゲルから単離された。この約1112bpの断片は、短縮された型のフィトエン・シンターゼ遺伝子を含んでいた。
Ｃ．以下のプロトコルにしたがって、アニールされたオリゴヌクレオチドプローブを約１１１３ｂｐの断片（ＮｃｏＩ－ＥｃｏＲＩ）に一晩かけて連結した（１５℃において１５時間）：

アニールされたオリゴヌクレオチド	２５μｌ
ＮｃｏＩ－ＥｃｏＲＩ断片	２０μｌ（約１μｇ）
１０×　ライゲーション　バッファー	５μｌ（ＩＢＩ社）

Ｔ４リガーゼ（ベーリンガーマンハイム(Boerhinger-Mannhein)社）
ライゲーションの結果は以下のとおりであった：

```
BglII  NcoI                BamHI  EcoRI
   I-------I----------------------I-------I
```

Ｄ．続いて混合物をフェノールで抽出し、クロロホルム：イソアミルアルコール（２４：１）で抽出し、そしてエタノールで沈殿させた。ＤＮＡの沈殿を２７μｌの水に再懸濁した。
Ｅ．そしてＤＮＡ抽出物をＥｃｏＲＩで３７℃において３０分間消化して、ライゲーション中に形成されるすべてのダイマーを除去した。

ＤＮＡ断片	２７μｌ
ＥｃｏＲＩ消化バッファー（ＢＲＬ）	３μｌ
ＥｃｏＲＩ（ＢＲＬ）	３μｌ（３０ユニット）

Ｆ．ＥｃｏＲＩ消化物を０．７パーセントアガロースゲル電気泳動により分離した。約１１５８ｂｐの断片をゲルから単離した。
Ｇ．このＢｇｌＩＩからＥｃｏＲＩまでの断片を以下のようにしてプラスミドｐＡＲＣ１３５のＢｇｌＩＩおよびＥｃｏＲＩ部位にクローン化した。約５μｇのプラスミドｐＡＲＣ１３５をＢｇｌＩＩおよびＥｃｏＲＩにより切断し、そして０．７パーセントアガロースゲルにおいて展開した。約４ｋｂのＤＮＡ断片を単離した。完全長のフィトエンシンターゼ遺伝子を含む約１１５８ｂｐのＢｇｌＩＩからＥｃｏＲＩまでの断片を以下のプロトコルにしたがって約４ｋｂのベクターのＢｇｌＩＩ部位とＥｃｏＲＩ部位の間にクローン化した。

ｐＡＲＣ１３５　BglII/EcoRI分解物	１０μｌ（約０．２μｇ）
ＢｇｌＩＩからＥｃｏＲＩまでの断片	２０μｌ（約０．５μｇ）
１０×　ライゲーションバッファー	３μｌ
Ｔ４リガーゼ	２μｌ（４ユニット）

反応物を１５℃において一晩インキュベートした（約１５－１８時間）。
Ｈ．ライゲーションされたＤＮＡをＢＲＬから購入したＤＨ５－α大腸菌にクローン化した。
Ｉ．形質転換体を１００μｇ／ｍｌのアンピシリン存在下で生育させた。可能性のあるクローンをアンピシリンの存在下で生育させることによりクローン化されたＤＮＡ断片を含むコロニーを同定し、該クローンのプラスミドＤＮＡをアルカリ溶菌法により単離して制限酵素分析を行った。このクローニング法の結果から所望の遺伝子を含むプラスミドをｐＡＲＣ１４０Ｒと命名した。

ＡＴＧメチオニンコドンの上流に３つのアデニン残基を導入した。開始コドンに隣接したアデニン残基の存在はサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）において高頻度に発現される遺伝子と相互的に関連している。これらの残基を配列中に挿入することにより、サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中で遺伝子が高頻度に発現される（ハミルトン（Ｈａｍｉｌｔｏｎ）ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１５：３５８１　１９８７）。プラスミドｐＡＲＣ１４０Ｒはフィトエンシンターゼに隣接して、サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）遺伝子のプロモーターを含む。

修飾されたフィトエンシンターゼ構造遺伝子を約１１５８ｂｐのＢｇｌＩＩ－ＥｃｏＲＩ断片としてプラスミドｐＡＲＣ１４０Ｒから切り出し、処理し、そしてプラスミドｐＡＲＣ３０６Ｎにクローン化することによりプラスミドｐＡＲＣ１４０Ｎを作製した。プラスミドｐＡＲＣ３０６Ｎは、大腸菌Ｒｅｃ　７プロモーターに隣接したＮｃｏＩ部位の代わりにＮｄｅＩ部位を有すること以外はプラスミドｐＡＲＣ３０６Ａと同一である。

より特定すれば、プラスミドｐＡＲＣ３０６ＮをＮｄｅＩで消化し、そしてＳ１ヌクレアーゼで分解することにより前者のＮｄｅＩ部位を平滑末端に変えた。その後プラスミドをＥｃｏＲＩで消化することにより一方の平滑末端を除去し、そしてＥｃｏＲＩ付着末端を付与した。

プラスミドｐＡＲＣ１４０ＲをＢｇｌＩＩで消化し、そしてＳ１ヌクレアーゼを用いて平滑末端を生じさせた。切断され、そして平滑末端化されたプラスミドをさらにＥｃｏＲＩで消化することにより、フィトエンシンターゼ構造遺伝子を含むＤＮＡの一方の平滑末端を除去し、そして他方の末端をＥｃｏＲＩ粘着末端にした。したがって該構造遺伝子は一方の末端が平滑末端で他方の末端がＥｃｏＲＩ切断末端である約１１６４ｂｐの断片中に存在する。

上記フィトエンシンターゼ構造遺伝子を含むＤＮＡセグメントを、上記切断プラスミドｐＡＲＣ３０６Ｎの平滑末端とＥｃｏＲＩ部位に連結し、これら２つのＤＮＡセグメントを機能的に連結してプラスミドｐＡＲＣ１４０Ｎを作製した。フィトエンシンターゼ構造遺伝子を含むＤＮＡ断片は、約１１７６ｂｐのＨｐａＩ－ＥｃｏＲＩ断片、約１２３８ｂｐのＰｖｕＩＩ－ＥｃｏＲＩ断片あるいはより大きな断片として、ＥｃｏＲＩ部位の下流のポリリンカー部位内の制限部位の一つを使用してプラスミドｐＡＲＣ１４０Ｎから切り出すことができる（図６を参照）。

プラスミドｐＡＲＣ１４０ＮをプラスミドｐＡＲＣ１３９を含む大腸菌細胞に移入したが、ｐＡＲＣ１３９はフィトエンシンターゼ遺伝子の一部を欠失し、そしてそのために大腸菌細胞は色のついたカロチノイドを産生することができない。プラスミドｐＡＲＣ１４０ＮをプラスミドｐＡＲＣ１３９を含む大腸菌細胞に加えると、該細胞は色のついたカロチノイドを産生した。このことは修飾されたフィトエンシンターゼ遺伝子が機能的な酵素をコードしていることを証明した。

前に論じられたプロトコルにしたがい、プラスミドｐＡＲＣ１４０Ｎを含む大腸菌細胞をナリジキシン酸で誘導することにより大量のフィトエンシンターゼ蛋白質を産生した。蛋白質画分を単離し、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析することによりフィトエンシンターゼの大きさは３８キロドルトンである事が明らかになった。

実施例　４．　大腸菌内でのフィトエンの生産

ａ．方法１－遺伝子操作されたＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子を含むプラスミド

ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子、並びに構造遺伝子に隣接して結合しているプロモーター調節領域を含むプラスミドにより、このプラスミドを含む大腸菌はフィトエンを生産する。そのようなプラスミドの構成物の一つの実施例としては、プラスミドｐＡＲＣ４８９Ｄ由来のＧＧＰＰシンターゼ構造遺伝子を使用し、大腸菌内で機能するプロモーターをＧＧＰＰシンターゼ構造遺伝子の５’末端に隣接させる。この構成物を一般的なクローニングベクター例えばｐＵＣ１８に導入する。構造遺伝子を共に連結すれば単一のプロモーターが大腸菌内で機能することにより両方の遺伝子産物を発現する。

プラスミドｐＡＲＣ１４０Ｒから切り出された前述のフィトエンシンターゼ構造遺伝子を大腸菌内で機能するプロモーター例えばＲｅｃ　７に隣接してクローン化する。そしてこのＲｅｃ　７プロモーター－フィトエンシンターゼ雑種遺伝子をＧＧＰＰシンターゼを含むプラスミドに導入する。これらの遺伝子両方を含むプラスミドは大腸菌内におけるフィトエン合成を指示する。２つの遺伝子は末端同志でつないで単一のプロモーターの制御下で大腸菌に挿入され得る。

ｂ．方法２－欠損フェトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を持つプラスミドｐＡＲＣ３７６

フィトエンの生産は、ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子の両方が機能し、そして作用を示す蛋白質を生産するが、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を欠損しており、そのことによりフィトエンからのリコペンの生産が阻害される無加工のｐＡＲＣ３７６プラスミドを用いて行うことができる。フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子が欠失しているかまたは他の方法により欠損しているプラスミドｐＡＲＣ３７６の誘導体は、ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子の作用により、大腸菌内で生産されたフィトエンをさらに代謝することができない。この条件においてフィトエンは蓄積する。フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子は図５に示すとおり、プラスミドｐＡＲＣ３７６の約７８４９番目から６３８０番目の範囲に位置する。

実施例により、前述のとおりフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の開始部位に欠失を含むｐＡＲＣ３７６由来の２つの相違するプラスミドを作製した。一方のプラスミドは約２７４９ｂｐのＢａｍＨＩ断片の約７７７５番目の位置から約１０５２４番目の位置（図５）を欠失させたｐＡＲＣ３７６－Ｂａｍ１２７である。他方は７７９２－１０７９１（図５）の位置のＰｓｔ断片を欠失したプラスミドｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ１１０である。これらのプラスミドはプラスミドｐＡＲＣ３７６をＢａｍＨＩあるいはＰｓｔＩで部分消化し、そしてそれぞれのＤＮＡ断片を連結することにより構築した。

これらの欠失によりフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子は機能しなくなるが、それは遺伝子の開始部分が欠失したからである。プラスミドｐＡＲＣ３７６－Ｂａｍ　１２７またはｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ　１１０のどちらかを持つ大腸菌細胞はフィトエンを生産する。フィトエンは無色であり、フィトエンを生産する細胞も正常な大腸菌細胞と同様に無色である。連結物の混合物を用いて大腸菌を形質転換し、その結果得られた無色のコロニーすべてに関してフィトエンの存在を確かめた。プラスミドを含む大腸菌細胞を生育させ、以下のプロトコルにしたがって抽出を行い、抽出物のＨＰＬＣ分析によりフィトエンを同定することによりフィトエンの存在が確認された。

ｃ．形質転換された大腸菌により生産されたフィトエンの同定

ｉ．細胞からの抽出

前述のプラスミドを含む１００ｍｇから５００ｍｇの凍結乾燥された大腸菌細胞を、テフォロン製シールキャップをもつ１５ｍｌのコニカルビーカー内で３ｍｌの７：２のアセトン：メタノールに再懸濁した。４５０から６００ミクロンのガラスビーズ（細胞に対して１：１の比率）をビーカーに加え、そしてホイルをかぶせて２分間テックス撹拌した。５分後、ビーカーを卓上遠心分離機により分離し、上清をホイルで覆ったガラスのバイアルに移した。この抽出は何度も繰り返された。

抽出物のプール全てを０．２ミクロンのアクロディスク（Ａｃｒｏｄｉｓｃ）ＣＲフィルターを通してガラスシリンジ内へ濾過し、そして濾液を窒素下で乾燥した。細心の注意をはらってカロチノイド／キサントフィルを光および高温から遮断した。

ｉｉ．同定

フィトエンの存在は３つの別々の溶剤系により真正フィトエンを対照として薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）によりモニターされた。

カロチノイド／キサントフィルをヒュレット　パッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ）Ｃ－１８　Ｖｙｄａｃ分析カラム（４．６×２５０ｍｍ、５ミクロン粒子サイズ）を用いて高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により分離した。３０パーセントイソプロパノール、７０パーセントアセトニトリル：水（９：１）から５５パーセントイソプ

ロパノール、４５パーセントアセトニトリル：水（９：１）まで、３０分間、１ｍｌ／分の流速で直線密度勾配をかけることにより、興味ある化合物のほとんどが以下の保持時間において分析された－ゼアキサンチン８．７分、リコペン１６．２分、ベーターカロテン１８．１分、ファイトフルエン１９．９分、フィトエン２１．８分、そしてゼアキサンチンジグルコシドは６分から８分の間に分布した。
これらの細胞において生産されたフィトエンの量は平均約０．０１パーセント（乾燥重量）であった。
実施例５．　サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）におけるフィトエンの生産
サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）はフィトエンの生産のために必要な機能性の遺伝子を持たないので、通常カロチノイドを生産しない。しかしながらサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）はファルネシルピロリン酸（ＦＰＰ）を生産する。サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）においてフィトエンを生産させるためには、機能的な酵素を発現させるために適正な配置により、ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子をサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞に移入させる必要がある。
ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼの構造遺伝子の５’末端にサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）において機能するプロモーター配列を隣接して配置する必要があり、ターミネーション配列も遺伝子の３’末端に配置されうる。サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）における発現のために適正な制御配列を含むＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子は、次にサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞に移入される。
ａ．ｐＡＲＣ１４５Ｂの構築
最初にクレノーポリメラーゼを使用して、２ミクロンの複製開始点を含む酵母のＢフォームの２ミクロンの円を有するＥｃｏＲＩ断片に平滑末端を作ることによりベクターｐＳＯＣ７１３（図８）を作製した。そして平滑末端をもつ断片をｐＵＣ１８のＳｍａＩ部位にクローン化した。ｐＵＣ１８構成物をＲｃｏＲＩおよびＢａｍＨＩで消化することにより２ミクロンの断片を切り離した。このＥｃｏＲＩ－ＢａｍＨＩ断片を、ＴＲＰ　１遺伝子を含む酵母のＤＮＡのＥｃｏＲＩ－ＢａｌＩ断片に連結した。２ミクロン断片に連結したＴＲＰ　１を含むＤＮＡをＥｃｏＲＩ断片としてｐＵＣ１８のＥｃｏＲＩ部位に連結した。最後に、互いに逆方向を向いているＧＡＬ　１０およびＧＡＬ　１プロモーターを含む酵母のゲノム領域をＥｃｏＲＩ／ＢａｍＨＩ断片として、ＥｃｏＲＩおよびＢａｍＨＩで消化された上記ＴＲＰ　１／２ミクロン／ｐＵＣ１８プラスミドに連結した。プラスミドｐＳＯＣ７１３の制限地図を図８に示す。
プラスミドｐＳＯＣ７１３を３カ所変化させることによりプラスミドｐＡＲＣ１４５Ｂを作製した（図９）。最初に、プラスミドｐＳＯＣ７１３をＥｃｏＲＩで部分消化し、そして末端をクレノーポリメラーゼにより平滑にし、そして自己連結させた。その結果生じたプラスミドは、ＧＡＬ　１プロモーター領域に隣接してＥｃｏＲＩ部位を一か所だけ含んでいた。このプラスミドをＥｃｏＲＩにより消化し、そして下記の合成オリゴヌクレオチド

5’　ＡＡＴＴＣＣＣＧＧＧＣＣＡＴＧＧＣ　3’　(SEQ ID NO:30)

3’　ＧＧＧＣＣＣＧＧＴＡＣＣＧＴＴＡＡ　5’ (SEQ ID NO:31)

をＥｃｏＲＩ部位に連結した。この再生された一か所のＥｃｏＲＩ部位はＳｍａＩおよびＮｃｏＩ部位に続く。最後に、一か所のＢａｍＨＩ部位を切断し、クレノーポリメラーゼを用いて埋め、合成ＢｇｌＩＩリンカーオリゴヌクレオチド
ＣＡＧＡＴＣＴＧ
ＧＴＣＴＡＣＴＧ
を連結し、ＢｇｌＩＩにより消化し、そして２つのＢａｍＨＩ部位にはさまれたＢｇｌＩＩ部位を作るために自己連結させた。プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｂの制限地図を図９に示

す。
６．プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｇの構築
プラスミドｐＡＲＣ４８９Ｄに含まれ、上記大腸菌においてもっとも活性のある酵素をコードする、遺伝子工学的に作られたＧＧＰＰシンターゼ遺伝子をサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のベクターｐＡＲＣ１４５Ｂに移し変えることによりプラスミドｐＡＲＣ１４５Ｆを作製した。これはプラスミドｐＡＲＣ４８９ＤをＮｃｏＩおよびＰｖｕＩＩで消化してＧＧＰＰシンターゼの構造遺伝子を含む約１０００ｂｐのＮｃｏＩ－ＰｖｕＩＩ制限断片を得ることにより達成された。ＮｃｏＩリンカーを該制限断片のＰｖｕＩＩ部位に付加することにより、約１０１０ｂｐを含むＮｃｏＩ－ＮｃｏＩ断片を作製した。このＧＧＰＰシンターゼ遺伝子をサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の逆向きプロモーター領域ＧＡＬ　１０およびＧＡＬ　１に隣接してクローン化し、その結果ＧＧＰＰシンターゼ遺伝子がＧＡＬ　１０プロモーターを使用してサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）において発現されるようにした。
プラスミドｐＡＲＣ１４０Ｒ（図２）由来のフィトエンシンターゼ遺伝子を切り出し、そしてプラスミドｐＡＲＣ１４５ＦのＧＡＬ　１プロモーターの反対側に隣接して配置し、その結果フィトエンシンターゼ遺伝子がＧＡＬ　１プロモーターを使用しても発現されるようにした。したがって、サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）遺伝子ＰＧＫ由来の転写終結配列をフィトエンシンターゼ遺伝子の３’末端にクローン化した。
より特定すれば、プラスミドｐＡＲＣ１４５ＦをＢｇｌＩＩおよびＳｐｈＩにより消化したが、それらの制限部位は図９の前駆体プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｂに示されている。フィトエンシンターゼ構造遺伝子を約１１５８ｂｐのＢｇｌＩＩ－ＥｃｏＲＩ断片としてプラスミドｐＡＲＣ１４０Ｒから切り出した。同じ構造遺伝子はプラスミドｐＡＲＣ１４０Ｎの約１１７６ｂｐのＨｐａＩ－ＥｃｏＲＩ断片中に存在する。他のプラスミドｐＡＲＣ１１７由来の約５００ｂｐのＰＧＫ終結配列をＥｃｏＲＩ－ＳｐｈＩ断片、例えば図７のプラスミドｐＡＲＣ１３５に示されている同じ断片として切り出した。ＢｇｌＩＩ－ＳｐｈＩで切断したプラスミドｐＡＲＣ１４５Ｆ、プラスミドｐＡＲＣ１４０Ｒの約１１５８ｂｐのＢｇｌＩＩ－ＥｃｏＲＩ断片および約５００ｂｐのＥｃｏＲＩ－ＳｐｈＩ　ＰＧＫ転写終結配列、の３断片を一度に機能的に連結した。
この連結によりフィトエンシンターゼ構造遺伝子をその５’末端のＧＡＬ　１プロモーターに隣接して該プロモーターの制御下になるように配置した。ＰＧＫ終結配列はフィトエンシンターゼ構造遺伝子の３’末端に配置した。結果として生じたプラスミドは、ＧＡＬ　１０およびＧＡＬ　１の逆向きプロモーターの制御下にフィトエンの生産に必要な両方の遺伝子を含み、プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｇと命名された。該プラスミドを図１０に示す。プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｇの他の主要な特徴はサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の2ミクロンの複製開始点およびサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のＴＲＰ　１遺伝子を選択マーカーとして含むことである。
プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｇを、機能的なＴＲＰ　１遺伝子をもたないサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＹＰＨ４９９株［フィリップ　ハイター（Ｐｈｉｌｌｉｐ　Ｈｅｉｔｅｒ）博士、ジョーンズ　ホプキンス（Ｊｏｈｎｓ　Ｈｏｐｋｉｎｓ）大学より提供された］に移入した。この株は炭素源としてガラクトースを利用できる。形質転換体を単離し、細胞をガラクトース存在下において生育させることによりフィトエンを生産するための遺伝子を発現させるＧＡＬ　１０およびＧＡＬ　１プロモーターを誘導した。
サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞を以下に記述するフィトエン生産のための培地中で生育させた。ＹＰＨ４９９は欠損したＴＲＰ　１遺伝子および欠損したＵＲＡ　３遺伝子を含む酵母の株であり、炭素源およびエネルギー源としてガラクトースを利用することができる。この株は生育のため　生育培地中にトリプトファンおよびウラシルを要求する。別法としてこれらの株は、ＴＲＰ　１遺伝子を正常コピー数で

含むがＵＲＡ　３遺伝子を正常コピー数で含まないプラスミド（単数もしくは複数）で形質転換されているときは、該株の細胞は生育培地にウラシルの添加を要求し、あるいはＵＲＡ　３遺伝子は正常コピー数で含むがＴＲＰ　１遺伝子を正常コピー数で含まないもので形質転換されているときは、該株の細胞は生育培地にトリプトファンの添加を必要として、生育することができる。

このサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の株を生育させるために使用される４つの別々の培地が存在する。

培地１は、細胞がさらにＵＲＡ　３およびＵＲＡ　１遺伝子のどちらも含まない場合に使用される。

培地２は、細胞がＴＲＰ　１遺伝子のみを含むひとつまたは複数のプラスミドを含む場合に使用される。

培地３は、細胞がＵＲＡ　３遺伝子のみを含むひとつまたは複数のプラスミドを含む場合に使用される。

培地４は、細胞がＴＲＰ　１およびＵＲＡ　３遺伝子の両方を含むひとつまたは複数のプラスミドを含む場合に使用される。

培地の成分は以下のとおりである：

基本的な成分：

０．６７％　アミノ酸を含まない酵母窒素ベース（ディフコ社、＃０９１９－１５）；

２　％　ガラクトース；および

７２０ｍｇ／ｌ　ドロップアウト（Ｄｒｏｐｏｕｔ）混合物＊

＊ドロップアウト（Ｄｒｏｐｏｕｔ）混合物の成分

培地１（完全）

成分	量（ｍｇ）
アデニン	４００
ウラシル	４００
トリプトファン	４００
ヒスチジン	４００
アルギニン	４００
メチオニン	４００
チロシン	６００
ロイシン	１２００
リジン	６００
フェニルアラニン	１０００
スレオニン	４０００
アスパラギン酸	２０００

培地２はトリプトファンを含まない。

培地３はウラシルを含まない。

培地４はトリプトファンおよびウラシルを含まない。

ドロップアウト（Ｄｒｏｐｏｕｔ）混合物を調製するために、すべての所望の成分を乳鉢

に加え、乳棒により完全にすりつぶした。成分を完全に混合し、７２０ｍｇのドロップアウト（Ｄｒｏｐｏｕｔ）混合物を各１リットルの培地に加えた。
プラスミドｐＡＲＣ１４５ＧはＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ両遺伝子およびＴＲＰ　１遺伝子の正常なコピーを含む。ｐＡＲＣ１４５Ｇを含むサッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）細胞を、２パーセントのガラクトースを加えた培地２中で生育させた。
サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞に関してフィトエンの存在を分析した。総量で０．１２パーセント（乾燥重量）のフィトエンおよびフィトエンと重なるＵＶ－Ｖｉｓスペクトルを有する関連化合物が該細胞内に存在した。
実施例　６．　高等植物におけるフィトエンの生産
ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子を植物に移入するために、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）の遺伝子移入システムを使用することが好ましい。以前論じられたＧＧＰＰシンターゼの構造遺伝子はクロラムフェニコール　アセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）の構造遺伝子をＧＧＰＰシンターゼ遺伝子に置換することによりプラスミドｐＣａＭＶＣＮ（ファルマシア社）に導入される。エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のＧＧＰＰシンターゼは前記大腸菌プラスミドｐＡＲＣ４８９Ｄから誘導することが好ましいが、他のエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のＧＧＰＰシンターゼ構造遺伝子も使用できる。
ｐＣａＭＶＣＮ中のＧＧＰＰシンターゼ遺伝子はＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターに隣接しており、そしてＮＯＳポリアデニレーション部位はＧＧＰＰシンターゼ遺伝子の３’末端にある。この遺伝子構成物をプラスミドｐＧＡ４８２（ファルマシア社）に移入する。その結果得られるプラスミドの主要な特徴は（ｉ）アグロバクテリウム　チュメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）において保持されるための複製開始点を含み、（ｉｉ）植物細胞にカナマイシン耐性を付与するカナマイシン耐性遺伝子に隣接してＮＯＳプロモーターが存在し、（ｉｉｉ）植物に移入される所望の遺伝子を導入するためのポリクローニング部位が存在し、そして（ｉｖ）アグロバクテリウム　チュメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）のＴ－ＤＮＡ由来の境界配列が所望の遺伝子を植物のゲノムに挿入することを指示する、ことである。
プラスミドｐＡＲＣ１４０Ｒ、ｐＡＲＣ１４０Ｎ由来のフィトエンシンターゼ遺伝子、あるいは他の前述のフィトエンシンターゼ構造遺伝子をＣＡＴ遺伝子と置換してｐＣａＭＶＣＮに移入する。この遺伝子はＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターに隣接しており、そしてＮＯＳポリアデニレーション部位がフィトエンシンターゼ遺伝子の３’末端にある。この遺伝子を、既にＧＧＰＰシンターゼ遺伝子を含んでいるｐＧＡ４８２誘導体に移入する。その結果、ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ両遺伝子が植物中で発現できるような遺伝子構成物が得られる。
このベクターを適当なアグロバクテリウム　チュメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）株、例えばＡ２８１（ファルマシア社）またはＬＢＡ４４０４（クロンテック社）に移入する。実施例１ｂにおいてアグロバクテリウム　チュメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）を用いた前述の結果がフィトエンのみならずカロチノイド経路における付加的な酵素の導入、該酵素の発現、およびそれらのバクテリアにおけるフィトエンおよび他のカロチノイドの生産に成功したことを例証していることは注意に値する。
続いて、アグロバクテリウム　チュメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）細胞を植物細胞に感染させた後、ＧＧＰＰシンターゼ遺伝子およびフィトエンシンターゼ遺伝子を植物ゲノムに移入する。適当な植物とはタバコおよびアルファルファを含むが、他の植物も使用できる。これらの遺伝子はＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターを使用して成長している植物において発現され、そしてそれらの酵素は細胞質中に蓄積される。したがって、フィトエンは遺伝子工学的に作られた酵素および天然の普遍的

な前駆体から細胞質中で生産される。

実施例７．　高等植物の葉緑体におけるフィトエンの生産

ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ酵素を葉緑体に移入するために、葉緑体に蛋白質を移入させるための転移ペプチド配列をコードするＤＮＡ配列をフレームに合わせてこれら２つの酵素の遺伝子の最初に導入する。遺伝子構成の配置は順に、（ｉ）植物内で機能するプロモーター、（ｉｉ）転移ペプチドのＤＮＡ配列、（ｉｉｉ）カルテノイド構造遺伝子、そして（ｉｖ）植物のポリアデニレーション配列である。適例となるシステムを以下に論述する。

タバコ由来のリブロース２リン酸カルボキシラーゼ酵素の「小サブユニット」由来の転移ペプチドのＤＮＡ配列をオリゴヌクレオチドプローブから合成する。ＮｃｏＩ部位を転移ペプチド配列の５’末端の開始メチオニンコドンの位置に配する。ＳｐｈＩ部位を転移ペプチド配列の３’末端に配する。この転移ペプチド、その遺伝子およびその遺伝子の使用法に関する詳細な実施例１４に示す。

ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼのカルテノイド遺伝子をフレームを合わせて転移ペプチドのＳｐｈＩ部位に連結する。このキメラ遺伝子を、ＣＡＴ遺伝子に置換するようにしてプラスミドｐＣａＭＶＣＮ内にクローン化した。

これらの構築の結果からＤＮＡセグメントは（ｉ）転移ペプチド配列に隣接した植物のＣａＭＶ　３５Ｓプロモーター、その下流に（ｉｉ）ＧＧＰＰシンターゼあるいはフィトエンシンターゼのいずれかまたは両方の構造遺伝子、そしてその下流に（ｉｉｉ）ＮＯＳポリアデニレーション部位からなる。この遺伝子構成物をプラスミドｐＧＡ４８２に移入する。

ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子を含むｐＧＡ４８２プラスミドをアグロバクテリウム　チュメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）に移入する。ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子はアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）を用いた植物組織への感染に引き続いて移入される。

適当な宿主細胞はタバコおよびアルファルファおよびその他を含む。遺伝子はＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターにより発現され、転移ペプチド配列の存在により葉緑体において蛋白質が合成され、そして酵素が葉緑体の内部に放出される。遺伝子工学的に作られたエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子、そして普遍的な前駆体の作用を通してフィトエンが蓄積する。

実施例　８．　フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子

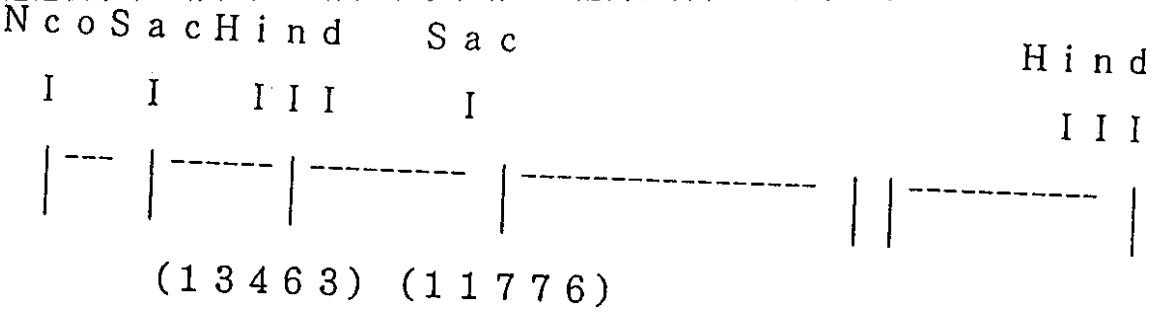
ａ．存在場所

フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子はプラスミドｐＡＲＣ３７６に見いだされる。このプラスミド上の該遺伝子の位置の概略的領域はｐＡＲＣ３７６プラスミドの特定の領域を欠失させ、そしてカルテノイドの生産を分析することにより見つけられた。修飾または変異したフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子が生ずれば、２つの酵素ＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼの存在により生産されるフィトエンは蓄積する。

ｐＡＲＣ３７６プラスミド（図５）を制限酵素ＢａｍＨＩまたはＰｓｔＩで部分消化し、そして遊離末端同志を共に連結した。このＤＮＡで大腸菌ＨＢ１０１を形質転換し、そして無色のコロニーを拾いあげてフィトエンの存在を分析した。２つの別々の欠失プラスミドにより大腸菌細胞内にフィトエンが蓄積したが、この２つのプラスミドとは２４７９ｂｐのＢａｍＨＩ断片（７７４５－１０５２４）の欠失をもつｐＡＲＣ３７６－Ｂａｍ１２７プラスミド、および２９９９ｂｐのＰｓｔＩ断片（７７９２－１０７９１）の欠失をもつｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ１１０プラスミドである。

プラスミドｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ１１０は以下のように構築された。プラスミドｐＡＲＣ３７６をＰｓｔＩにより部分消化してＤＮＡを連結し、連結混合物で大腸菌ＨＢ１０１を形質転換し、そして細胞を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを加えたルリア培地（Ｌｕｒｉａ－Ｂｒｏｔｈ）中で生育させた。プラスミドＤＮＡを単離し、そして制限酵素分析

を行うことにより形質転換体をスクリーニングした。２９９９ｂｐのＰｓｔＩセグメントのみを欠失したプラスミドを同定し、そしてｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ１１０と命名した。この欠失プラスミドはフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の最初の配列を含む。
前記２つのプラスミドのいずれかを含む大腸菌細胞に乾燥重量で約０．０２パーセントのフィトエンが蓄積した。このことは、欠失領域のどこかにフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子が存在することを示唆した。
ｂ．プラスミドｐＡＲＣ１３６の構築
約３３７０番目から約３７９番目のセグメント（図５）を除去することにより、プラスミドｐＡＲＣ３７６から約１２，０００ｂｐのＥｃｏＲＩ断片を得た。その結果得られたエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のカルテノイド遺伝子すべてを含む大きな断片を、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ＋プラスミド（ストラタジーン社、サンディエゴ）のＥｃｏＲＩ部位に挿入してプラスミドｐＡＲＣ１７６Ｂを得た。ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔプラスミドのＥｃｏＲＩ部位に隣接してＨｉｎｄＩＩＩ部位がある。プラスミドｐＡＲＣ３７６由来の挿入物中に他のＨｉｎｄＩＩＩ部位がある（１３４６３番目）。
プラスミドｐＡＲＣ１７６ＢをＨｉｎｄＩＩＩで消化することによりカルテノイド遺伝子すべてを含む約１０，２００の断片が得られた。この断片をプラスミドｐＡＲＣ３０６Ａ（前述または図６に示されている）のＨｉｎｄＩＩＩ部位にクローン化したその結果得られたプラスミドをｐＡＲＣ１３７Ｂと命名した。
プラスミドｐＡＲＣ１３７Ｂ中には２つのＳａｃＩ部位が存在するが、一方はプラスミドｐＡＲＣ３０６Ａのポリリンカー中に、他方は約１１７７６番目のＧＧＰＰシンターゼ構造遺伝子中に存在する（図５）。直線上の配列は以下のとおりである：



プラスミドｐＡＲＣ１３７ＢをＳａｃＩで切断することによりポリリンカー内のＳａｃＩ部位からから１１７７６番目のＳａｃＩ部位までの１７００ｂｐのＳａｃＩ断片を欠失させた。残りの大きな断片を連結してプラスミドｐＡＲＣ１３６を作製し、このプラスミドで大腸菌ＨＢ１０１を形質転換し、そしてこの大腸菌細胞を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを加えたルリア培地（Ｌｕｒｉａ－Ｂｒｏｔｈ）中で生育させた。
プラスミドｐＡＲＣ１３６を含む大腸菌細胞をナリジキシン酸で処理することによりＲｅｃ　７プロモーターを誘導した（前述のとおり）。生産された蛋白質の一つは５１キロドルトンの蛋白質であり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）による実験によりフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子であることが決定された。
この蛋白質を電気的に溶出し、Ｎ末端のアミノ酸配列を決定することにより最初の３０アミノ酸残基が決定された。プラスミドｐＡＲＣ３７６のＤＮＡ配列に対してこの５１キロドルトンの蛋白質の決定されたアミノ酸配列を比較したところ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子の開始部位はプラスミドｐＡＲＣ３７６の約７８４９番目に位置することが示唆された（図５）。
フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の３’末端は６８３６番目のＢｇｌＩＩ部位を越えている（図５）。プラスミドｐＡＲＣ１３６への挿入物のＢｇｌＩＩ部位を切断し、そして末端をＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片により平滑にし、再連結してから大腸菌細胞を形質転換した。これらの操作によりフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの阻害が引き起こされ、大腸菌内にフィトエンが蓄積したが、このことからフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子がＢｇｌＩＩ部位の下流に位置することが示唆された。

ｃ．プラスミドｐＡＲＣ４９６Ａの構築
プラスミドｐＡＲＣ３７６を制限酵素ＳａｌＩで消化することにより２つの隣接するＤＮＡ断片を切り出したが、一方は約１０９２ｂｐのＳａｌＩ断片（図５の９３４０番目から１０４３２番目）、他方は約３８３１ｂｐのＳａｌＩ断片（図５の１０４３２番目から１４２６３番目）である。残った断片の遊離末端同志を再連結してプラスミドｐＡＲＣ２７１Ｄを作製した。
フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子の開始メチオニンの位置のＮｃｏＩ部位を導入するために、約３０３５ｂｐのＳａｌＩ（９３４０）からＸｍｎＩ（図５の６３０５）までの断片をプラスミドｐＡＲＣ２７１Ｄから切り出した。この断片をアガロースゲル電気泳動において単離し、そしてポリメラーゼチェインリアクション（ＰＣＲ）のための鋳型として使用した。以下のオリゴヌクレオチドプローブが使用された：

ＮｃｏＩ

5' AAA CCA TGG AAA AAA CCG TTG TGA TTG GC 3' (SEQ ID NO:32)

ＰＣＲが正確に走るように、所望のＤＮＡ断片の正確な鎖が作製されるためには３’末端も増幅されなければならない。天然のＤＮＡ配列を保持する他方の鎖のオリゴヌクレオチドプローブの３’末端は：

ＮｃｏＩ（図５の６３４２番目のＮｃｏＩ部位）

5' GG C CAT GG T CTG CGT GGC GTG 3' (SEQ ID NO:33)

である。
ｄ．ＰＣＲ反応
ＧｅｎｅＡｍｐ　ＤＮＡ増幅試薬キット（パーキン　エルマー　シータス（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｃｅｔｕｓ））を使用して反応を実行した。以下の成分を製品の使用説明書の記載にしたがって以下の量で以下の順序で混合した。

成分	添加の順番	体積（μｌ）	最終濃度
滅菌水	1	４３．５	
１０×反応バッファー	2	１０	１×
1.25 mM dNTP混合物	3	１６	２００μＭ　@NTP
プライマー１(10pMole/μｌ)	4	１０	１μＭ
プライマー２(10pMole/μｌ)	5	１０	１μＭ
鋳型ＤＮＡ	6	１０	１００ｎｇ
Ｔａｑポリメラーゼ	7	０．５	２．５ユニット

１００μｌのミネラルオイルを反応混合物の上に重層し、そしてパーキンエルマーシータス（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｃｅｔｕｓ）ＤＮＡサーマルサイクラー（パーキンエルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）、プレイリー　クラウド（Ｐｒａｉｒｉｅ　Ｃｌｏｕｄ）、ＭＮ）を使用して反応を行った。この方法は２５回の増幅からなる。一回の反応は以下の工程を含む：
１）　９２℃において１分間の変性；
２）　３７℃において２分間の鋳型のプライミング；
３）　７２℃において３分間の重合反応；そして
４）　７２℃において７分間の重合反応。
反応が終了したらミネラルオイルを除去し、そして反応混合物を２回エーテルにより抽出

し、そしてＤＮＡをエタノールにより沈殿させた。
ｅ．ＰＣＲにより生産されたＤＮＡ断片のクローニング
１）ＰＣＲ反応により生産されたＤＮＡをＮｃｏＩにより消化した。これにより約１５０９ｂｐのＤＮＡ断片が生産され、単離され、そしてアガロースゲルから回収された。
２）約５μｇのプラスミドｐＡＲＣ３０６ＡをＮｃｏＩで消化した。
３）約１００ｎｇのＮｃｏＩで消化されたプラスミドｐＡＲＣ３０６ＡをＰＣＲ反応により生産された約２００ｎｇのＮｃｏＩ断片に加えて混合した。ライゲーションバッファー（２μｌ）（ＩＢＩ社）および１ユニットのＴ４リガーゼを総量２０μｌになるように使用して断片を挿入した。ライゲーション反応は４℃において約１５時間行った。
４）ライゲーション混合物で大腸菌ＨＢ１０１を形質転換した。形質転換体を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むルリア培地（Ｌｕｒｉａ－Ｂｒｏｔｈ）により選択した。可能性のあるクローンからＤＮＡを単離し、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子挿入物を有するクローンを制限酵素分析により同定した。このプラスミドをｐＡＲＣ４９６Ａと命名した。
フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子のＤＮＡ配列を前述のようにして決定し、その結果を幾つかの制限部位と共に図１１に示す。プラスミドｐＡＲＣ４９６Ａに存在する約１５０５ｂｐのＮｃｏＩ－ＮｃｏＩ断片（ＮｃｏＩ断片）は特に好ましいＤＮＡセグメントである。
ｆ．遺伝子工学的に作られたフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子が作用をもつことの証明
プラスミドｐＡＲＣ４９６Ａ中のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈが正しく作用することはプラスミドｐＡＲＣ２７５（図９において記述されている）との相補試験により確認された。このプラスミドは以下の３つの特性を有する：ｉ）フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の一部を欠失したプラスミドｐＡＲＣ３７６の誘導体であるから大腸菌内にフィトエンを蓄積させる；ｉｉ）Ｒ１１６２の複製開始点を含む；そしてｉｉｉ）Ｔｎ５由来のカナマイシン耐性遺伝子を含むので、プラスミドｐＡＲＣ２７５を含む大腸菌は２５μｇ／ｍｌカナマイシン存在下において生育できる。
ｐＡＲＣ２７５を含む大腸菌細胞をプラスミドｐＡＲＣ４９６Ａにより形質転換することにより二重に形質転換された宿主細胞を作製した。これらの宿主細胞を２５μｇ／ｍｌカナマイシンおよび１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含む培地中で生育させた。該細胞は乾燥重量で約０．０１パーセントのリコペンを生産した。
この結果から、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を工学的に作製することに成功したことが証明された。さらにこの結果から、プラスミドｐＡＲＣ４９６Ａに存在する約１５０５ｂｐのＮｃｏＩ－ＮｃｏＩＤＮＡセグメントが、機能的なフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈを生産するために要求される全ＤＮＡ配列を含んでいることが示された。ＮｃｏＩ部位を該遺伝子の開始メチオニンに導入したため、ヌクレオチド配列がわずかに変わった：
もとの配列：

5' TAA AGG ATG AAA AAA ACC GTT GTG ATT GGC 3' (SEQ ID NO:34)

Met Lys Lys Thr Val Val Ile Gly (SEQ ID NO:35)

新たに遺伝子工学的に作製された配列：

NcoI

5' TAA ACC ATG GAA AAA ACC GTT GTG ATT GGC 3' (SEQ ID NO:36)

MET Glu Lys Thr Val Val Ile Gly (SEQ ID NO:37)

該遺伝子の３’末端の配列はＰＣＲ反応の結果、変化しなかった。
ｇ．フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈアッセイ
２つのロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）変異株、Ｉ－３およ

びＥ－７を用いてフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈアッセイを行った。フィトエンデヒドロゲナーゼ－３Ｈ遺伝子内に変異をもつ変異株Ｉ－３はサミュエル　カプラン（Ｓａｍｕｅｌ　Ｋａｐｌａｎ）博士、テキサス　メディカル　センター（Ｔｅｘａｓ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ）大学、ヒューストン、テキサスによる供与された。フィトエンを蓄積するこの変異株をフィトエンデヒドロゲナーゼ－３Ｈおよびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの基質源として使用した。

ロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）Ｅ－７はカロチノイドを全く生産できない、該株はアモコ　リサーチ　センター（Ａｍｏｃｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ）、ナパービル、イリノイにおいて開発された。フィトエンデヒドロゲナーゼ－３Ｈとは別の、しかしこれと同様の完全な遺伝子を有するこの変異株は同様の酵素源を供給することにより正確なアッセイ条件を決定する。

Ｉ－３細胞を中期から後期対数増殖期まで生育させ、沈殿させ、そして回収した細胞を１５０ミクロンの酸洗浄ガラスビーズを用いてボルテックスすることにより、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液、ｐＨ８．０中で溶菌することによりロドバクター（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ）Ｉ－３変異株の膜画分を単離した。そして細胞のホモジェネートをフィトエン源として使用した。

ロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）Ｅ－７のフィトエンデヒドロゲナーゼ－３Ｈはエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のようにフィトエンをリコペンに変換する代わりにファイトフルエンまたはニューロスポレンのいずれかに変換するが、ロドバクター（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ）酵素のために記述されたアッセイ条件はエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈにも有効であった。これらの条件は以下に記述されるとおり、エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子を持つ大腸菌またはサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）におけるフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ活性を検出するために使用された。

エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）の遺伝子を持つバクテリアまたは酵母のいずれかからフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈを単離するために、細胞を後期対数増殖期の中期まで生育させ、そして沈殿により回収した。細胞沈殿物は後の使用のために凍結させるか、又は直ちに使用した。凍結したかまたは新しい細胞沈殿物を等容の１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液、ｐＨ８．０に再懸濁し、ロドバクター（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ）における前述のボルテックス（バクテリアを溶菌させるためには１５０ミクロンのガラスビーズを使用し、酵母を溶菌させるためには４５０ミクロンのガラスビーズを使用した）により溶菌させた。この細胞溶菌液は試験のためのフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ源を提供した。

エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈを含む溶菌液のアリコートを、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液、ｐＨ８．０，１０ｍＭ　ＡＴＰ，２．５ｍＭ　ＮＡＤＰ，４ｍＭ　ＤＴＴ，４ｍＭ　$MgCl_2$，６ｍＭ　ＭｎＣｌを含む緩衝液中で最終体積１－２ｍｌにおいて上述のロドバクター（Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ）Ｉ－３細胞溶菌液に加えて混合した。反応混合物を暗黒中で２－８時間３０℃においてインキュベートし、そして内容物を最初にヘキサンにより、続いてクロロホルムにより抽出した。有機層を回収し、乾燥し、そしてＣ－１８分析用カラム（４．６×２５０ｍｍ）を使用してＨＰＬＣにより分析した。その条件は３０パーセント　イソプロピルアルコール、７０パーセントアセトニトリル：水（９：１）で開始し、５５パーセントイソプロピルアルコール、４５パーセントアセトニトリル：水（９：１）で終了するように直線密度勾配を、流速１ｍｌ／分で３０分間行った。約１６．２分に溶出するリコペンは予め決定された標準曲線により定量された。

実施例９．　大腸菌におけるリコペンの生産

ａ．方法１－ＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼおよびファイトエンデヒドロゲナーゼの工学的に作られた遺伝子を含むプラスミド

活性のあるＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼおよびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ酵素は普遍的な細胞前駆体をリコペンに変換することができる。上記酵素の３つの遺伝子を含むプラスミドを大腸菌宿主細胞に導入すると、リコペンが大腸菌内で生産された。リコペンを生産する一つの組み合わせはプラスミドｐＡＲＣ２７５およびｐＡＲＣ４９６Ａで形質転換された宿主細胞を利用するものである。

プラスミドｐＡＲＣ２７５を以下の方法により構築した。最初に、上述のようにプラスミドｐＡＲＣ３７６から約２９９９ｂｐのＰｓｔＩセグメント（７７９２番目から１０７９１番目の間、図５）を欠失させることによりプラスミドｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ　１１０を作製した。二番目に、プラスミドｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ　１１０から、ＥｃｏＲＩ（３３７０番目）からＨｉｎｄＩＩＩ（１３４６３番目、図５）のセグメントを切り出し、そしてプラスミドｐＡＲＣ２７５を作成するためにプラスミドｐＳＯＣ９２５のＥｃｏＲＩ部位とＨｉｎｄＩＩＩ部位にクローン化した。

プラスミドｐＳＯＣ９２５は約９キロベースのプラスミドであり、その制限地図は図１２に示されている。このプラスミドはカナマイシンおよびクロラムフェニコール（ＣＡＴ）耐性遺伝子およびＲ１１６２の複製開始点を含む。クロラムフェニコール耐性遺伝子はＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩによりプラスミドから切り出されうる（図１２）。

エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のカロチノイド遺伝子に相当する部分を含む断片（プラスミドｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ　１１０のＥｃｏＲＩからＨｉｎｄＩＩＩまで）を単離した。プラスミドｐＳＯＣ９２５をＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化することによりＣＡＴ遺伝子を切り出した。消化されたプラスミドｐＳＯＣ９２５の大きい部分約１００ｎｇを約２００ｎｇのｐＡＲＣ３７６－Ｐｓｔ　１１０由来のＥｃｏＲＩからＨｉｎｄＩＩＩまでの断片に、総体積２０μｌで、２μｌのライゲーションバッファーおよび１ユニットのＴ４リガーゼを加えて混合した。ライゲーション混合物を約１５時間４℃においてインキュベートし、そして大腸菌ＨＢ１０１細胞を形質転換した。形質転換体を２５μｇ／ｍｌカナマイシンを含むルリア培地（Ｌｕｒｉａ－Ｂｒｏｔｈ）中で生育させた。可能性のあるクローンからＤＮＡを単離して、所望のＤＮＡ挿入物を含むそれらのクローンを制限分析により同定した。その結果生じたプラスミドは大腸菌内においてフィトエンを生産する能力を持つ。

プラスミドｐＡＲＣ２７５およびｐＡＲＣ４９６Ａによる大腸菌宿主細胞の形質転換体は実施例８において論じられたように形質転換した宿主細胞を赤いコロニーにする。

ｂ．方法２－リコペンサイクラーゼの欠失遺伝子を持つプラスミド

リコペンの生産に引き続くエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）生合成経路の次の段階はリコペンサイクラーゼによるリコペンからベーターカロテンへの変換である。リコペンサイクラーゼをコードする遺伝子を阻害するか、変異させるか、または他の方法により機能を失わせると、リコペンからベーターカロテンへの変換に関与するリコペンサイクラーゼ酵素は機能しない。このことが起こればリコペンは蓄積する。

プラスミドｐＡＲＣ３７６をＡｖａＩで部分消化することにより２つの隣接した、比較的短いＡｖａＩ－ＡｖａＩ断片を除去し、残された比較的長い大きい断片の両切断末端を再連結することにより、リコペンサイクラーゼ遺伝子を欠失させてプラスミドｐＡＲＣ３７６の誘導体であるプラスミドｐＡＲＣ３７６－Ａｖａ　１０２を構築する。２つの比較的短いＡｖａＩ－ＡｖａＩ断片は約１６３３ｂｐ（１０４５３－８８４２，図５）のＡｖａＩ断片および約６１１ｂｐのＡｖａＩ－ＡｖａＩ断片（８８４２－８２３１，図５）である。加算すると約２２２２ｂｐのＤＮＡがプラスミドｐＡＲＣ３７６から除去された。

その結果生じたプラスミドｐＡＲＣ３７６－Ａｖａ　１０２で大腸菌ＨＢ１０１を形質転換し、そして形質転換体を１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むルリア培地（Ｌｕｒｉａ－Ｂｒｏｔｈ）中で生育させた。通常、完全なプラスミドｐＡＲＣ３７６を含む大腸菌細胞は生産されるゼアキサンチンおよびゼアキサンチン誘導体のために黄色のコロニーである。形質転換後の幾つかのコロニーは今や赤色を呈した。

これらの赤いコロニーの大腸菌クローンからプラスミドＤＮＡを単離し、そして制限分析

を行ったところ、２つのＡｖａＩ－ＡｖａＩ断片が起源のｐＡＲＣ３７６プラスミドから欠失していた。このプラスミドｐＡＲＣ３７６からのＡｖａＩ断片の欠失によりリコペンサイクラーゼ遺伝子が欠損した。
この状況においてプラスミドｐＡＲＣ３７６－Ａｖａ　１０２上のＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの３つの遺伝子を完全に機能し、リコペンを生産した。リコペンサイクラーゼ遺伝子は正しく機能しなかったので、形質転換された大腸菌宿主細胞はリコペンを蓄積した。
実施例　１０．　サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）におけるリコペンの生産
正常な酵母細胞はリコペンを生産しない。サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）内においてリコペンを生産するのに十分な遺伝子ＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を含む。プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｇ（実施例５）はＧＡＬ　１０およびＧＡＬ　１逆向きプロモーター領域の両側に隣接してＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子を有する。これら両遺伝子はこれら２つのプロモーターを使用してサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）において発現される。
フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子は以下に記述するとおり、プラスミドｐＡＲＣ１４６Ｄ上に存在している。これら２つのプラスミドでサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、ＹＰＨ４９９株を形質転換した。
酵母ＹＰＨ４９９株は機能しないＴＲＰ　１遺伝子および機能しないＵＲＡ　３遺伝子を含む（実施例５において論じられたとおり）。プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｇは機能するＴＲＰ　１遺伝子並びにＧＧＰＰシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子を含む。プラスミドｐＡＲＣ１４６Ｄは機能するＵＲＡ　３遺伝子並びにフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を含む。両プラスミドを導入後、酵母細胞をガラクトースを含む培地４（実施例５）中で生育させることにより３つのカロチノイド遺伝子の発現を誘導した。
前述のプロトコルにしたがって細胞を静止期まで増殖させ、集菌し、抽出し、そしてＨＰＬＣにより分析した。３つのカロチノイド構造遺伝子を有する酵母細胞は乾燥重量で約０．０１パーセントのリコペンを生産した。
ａ．プラスミドｐＡＲＣ１４６の構築
プラスミドｐＡＲＣ１４６は酵母においてフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの発現を指示するために作製されたサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のベクターである。
プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｂ（図９）の構築はフィトエンの生産のために実施例５に概要を述べた。プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｂに２つの修飾を施すことによりプラスミドｐＡＲＣ１４６を構築した。
最初の修飾はＧＡＬ　１プロモーターの下流へのプラスミドｐＡＲＣ１４５ＢのＳｐｈＩ部位へのＰＧＫターミネーターの導入である。構造遺伝子をクローン化できるポリクローニング部位がＧＡＬ　１プロモーターおよびＰＧＫターミネーターの間に存在する。
すなわち、サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＰＧＫターミネーターを含む約５００ｂｐのＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ断片をプラスミドｐＡＲＣ１１７（実施例５）から切り出した。これは実施例５において論じられ、そして図７のプラスミドｐＡＲＣ１３５に示したＰＧＫターミネーター断片と実質的に同一である。この断片のＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ末端を、ＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片を用いて処理することにより平滑にした。そして存在するはずのＳｐｈＩ部位をそれぞれ含む合成二本鎖配列（ＢＲＬ）をＰＧＫターミネーター断片の両末端に連結し、粘着末端を生じさせるためにこの断片をＳｐｈＩで消化した。プラスミドｐＡＲＣ１４５ＢをＳｐｈＩで消化し、そしてＳｐｈＩリンカーをつないだＰＧＫターミネーターを連結してプラスミドｐＡＲＣ１４５Ｃを作製した。
二番目の修飾は酵母のＴＲＰ　１遺伝子を酵母のＵＲＡ　３遺伝子で置換した。これにより酵母の染色体上のＵＲＡ　３遺伝子に変異を有する酵母細胞にプラスミドを移入させる

ことが可能になった。そしてプラスミドｐＡＲＣ１４５Ｃを制限酵素ＭｓｃＩおよびＥｃｏＲＶで消化し、そしてＴＲＰ　１遺伝子を含む７３７ｂｐの断片を欠失させた。
存在するはずのＸｈｏＩ切断部位を含む合成二本鎖配列（ＢＲＬ）をＭｓｃＩおよびＥｃｏＲＶの平滑末端に連結した（プラスミドｐＡＲＣ１４５には他にＸｈｏＩ部位がない）。この結果生じたＤＮＡ断片をＸｈｏＩで消化することによりＸｈｏＩの粘着末端を有するＤＮＡを作製した。
一方、完全なＵＲＡ　３遺伝子を含む約１０００ｂｐのＨｉｎｄＩＩＩ断片をプラスミドＹＥｐ２４（ＡＴＣＣ　３７０５１）から切り出した。この断片の両末端をＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片を用いて平滑にした。存在するはずのＸｈｏＩ切断部位をそれぞれ含む合成二本鎖配列をその平滑末端に連結した。そしてこの断片をＸｈｏＩで消化して粘着末端を生じさせた。
そしてこのＵＲＡ　３遺伝子断片をＸｈｏＩで消化したｐＡＲＣ１４５Ｃ（ＴＲＰ　１遺伝子を欠失している）に連結した。最終的に得られたこのプラスミドをｐＡＲＣ１４６と命名したが、プラスミドｐＡＲＣ１４６は選択可能なマーカーとしてＴＲＰ　１遺伝子の代わりにＵＲＡ　３遺伝子を含んでいること以外はプラスミドｐＡＲＣ１４５Ｃと同様である。
予測に反して、プラスミドｐＡＲＣ１４６は２つのＸｈｏＩ部位を含んでいなかった。図１３に（ＸｈｏＩ）として示されているとおり起源のベクターのＥｃｏＲＶ部位に位置していると期待されたＸｈｏＩ部位は切断されなかった。しかしながら、その部位の明らかな消失はＵＲＡ　３選択マーカーとしてのプラスミドｐＡＲＣ１４６の有用性に影響せず、また発現ベクターとしてのプラスミドｐＡＲＣ１４６の有用性にも影響しない。
この新規なプラスミドの主要な特性はｉ）逆向きのＧＡＬ　１およびＧＡＬ　１０プロモーター、ｉｉ）ＧＡＬ　１プロモーターの３’末端のＰＧＫターミネーター、ｉｉｉ）ＧＡＬ　１０プロモーターの３’末端の２ミクロンのＳＴＢターミネーター（２　ＭＩＣ　ＳＴＢ　ＴＥＲＭ）、ｉｖ）サッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）にプラスミドを移入するための選択マーカーであるＵＲＡ　３、およびｖ）酵母内でプラスミドが保持されるための２ミクロンの複製開始点、の存在である。このプラスミドも大腸菌において保持されるためのｐＭＢ１複製開始点および大腸菌における選択マーカーとしてのアンピシリン耐性遺伝子を含む。プラスミドｐＡＲＣ１４６の制限地図は図１３に示されている。
ｂ．　プラスミドｐＡＲＣ４９６Ｂの構築
フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子の開始メチオニンのすぐ上流、および該遺伝子の３’末端のそれぞれにＳａｌＩ部位を導入してプラスミドｐＡＲＣ４９６Ｂを構築することにより、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子をＳａｌＩ－ＳａｌＩ断片として移動可能にした。プラスミドｐＡＲＣ１４５Ｇと共にサッカロミセスセレビシエ（Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）を形質転換させるプラスミドｐＡＲＣ１４６Ｄ（以下に記述する）を構築するためのフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子としてこのバージョンの遺伝子を使用することにより、形質転換された酵母内でフィトエンが生産された。プラスミドｐＡＲＣ４９６Ｂの構築は前述のＰＣＲプロトコル（プラスミドｐＡＲＣ４９６Ａ）を使用してＳａｌＩ部位を該遺伝子の３’末端に導入することにより行った。
ｉ．　ＰＣＲのための鋳型ＤＮＡ
プラスミドｐＡＲＣ２７１Ｄ（実施例８）をＳａｌＩおよびＸｍｎＩで消化し、アガロースゲル電気泳動による分離後約３０３５ｂｐの断片（９３４０－６３０５、図５）を単離した。この断片をＰＣＲの鋳型として使用した。
ｉｉ．　ＰＣＲのためのプローブ
フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の５’および３’末端にＳａｌＩ部位を導入するために２つのオリゴヌクレオチドプローブを使用した。該遺伝子の５’末端においては新たに導入されたＳａｌＩ部位は開始メチオニンのすぐ上流にある。３’末端においては新たに導入されたＳａｌＩ部位は６３４２番目のＮｃｏＩ部位のすぐ上流にある。
５’末端の最初の配列は：

5’ G AGA TAA AGG ATG AAA AAA ACC GTT GTG AT 3’ (SEQ ID NO:38)

MET ･･･

である。
５’末端のオリゴヌクレオチドプローブは：
ＳａｌＩ

5’ G AGG TCG ACG ATG AAA AAA ACC GTT GTG AT 3’ (SEQ ID NO:39)

MET ･･･

である。
遺伝子の３’末端の他方の鎖のオリゴヌクレオチドプローブは：
ＳａｌＩ

5’ AT GGT CGA CGT GGC GTG GTC AAG CAG CGG 3’ (SEQ ID NO:40)

である。
以下に記述したとおりポリメラーゼチェインリアクションを実行した。反応終了後、反応混合物を２回エーテルで抽出し、そしてＤＮＡをエタノールで沈殿させた。
ｉｉｉ． ＰＣＲにより作製されたＤＮＡ断片のクローン化
ＰＣＲにより蓄積したＤＮＡをＳａｌＩにより消化して約１５０８ｂｐの断片（遺伝子の５’末端のＴＣＧＡＣ突出部のＴから遺伝子の３’末端のＳａｌＩ部位のＧまで）を作製した。５μｇのプラスミドｐＡＲＣ３０６Ａ（図６）をＳａｌＩで消化した。約１００ｎｇのＳａｌＩで消化したプラスミドｐＡＲＣ３０６ＡおよびＰＣＲにより調製したフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子のＳａｌＩ－ＳａｌＩ断片約２００ｎｇを、総量２０μｌにおいて２μｌのライゲーションバッファー（ＩＢＩ）と１ユニットおＴ４リガーゼと共に混合した。ライゲーション反応混合物を約１５時間４℃においてインキュベートした。
その結果生じたプラスミドで大腸菌ＨＢ１０１を形質転換し、そして形質転換体を１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むルリア培地（Ｌｕｒｉａ－Ｂｒｏｔｈ）中で生育させた。見込みのあるクローンからＤＮＡを単離し、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を含むクローンの存在を制限酵素分析により確認した。
結果として生じたプラスミドをｐＡＲＣ４９６Ｂと命名した。他の特に好ましいＤＮＡセグメントである、約１５０８ｂｐのＳａｌＩ－ＳａｌＩ断片（ＳａｌＩ断片とも呼ぶ）をプラスミドｐＡＲＣ４９６Ｂから酵母のベクターｐＡＲＣ１４６にクローン化することにより、以下に記述するプラスミドｐＡＲＣ１４６Ｄを作製した。
ｉｖ． プラスミドｐＡＲＣ４９６Ｂのフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の断片の配列
フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の５’および３’末端へのＳａｌＩ部位の導入により、天然のＤＮＡ断片のヌクレオチド配列がわずかに変わった。
遺伝子の５’末端の最初の配列は：

5’ GAG ATA AAG G ATG AAA AAA ACC GTT GTG AT 3’ (SEQ ID NO:41)

MET Lys Lys Thr Val Val ･･･ (SEQ ID NO:42)

である。
遺伝子工学的に作られたバージョンの遺伝子の５’末端の配列は：

ＮｃｏＩ

5' CC ATG GAA AAA ACC GTT GTG AT 3' (SEQ ID NO:43)

MET Glu Lys Thr Val Val (SEQ ID NO:44)

ＳａｌＩ

5' GAG GTC GAG G ATG AAA AAA ACC GTT GTG AT 3' (SEQ ID NO:45)

MET Lys Lys Thr Val Val ··· (SEQ ID NO:46)

である。

遺伝子の３'末端の最初の配列は：

ＮｃｏＩ（６３９５）

5' CC GCT GCT TGA CCA CGC CAC GCA GAC CAT GG 3' (SEQ ID NO:47)

である。

ＰＣＲ反応によりＳａｌＩ部位を導入した後の新しい配列は：

ＳａｌＩＮｃｏＩ（６３９５）

5' CC GCT GCT TGA CCA CGC CAC GTC GAC CAT GG 3' (SEQ ID NO:48)

となった。

ｃ．　プラスミドｐＡＲＣ１４６Ｄの構築

フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子を含む上述の約１５０８ｂｐのＳａｌＩ断片をプラスミドｐＡＲＣ４９６Ｂから切り出し、そして前述のｐＡＲＣ１４６プラスミドのＳａｌＩ部位に連結した。この結果、ＧＡＬ　１プロモーターとＰＧＫターミネーターの間に隣接してフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子が配置されたプラスミドｐＡＲＣ１４６Ｄ構成物が作られた。ｐＡＲＣ１４６Ｄプラスミドの制限酵素地図を図１４に示すが、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の位置はＰＤＨとして表す。

実施例１１．　ロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）におけるエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の発現

この実施例はプラスミドｐＡＴＣ２２８の構築法を記述するが、該プラスミドはロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）の変異株を形質転換することにより該生物においてエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈを発現させた。このプラスミドベクターｐＡＴＣ２２８の作製は、遺伝子工学的に作られたフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子を含むプラスミドｐＡＴＣ１６１９と、大腸菌およびロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）において形質転換でき、そして保持されうるプラスミドｐＳＯＣ２４４を結合させることにより行った。以下は、プラスミドｐＡＴＣ２２８の構築法の多段階の記述である。

ａ．　プラスミドｐＡＴＣ１６１９の構築

プラスミドｐＡＴＣ１６１９はｐＤＲ５４０（ファルマシア社）のＴＡＣプロモーターに隣接して、クローン化され、遺伝子工学的に作られたバージョンのフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を含む。ＴＡＣプロモーターを使用してフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を大腸菌または光合成バクテリアにおいて発現させる。以下に概述するように幾つかの中間体プラスミドを要する多段階の方法によりプラスミドｐＡＴＣ１６１９が構築された。

ｉ．　プラスミドｐＡＲＣＢｇｌＩＩ４０１

プラスミドｐＡＲＣ３７６由来の約５５１３ｂｐのＢｇｌＩＩ断片（図５における６８３

６番目から１２３４９番目まで）をプラスミドｐＡＲＣ３０６ＡのＢａｍＨＩ部位にクローン化することによりプラスミドｐＡＲＣＢｇｌＩＩ４０１を構築した。

ｉｉ．　プラスミドｐＡＴＣ１４０３

プラスミドｐＡＲＣＢｇｌＩＩ４０１由来の約１５４８ｂｐのＰｓｔＩからＳａｌＩまでの断片（図５における最初の位置はそれぞれ７７９２番目から９３４０番目までである）をプラスミドＭ１３ｍｐ１９（ＢＲＬ）のＰｓｔＩおよびＳａｌＩ部位にクローン化することによりプラスミドｐＡＴＣ１４０３を作製した。プラスミドｐＡＲＣ１４０３はフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの最初の部分を含む。

ｉｉｉ．　プラスミドｐＡＴＣ１４０４

カレント　プロトコルズ　イン　モリキュラー　バイオロジー（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ）、オーサベル（Ａｕｓａｂｅｌ）ら編集、ジョン　ワイリー　アンド　ソンズ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ）、ニューヨーク（１９８７）、ｐｐ．８．１．１－８．１．６（実施例２参照）に記述されているインビトロ変異導入プロトコルを使用して、プラスミドｐＡＴＣ１４０３のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の開始ＭＥＴコドンにＳｐｈＩ部位を導入した。プライマーとして使用されたオリゴヌクレオチドプローブは：

ＳｐｈＩ

5’　G ACG AGA TAA AGC ATG CAA AAA ACC GTT GT 3’　(SEQ ID NO:49)

MET Gln Lys Thr Val ･･･　(SEQ ID NO:50)

である。

天然のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の配列は：

5’　G ACG AGA TAA AGG ATG AAA AAA ACC GTT GT 3’　(SEQ ID NO:51)

MET Lys Lys Thr Val ･･･　(SEQ ID NO:52)

である。

ＳｐｈＩ部位を導入した結果、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ酵素の二番目のアミノ酸はLysからGlnに変わった。すなわち、新しい配列は：

ＳｐｈＩ

5’　G ACG AGA TAA AGC ATG CAA AAA ACC GTT GT 3’　(SEQ ID NO:53)

MET Gln Lys Thr Val ･･･　(SEQ ID NO:54)

となった。フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子の開始メチオニンコドンにＳｐｈＩ部位を持つこのプラスミドをｐＡＴＣ１４０４と命名した。

ｉｖ．　プラスミドｐＡＴＣ８１６

プラスミドｐＡＲＣ３０６Ａ（図６）をＰｓｔＩおよびＳｍａＩで消化した。プラスミドｐＡＲＣ３７６（図５）をＰｓｔＩおよびＢａｌＩで消化した。約１４５１ｂｐのＰｓｔＩ（７７９２）からＢａｌＩ（６３４１）までの断片をアガロースゲルから単離した。ＢａｌＩおよびＳｍａＩによる消化はどちらも平滑末端を残す。プラスミドｐＡＲＣ３７６由来の約１４５１ｂｐのＰｓｔＩ－ＢａｌＩ断片をＰｓｔＩおよびＳｍａＩで消化したプラスミドｐＡＲＣ３０６Ａにクローン化することによりプラスミドｐＡＴＣ８１６を作製した。

プラスミドｐＡＲＣ３０６ＡはＳｍａＩ部位の約３０ｂｐ下流にＥｃｏＲＩ部位を含む。最初からプラスミドｐＡＲＣ３０６Ａに存在するＥｃｏＲＩ部位はプラスミドｐＡＴＣ８１６において保持されている。

ｖ．　プラスミドｐＡＴＣ１６０５

前述のように、プラスミドｐＡＴＣ１４０４はフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈをコードする遺伝子の最初の部分のみを含む。この部分とフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺

伝子の残りの部分を連結するために、プラスミドｐＡＴＣ１４０４から約１０５２ｂｐのＳｍａＩからＰｓｔＩまでの断片（図５の最初の位置は８８４４番目から７７９２番目までである））を切り出し、そして以下のようにプラスミドｐＡＴＣ８１６（フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の３’部分を含む）にクローン化した。
プラスミドｐＡＴＣ８１６をＳｓｐＩおよびＰｓｔＩで消化した（どちらの部位もｐＡＴＣ８１６プラスミドには一か所である）。ＳｓｐＩによる消化は平滑末端を残す。プラスミドｐＡＴＣ１４０４由来の約１０５２ｂｐのＳｍａＩ（平滑末端）からＰｓｔＩまでの断片を消化したプラスミドｐＡＴＣ８１６にクローン化することにより、プラスミドｐＡＴＣ１６０５を作製した。
このクローニング法（プラスミドｐＡＴＣ１４０４のＳｍａＩからＰｓｔＩまでの断片をプラスミドｐＡＴＣ８１６へ）によりプラスミドｐＡＴＣ１６０５中でフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の完全な配列が並ぶことになった。フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の開始コドンのすぐ上流に余分なＤＮＡ断片が存在する。
さらに、酵素の開始Ｍｅｔ残基のコドンを含むプラスミドｐＡＴＣ１４０４の、新たに作られたＳｐｈＩ部位が、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子の一部となった。最初から存在する、図１１－４の３’末端の配列の近くに示されたＮｃｏＩ部位も、そこから下流の、プラスミドｐＡＲＣ３０６Ａから導入されたＥｃｏＲＩ部位と共にこの構成物に存在する。フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子を含むプラスミドｐＡＴＣ１６０５のＳｐｈＩ－ＥｃｏＲＩ断片は約１５５０ｂｐである。

ｖｉ．　プラスミドｐＡＴＣ１６０７

プラスミドｐＡＴＣ１６０５をＳｐｈＩおよびＥｃｏＲＩで消化した。その結果生じる約１５５０ｂｐの断片をＳｐｈＩおよびＥｃｏＲＩ酵素で消化したプラスミドｐＵＣ１９（ファルマシア社）にクローン化することにより、プラスミドｐＡＴＣ１６０７を作製した。

ｖｉｉ．　プラスミドｐＡＴＣ１６１９

プラスミドｐＡＴＣ１６０７のＳｐｈＩの上流の隣接部分はプラスミドｐＵＣ１９のポリリンカー領域由来のＨｉｎｄＩＩＩ部位である。プラスミドｐＡＴＣ１６０７をＨｉｎｄＩＩＩおよびＥｃｏＲＩで消化することにより、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子を切り出した。その結果生じた断片も約１５５０ｂｐであり、その末端を大腸菌ＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片で処理することにより平滑にした。
プラスミドｐＤＲ５４０（ファルマシア社）は大腸菌およびロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）を含む幾つかのバクテリアにおける遺伝子発現のためのＴＡＣプロモーター、およびＴＡＣプロモーター下流にＢａｍＨＩ部位を一か所含み、ＢａｍＨＩで消化後、上述のように末端を平滑にした。プラスミドｐＡＴＣ１６０７（上述）由来の末端を平滑にしたＤＮＡ断片をプラスミドｐＤＲ５４０にクローン化することにより、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子に隣接してバクテリアのＴＡＣプロモーターを含むプラスミドｐＡＴＣ１６１９を作製した。プラスミドｐＡＴＣ１６１９もＨｉｎｄＩＩＩ部位を一か所含む。

ｂ．　プラスミドｐＡＴＣ２２８の構築

プラスミドｐＳＯＣ２４４はｉ）Ｒ１１６２の複製開始点、ｉｉ）ＴＡＣプロモーターに隣接した、クロラムフェニコールに耐性を示すクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、およびｉｉｉ）一か所のＨｉｎｄＩＩＩ部位を含む。このプラスミドは大腸菌およびロドバクタースフェロイデス（Ｒ．ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）を形質転換でき、そして保持されうる。プラスミドｐＳＯＣ２４４の構築を以下に記述する。

ｉ．　プラスミドｐＳＯＣ２００

プラスミドｐＱＲ１７６ａはシャピロ（Ｊ．Ａ．Ｓｈａｐｉｒｏ）博士、シカゴ大学、シカゴ、イリノイから入手したが、マイヤー（Ｍｅｙｅｒ）ら、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１５２：１４０（１９８２）記述されている。このプラスミドはＲ１１６２の複製開始点およびカナマイシンに耐性を示すトランスポゾンＴｎ５を含む。このプラスミドは約１４．５キロベースであり、幾つかのＨｉｎｄＩＩ制限酵素部位を含む。

プラスミドｐＱＲ１７６ａをＨｉｎｄＩＩで消化し、適当な断片と再連結することにより、約８．５キロベースのプラスミドｐＳＯＣ２００を得た。このプラスミドはＲ１１６２の複製開始点およびＴｎ５由来のカナマイシン耐性遺伝子を含む。

ｉｉ．　プラスミドｐＳＯＣ２４４

プラスミドｐＳＯＣ２００を制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩおよびＳｍａＩで消化することにより、カナマイシン耐性遺伝子を除去した。プラスミドｐＳＯＣ９２５を同様に消化することによりＴＡＣプロモーターに隣接したクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）構造遺伝子を含む約１０００ｂｐの断片を得た。そしてその約１０００ｂｐの断片をＨｉｎｄＩＩＩおよびＳｍａＩで消化したプラスミドｐＳＯＣ２００にクローン化することによりプラスミドｐＳＯＣ２４４を作製した。

ｉｉｉ．　プラスミドｐＡＴＣ２２８

両プラスミド、ｐＡＴＣ１６１９およびｐＳＯＣ２４４、をＨｉｎｄＩＩＩで消化した。２つのプラスミドを連結し、そしてアンピシリン（ｐＡＴＣ１６１９プラスミド由来のアンピシリン耐性遺伝子を使用する）およびクロラムフェニコール（ｐＳＯＣ２４４プラスミド由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を使用する）を含む培地中で生育させた大腸菌から選択する。その結果生じたプラスミドｐＡＴＣ２２８はフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子を含み、ロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）を形質転換でき、そして該菌中で保持されうる。この構造遺伝子を約１５０６ｂｐのＳｐｈＩ－ＮｃｏＩ制限断片としてプラスミドｐＡＴＣ２２８から切り出すことができる。プラスミドｐＡＴＣ２２８を図１６に模式的に示す。

ｃ．　ロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）Ｉ－３変異株におけるエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の発現

ロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）Ｉ－３変異株（実施例８ｇにおいて利用された）は、フィトエンデヒドロゲナーゼ－３Ｈを欠損した、天然のｃｒｔＩ遺伝子を含むのでフィトエンを蓄積する。ロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）Ｉ－３細胞を宿主としてプラスミドｐＡＴＣ２２８で形質転換した。形質転換体をクロラムフェニコール存在下で選択した。無色だった変異細胞が形質転換後赤になった。これらの細胞から生産された赤の色素はカロチノイドスピリロキサンチンの特徴と一致する、物理化学的な特性を有した。

プラスミドｐＡＴＣ２２８で形質転換されたロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）Ｉ－３変異宿主細胞により生産された色素をロドバクターラブラム（Ｒ．　ｒｕｂｒｕｍ）（ＡＴＣＣ　２５９０３）培養細胞から抽出した真正スピリロキサンチンと比較した。２つの色素は同じＵＶ－Ｖｉｓスペクトルおよび同じＨＰＬＣプロフィールを有した。ロドバクターラブラム（Ｒ．　ｒｕｂｒｕｍ）由来のスピリロキサンチンは、２回の脱水素、水化、そしてメチル化という一連の触媒段階を経てリコペンから誘導される（「光合成バクテリア（Ｔｈｅ　Ｐｈｏｔｏｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　Ｂａｃｔｅｒｉａ）」、ロダリック（Ｒｏｄｅｒｉｃｋ）ら編集、プリナム出版、ニューヨーク、７２９－７５０ページ（１９７８））。

ロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）は、通常フィトエンをニューロスポレンに変換するが、エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のようにリコペンには変換しない。したがって、形質転換されたロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）におけるスピリロキサンチン様色素の生産において、エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈは蓄積されたフィトエンの脱飽和を触媒することによりリコペンを生産した。その後、生産されたリコペンはロドバクタースフェロイデス（Ｒ．　ｓｐｈｅｒｏｉｄｅｓ）変異株に存在する天然の酵素によりさらに代謝されることによりスピリロキサンチン様カロチノイドを形成した。

実施例　１２．　ピチアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）におけるリコペンの生産

上述の方法は他の酵母にも応用できる。一例となるひとつの酵母系はメチルトローフな酵母、ピチアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）である。
ピチアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）においてリコペンを生産させるために、ＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子を、ピチア（Ｐｉｃｈｉａ）において構造遺伝子の発現を指示する調節配列の制御下に配置した。結果として生じる、それらの発現能を有する形の遺伝子はピチア（Ｐｉｃｈｉａ）に導入できる。
例えば、クレッグ（Ｃｒｅｇｇ）ら、バイオテクノロジー（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ） ５：４７９－４８５（１９８７）；モレキュラー アンド セルラー バイオロジー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ） １２：３３７６－３３８５（１９８７）に記述されている形質転換系および発現系を使用できる。例えばプラスミドｐＡＲＣ４８９Ｄ由来のＧＧＰＰシンターゼ構造遺伝子をアルコールオキシダーゼ遺伝子（ＡＯＸ１）の下流、そして同じＡＯＸ１遺伝子の転写終結配列の上流に配置する。同様にして、例えばプラスミドｐＡＲＣ１４０ＮおよびｐＡＲＣ１４６Ｄ由来のフィトエンシンターゼおよびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子をＡＯＸ１プロモーターとターミネーターの間に配置する。そしてこれら遺伝子３つ全てとそれらの周辺の調節配列を、ピチアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）のＨＩＳ４遺伝子およびピチアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）のＡＲＳ配列（自律増殖配列）を有するプラスミドに導入することにより、ピチアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）細胞においてプラスミドは複製可能になる［クレッグ（Ｃｒｅｇｇ）ら、モレキュラー アンド セルラー バイオロジー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ） １２：３３７６－３３８５（１９８７）］。
該ベクターはｐＢＲ３２２のようなプラスミドが大腸菌細胞内で生育するのに適当な部分も含んでいる。ＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子、並びに上述のさまざまな付加的な要素を有する、この最終的に得られたプラスミドでピチアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）のｈｉｓ４変異株、即ち機能するヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠いた細胞株を形質転換することが例示される。
ヒスチジンを欠いた培地上で形質転換体を選択した後、クレッグ（Ｃｒｅｇｇ）ら、モレキュラー アンド セルラー バイオロジー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ） １２：３３７６－３３８５（１９８７）に記述されているように、ヒスチジンを欠いているがメタノールを含んでいる培地で細胞を生育させることにより、ＡＯＸ１プロモーターを誘導する。誘導されたＡＯＸ１プロモーターはピチアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）において、酵素ＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの発現、およびリコペンの生産を引き起こす。
ＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの３つの遺伝子の導入は、クレッグ（Ｃｒｅｇｇ）ら、モレキュラー アンド セルラー バイオロジー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ） １２：３３７６－３３８５（１９８７）に記述されているように、ＡＲＳ配列の使用を必要としない挿入形質転換（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ）によっても導入されうる。
実施例 １３． アスペルギルスニジュランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）におけるリコペンの生産
上で論じられたＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈをコードする遺伝子は、アスペルギルスニジュランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）のような真菌においてリコペンを合成し、蓄積させるために使用されうる。遺伝子を挿入（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ）することによりアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）に移入する。
例えば、ＧＧＰＰシンターゼの構造遺伝子を大腸菌プラスミドｐＢＲ３２２に導入する。

クローン化されたアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）遺伝子由来のプロモーター例えばａｒｇＢ［アップシャル（Ｕｐｓｈａｌｌ）ら、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２０４：３４９－３５４（１９８６）］を、ＧＧＰＰ構造遺伝子に隣接して該プラスミドに配置する。すなわち、ＧＧＰＰシンターゼ遺伝子はアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）ａｒｇＢプロモーターの制御下に置く。

次に、クローン化された完全なａｍｄｓ遺伝子［コリック（Ｃｏｒｒｉｃｋ）ら、Ｇｅｎｅ　５３：６３－７１（１９８７）］を該プラスミドに導入する。ａｍｄｓ遺伝子の存在によりアセトアミドが唯一の炭素源あるいは窒素源として使用され、ａｍｄｓを含むプラスミドを用いて安定に形質転換されたアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）細胞を選択するための手段を提供する。

こうして作製されたプラスミドには、アスペルギルスニジュランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓ）のａｒｇＢプロモーターがＧＧＰＰシンターゼ遺伝子に結合して存在し、そしてａｍｄｓ遺伝子がアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）の形質転換の選択のために存在する。そしてバランス（Ｂａｌｌａｎｃｅ）ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．　１１２；２８４－２８９（１９８３）の方法に従って、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）をこのプラスミドにより形質転換する。

ＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、およびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子をそれぞれ同様にして大腸菌プラスミドｐＢＲ３２２に導入する。クローン化されたアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）のａｒｇＢ遺伝子のプロモーター［アップシャル（Ｕｐｓｈａｌｌ）ら、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２０４：３４９－３５４（１９８６）］をフィトエンシンターゼおよびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子の直後に隣接して配置する。すなわち、これらの構造遺伝子はアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）のａｒｇＢ遺伝子のプロモーターにより制御される。

クローン化された完全なアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）のｔｒｐＣ遺伝子［ハマーとティンバーラーク（Ｈａｍｅｒ　ａｎｄ　Ｔｉｍｂｅｒｌａｒｋ）、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．，７：２３５２－２３５９（１９８７）］を該プラスミドに導入する。形質転換されたｔｒｐＣ変異株のアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）細胞がトリプトファンの存在しない培地において生育できることにより、ｔｒｐＣ遺伝子が挿入されたプラスミドの選択を可能にする。ＧＧＰＰシンターゼ遺伝子を含むプラスミドにより既に形質転換されたアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）株はリコペンを合成できる。

実施例　１４．　高等植物内のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ

高等植物はリコペンの生産に必要な酵素をコードする遺伝子を有するので、遺伝的にリコペンを生産する能力を有する。しかしながら、ほとんどの植物においてそうして生産されたリコペンはさらに他の産物に変換されるから、リコペンは通常蓄積しない。熟したトマトの果実においてさえも、蓄積されたリコペンのレベルは乾燥重量で約０．０１パーセントしかない。エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）由来のカロチノイドに特異的な酵素を使用することにより、植物における使用のためにフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈを発現させ、並びに植物におけるリコペンの蓄積を改善できる。

ａ．　葉緑体への転移

最初の方法として、前に論じたとおり開始メチオニンコドンに制限部位ＳｐｈＩを導入するためにフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を修飾した。５’末端にＮｃｏＩ部位を、３’末端にＳｐｈＩ部位を含むタバコのリブロース２リン酸カルボキシラーゼ－オキシゲナーゼ遺伝子の転移（シグナル）ペプチドをコードする約１７７ｂｐのＤＮＡ断片を、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子のＳｐｈＩ部位に連結した。この修飾された遺伝子をプラスミドｐＣａＭＶＣＮ（ファルマシア、ピスカタウエイ、Ｎ．Ｊ．）のＣＡＴ遺伝子に代えて挿入した。その結果生じたプラスミドは植物のＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターと３’末端のＮＯＳポリアデニレーション配列との間に隣接して配置されたフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を転移ペプチド配列と共に含んだ。

このフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子構成物をプラスミドｐＧＡ４８２（ファルマシア）のマルチプルクローニングリンカー領域内の便利な制限部位に挿入することにより、プラスミドｐＡＴＣ１６１６を作製した。プラスミドｐＧＡ４８２の主要な特性は（ｉ）アグロバクテリウムチュメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）において保持されるための複製開始点、（ｉｉ）Ｔ－ＤＮＡ領域の左右の境界の間にあるＤＮＡセグメントが、植物へ挿入されるように指示する該領域から右および左の境界配列、および（ｉｉｉ）植物がカナマイシン存在下において生存できるようにする、カナマイシン耐性遺伝子に隣接したＮＯＳプロモーターを含むことである。

通常のプロトコルにしたがって、このフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子構成物でアグロバクテリウムチュメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）ＬＢＡ４４０４株（クロンテック社）を形質転換した。ホルシュ（Ｈｏｒｓｃｈ）ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２７：１２２９－１２３１（１９８５）の方法を使用して、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子構成物を有するプラスミドを含むアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）細胞をタバコの平らな葉に感染させた。感染処理の間にプラスミドｐＧＡ４８２の左右の境界領域間の完全なＤＮＡセグメントが植物細胞にトランスフェクトされる。トランスフェクトされた植物細胞をカナマイシン耐性により選択する。

トランスジェニックなタバコ植物を除草剤ノルフラゾン（Ｓａｎｄｏｚ）存在下において生育させた。対照のプラスミドｐＧＡ４８２で形質転換され、エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子を含まない対照の植物は、生育培地に０．２μｇ／ｍｌの除草剤ノルフラゾンを存在させて生育させると白くなった。エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子を含むトランスジェニック植物は０．８μｇ／ｍｌのノルフラゾン存在下において正常に生育した。すなわち、エルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子の導入によりエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）のフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈが発現され、そして植物が除草に必要な量のノルフラゾンに耐性になった。

上記の除草剤ノルフラゾン耐性タバコ植物の調製において利用された特定のＤＮＡセグメント、組換え分子および組換え技術は以下に論じられている。

ｉ．　転移ペプチド

転移ペプチドのＤＮＡ配列は、マーツアー（Ｍａｚｕｒ）ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１３：２３４３－２３８６（１９８５）におけるニコチアナタバクム（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ ｔａｂａｃｕｍ）のリブロース２リン酸カルボキシラーゼ－オキシゲナーゼのシグナルペプチドを基本にしている。開示された１７７ｂｐの配列の２カ所を変化させて作製した。

最初の変化として、ＮｃｏＩ制限部位を作製するために２つのシチジン残基を５’末端に加えた。２番目の変化として、７３番目と７４番目の塩基の間を切断するＮａｒＩ部位を導入した。この変化は６９番目のＴをＧに置換し、そして７２番目のＡをＧに置換したが、両変化はアミノ酸配列を変化させるものではない。３’末端の最後の２残基を欠失させることにより、正常なＳｐｈＩ制限部位の粘着末端を提供した。

転移ペプチドをコードする合成ＤＮＡも１７７ｂｐからなる。５’にＮｃｏＩおよび３’にＳｐｈＩの粘着末端を有する完全な二本鎖配列は図１７に示されている。

８断片を９０℃において５分間加熱し、そしてゆっくりと室温まで冷却することにより各々二本ずつアニールして転移ペプチドをコードするＤＮＡを合成した。それぞれ５０ピコモルの断片を利用した。

それらの８断片とは：

1. 5'CAT GGC TTC CTC AGT TCT TTC CTC TGC AGC AGT TGC C 3'(SEQ ID NO:55)

2. 5'GGG TGG CAA CTG CTG CAG AGG AAA GAA CTG AGG AAG C 3'(SEQ ID NO:56)

3. 5'ACC CGC AGC AAT GTT GCT CAA GCT AAC ATG GTG G 3' (SEQ ID NO:57)

4. 5'CGC CAC CAT GTT AGC TTG AGC AAC ATT GCT GC 3' (SEQ ID NO:58)

5. 5'CGC CTT TCA CTG GCC TTA AGT CAG CTG CCT CAT TCC
CTG TTT CAA GGA AG 3' (SEQ ID NO:59)

6. 5'TTT GCT TCC TTG AAA CAG GGA ATG AGG CAG CGA ATG AGG
CAG CTG ACT TAA GGC CAG TCA AAG G 3' (SEQ ID NO:60)

7. 5'CAA AAC CTT GAC ATC ACT TCC ATT GCC AGC AAC GGC
GGA AGA GTG CAA TGC ATG 3' (SEQ ID NO:61)

8. 5'CAT TGC ACT CTT CCG CCG TTG CTG GCA ATG GAA GTG
ATG TCA AGG T 3' (SEQ ID NO:62)

である。

アニーリングに利用された対は１と２、３と４、５と６、７と８で、以下に示す、粘着末端をもつ、アニーリングされた対１－２、３－４、５－６および７－８を形成した。

1－2

5' CATGGCTTCCTCAGTTCTTTCCTCTGCAGCAGTTGCC 3' (SEQ ID NO:63)

3' CGAAGGAGTCAAGAAAGGAGACGTCGTCAACGGTGGG 5' (SEQ ID NO:64)

3－4

5' ACCCGCAGCAATGTTGCTCAAGCTAACATGGTGG 3' (SEQ ID NO:65)

3' CGTCGTTACAACGAGTTCGATTGTACCACCGC 5' (SEQ ID NO:66)

5－6

5' CGCCTTTCACTGGCCTTAAGTCAGCTGCCTCATTCCCTGTTTCA

3' GGAAAGTGACCGGAATTCAGTCGACGGAGTAAGGGACAAAGT

AGGAAG 3' (SEQ ID NO:67)

TCCTTCGTTT 5' (SEQ ID NO:68)

7－8

5' CAAAACCTTGACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAGAGT

3' TGGAACTGTAGTGAAGGTAACGGTCGTTGCCGCCTTCTCA

GCAATGCATG 3' (SEQ ID NO:69)

CGTTAC 5' (SEQ ID NO:70)

断片１－２を断片３－４に連結して断片１－４を作製した。その配列を以下に示す。

5' CATGGCTTCCTCAGTTCTTTCCTCTGCAGCAGTTGCCACCCGCAGCAA

3' CGAAGGAGTCAAGAAAGGAGACGTCGTCAACGGTGGGCGTCGTT

TGTTGCTCAAGCTAACATGGTGG 3' (SEQ ID NO:71)

ACAACGAGTTCGATTGTACCACCGC 5' (SEQ ID NO:72)

断片５－６を断片７－８に連結して断片５－８を作製した。その配列を以下に示す。

5' CGCCTTTCACTGGCCTTAAGTCAGCTGCCTCATTCCCTGTTTCAAGGA

3' GGAAAGTGACCGGAATTCAGTCGACGGAGTAAGGGACAAAGTTCCT

AGCAAAACCTTGACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAG

TCGTTTTGGAACTGTAGTGAAGGTAACGGTCGTTGCCGCCTTC

AGTGCAATGCATG 3' (SEQ ID NO:73)

TCACGTTAC 5' (SEQ ID NO:74)

１－２および３－４の対（断片１－４）を２時間以上かけて連結し、５－６および７－８の対も同様にして２つの二本鎖配列を作製した。断片１－４のライゲーション産物をＮｃｏＩおよびＮａｒＩで消化し、断片５－８の産物をＮａｒＩおよびＳｐｈＩで消化した。これらの消化はライゲーションの間に形成されたどのような連結分子（ｃｏｎｃａｔｅｍｅｒ）をも分離し、さらなるライゲーションのために必要な粘着末端を提供した。

消化した混合物を６パーセントのアクリルアミドゲルにて泳動した。正確な大きさのバンドをゲルから切り出し、そしてＤＮＡをゲルマトリックスから溶出した。

（１－４）および（５－８）のＤＮＡ断片を連結することにより１７７塩基対の分子を作製した。上記のようにライゲーション産物を制限酵素で消化することにより、さらなる分子のクローニングのために必要な末端を作った。本例の場合は、断片（１－４）および（５－８）のライゲーション産物はＮｃｏＩおよびＳｐｈＩで消化した。消化したライゲーション産物のＤＮＡセグメントを６パーセントのポリアクリルアミドゲルにて泳動した。１７７塩基対のバンドを切り出し、そしてゲルから溶出した。

１７７塩基対の断片をプラスミドｐＡＲＣ４６６にクローン化した。最初から存在するＨｉｎｄＩＩＩ部位をＮｃｏＩで置換した以外はプラスミドｐＡＲＣ４６６とＭ１３ｍｐ１９は同一である。このプラスミドはＳｐｈＩ部位の下流にＳｍａＩ部位を含むポリリンカー領域を含む。

プラスミドｐＡＲＣ４６６のＮｃｏＩ部位は前に論じられたインビトロ変異導入法を使用して最初から存在するＨｉｎｄＩＩＩ部位を置換することにより作られた。使用されたプライマーは：

<u>ＮｃｏＩ</u>

5' CCT GCA GGC ATC CAA CCA TGG CGT AAT CAT GGT CAT 3' (SEQ ID NO:75)

である。

プラスミドｐＡＲＣ４６６をＮｃｏＩおよびＳｐｈＩで消化した。それらの部位にクローン化されるように、１７７ｂｐの転移ペプチドのＤＮＡ断片はデザインした。１７７塩基対の断片をプラスミドｐＡＲＣ４６６に連結することによりプラスミドｐＡＲＣ４８０を作製した。プラスミドｐＡＲＣ４８０の配列をＭ１３法により決定してデザインされたペプチドの配列を確認したが、正しいことがわかった。

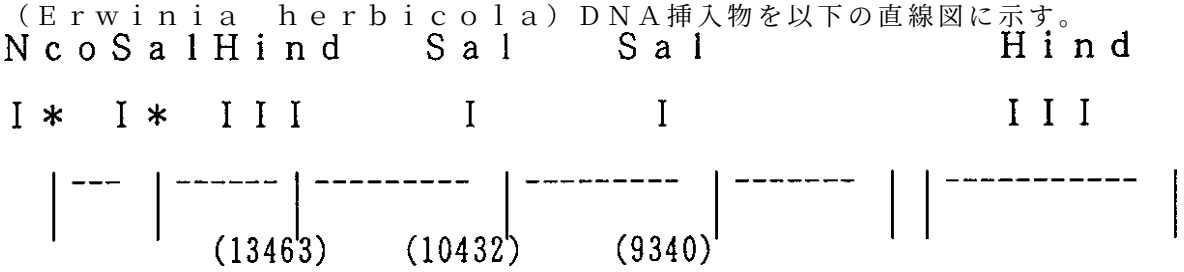
ｉｉ．　プラスミドｐＡＴＣ２１２

転移ペプチドを、植物のプロモーターおよびターミネーター配列を含むプラスミドに移動させた。ｐＣａＭＶＣＮはファルマシア社から市販されているプラスミドであり、３５Ｓプロモーターおよびｎｏｓポリアデニレーション配列を含む。以下のとおりに転移ペプチドを３５Ｓプロモーターの直後にクローン化した：

ａ）　プラスミドｐＣａＭＶＣＮを制限酵素ＳａｌＩで消化した。ニューイングランドバイオラブズ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）社から市販されているリンカー＃１１０４即ち、ｄ（ＴＣＧＡＣＣＣＧＧＧ）をＳａｌＩで消化し、そして消化したｐＣ

ａＭＶＣＮと連結することによりプラスミドｐＡＴＣ２０９を作製した。
ｂ）　プラスミドｐＡＴＣ２０９をＳｍａＩで消化した。転移ペプチドを除去するためにプラスミドｐＡＲＣ４８０をＮｃｏＩおよびＳｍａＩで消化した。転移ペプチドＤＮＡのＮｃｏＩ部位を大腸菌ＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片で処理することにより平滑末端を作り、プラスミドｐＡＴＣ２０９のＳｍａＩ部位に連結できる断片を作製した。両末端が平滑にされた断片をＳｍａＩで消化されたプラスミドｐＡＴＣ２０９にクローン化することによりプラスミドｐＡＴＣ２１２を作製した。
ｉｉｉ．　プラスミドｐＡＴＣ１６１６
プラスミドｐＡＴＣ１６１６は、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子のコード配列のフレーム中に転移ペプチド配列をもつフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子を含むプラスミドｐＧＡ４８２の誘導体である。この遺伝子構成物はＣａＭＶ　３５Ｓにより制御され、そして該構造遺伝子の下流にＮＯＳポリアデニレーション部位を含む。このプラスミドは以下の方法により作製された。
プラスミドｐＡＴＣ１６０７（実施例１１）は開始メチオニンコドンにＳｐｈＩ部位をもつフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈのバージョンを含む。プラスミドｐＡＴＣ１６０７をＮｃｏＩで消化した。切断されたＮｃｏＩ部位は図５の６３４２番目のＮｃｏＩ部位または図１１の約１５１０番目のＮｃｏＩ部位と同一である。ＮｃｏＩ部位をＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片で処理することにより平滑末端にした。
このようにして処理されたプラスミドｐＡＴＣ１６０７をさらにＳｐｈＩで消化した。この消化により約１５０６ｂｐの断片が得られ、該断片はフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの構造遺伝子を含んでいた。該断片の５’末端はＳｐｈＩであり、３’末端は平滑末端である。
プラスミドｐＡＴＣ２１２をＳｐｈＩおよびＳｍａＩで消化した。ＳｐｈＩ部位は転移ペプチド配列の３’末端であり、ＳｍａＩ部位はプラスミドｐＡＴＣ２１２ポリリンカー配列中の下流である。上記のＳｐｈＩで平滑末端化したフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ遺伝子の断片をプラスミドｐＡＴＣ２１２にクローン化することによりプラスミドｐＡＴＣ１６１２を作製した。
プラスミドｐＡＴＣ１６１２はＣａＭＶ　３５Ｓプロモーター、転移ペプチド配列、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ構造遺伝子、およびＮＯＳポリアデニレーション配列を含む。ＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターの上流およびＮＯＳポリアデニレーション配列の下流にＸｂａＩ部位が存在するので、ｐＡＴＣ１６１２のこの全ての領域はＸｂａＩ－ＸｂａＩ断片として移動可能である。
プラスミドｐＡＴＣ１６１２をＸｂａＩで消化し、そして約２４５０ｂｐのＸｂａＩ－ＸｂａＩ断片（４５０ｂｐのＣａＭＶ　３５Ｓプロモーター、１７７ｂｐの転移ペプチド配列、および３００ｂｐのＮＯＳポリアデニレーション配列）をプラスミドｐＧＡ４８２のＸｂａＩ部位にクローン化した。その結果生じたプラスミドがｐＡＴＣ１６１６である。
ｂ．　植物の細胞質における生産
細胞質においてリコペンを生産させるために、葉緑体のための方法においても記述されているのと同一の方法を使用して、但し転移ペプチド配列を除いて、上記カロチノイド遺伝子を適切なひとつまたは複数のベクターに導入した。該遺伝子は葉緑体を標的としないので、酵素が細胞質内に残り、そして普遍的なイソプレノイド中間体であるファルネシルピロリン酸に作用し、細胞質中でリコペンを生産する。
実施例　１５．　リコペンサイクラーゼ遺伝子
ａ．　位置
ｐＡＲＣ３７６上のリコペンサイクラーゼ遺伝子の位置は他の酵素遺伝子における前述の方法により証明された。フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈリコペンサイクラーゼ遺伝子を欠失するか、変異させるかまたは他の方法により欠失させると、活性のあるリコペンサイクラーゼ酵素がなくなり、リコペンが蓄積するであろう。リコペンを生産する大腸菌は赤くなるが、ベータカロテンを生産する大腸菌は黄色くなる。
該遺伝子は図５に示されたＳａｌＩ部位（９３４０）およびＰｓｔＩ部位（７７９２）を

結合したプラスミドｐＡＲＣ３７６の１５４８ｂｐの断片上に位置することが以下の実験により証明された。
プラスミドｐＡＲＣ３７６をＡｖａＩで部分消化し、末端を連結し、そしてこのプラスミドＤＮＡで大腸菌細胞ＨＢ１０１株を形質転換した。ｐＡＲＣ３７６－Ａｖａ　１０２と命名されたこのプラスミドは８２３１番目から８８４２番目までの６１１ｂｐのＡｖａＩ断片の欠失および８８４２番目から１０４５３番目までの１６１１ｐのＡｖａＩ断片の欠失を含んでいた。
ＡｖａＩで消化したｐＡＲＣ３７６プラスミドで形質転換した幾つかの大腸菌細胞がリコペンサイクラーゼ遺伝子の機能を欠損しており、その結果リコペンを蓄積することが見いだされた。これらの結果からリコペンサイクラーゼ遺伝子が９３４０番目のＳａｌＩに近い領域に存在することが示唆された。
ｂ．　プラスミドｐＡＲＣ１００９
実施例８ｂはプラスミドｐＡＲＣ１３７Ｂの構成を示すが、そのエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）ＤＮＡ挿入物を以下の直線図に示す。



上記直線図のＮｃｏＩおよびＳａｌＩ部位の星印は親のプラスミドｐＡＲＣ３０６Ａのポリリンカー部分内である。
プラスミドｐＡＲＣ１３７ＢをＳａｌＩで消化し、そしてポリリンカーのＳａｌＩ部位から最初の位置が約９３４０番目のＳａｌＩ部位までの領域を連結して戻すことにより、プラスミドｐＡＲＣ１３７－５を作製した。こうして約４１２３ｂｐのＳａｌＩ－ＳａｌＩ断片を除去した。作製したプラスミドは最初の位置が約９３４０番目のＳａｌＩ部位付近から始まるエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）ＤＮＡに隣接しているＲｅｃ　７プロモーターを保持していた。
その結果生じたプラスミドは、残っていたＳａｌＩ部位およびＨｉｎｄＩＩＩ部位の間に２つのＳｔｕＩ制限部位も含んでいた。それらのＳｔｕＩ部位は最初の位置が約７３０６番目と約３５３８番目であったものである。
プラスミドｐＡＲＣ１３７－５のＳｔｕＩによる消化、および上述のＮｃｏＩ部位およびＨｉｎｄＩＩＩ部位を含む、ＳｔｕＩで終わっている断片との再連結によりｐＡＲＣ１００９と命名された新規プラスミドが作製された。そのプラスミドは最初の位置で約９３４０番目のＳａｌＩ部位から最初の位置で約７３０６番目のＳａｌＩまでに所望のエルウイニアヘルビコラ（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｈｅｒｂｉｃｏｌａ）ＤＮＡを、そしてＳａｌＩ部位に隣接してＲｅｃ　７プロモーターを含んでいた。
プラスミドｐＡＲＣ１００９で大腸菌ＪＭ１０１株を形質転換し、そして細胞を生育させ、ナリジキシン酸で処理することによりＲｅｃ　７プロモーターを誘導した。蛋白質画分を単離し、ＰＡＧＥで分析し、そして３６キロドルトンの優位な蛋白質のバンドが見いだされた。この蛋白質のバンドは以下に論じられるとおり酵素リコペンサイクラーゼとして同定された。この蛋白質のバンドを単離し、そしてＮ末端アミノ酸配列決定に供した。最初の２５のＮ末端のアミノ酸残基は図１９に示される通り決定された。
リコペンサイクラーゼ酵素のＮ末端のアミノ酸配列とｐＡＲＣ３７６プラスミドのＤＮＡ配列を比較することにより、リコペンサイクラーゼ遺伝子の開始コドンの位置が明らかになった。驚くことに、開始コドンはＧＴＧであり、最も一般的なＡＴＧではなかった。ＧＴＧコドンは通常アミノ酸バリンをコードするが、バクテリアにおける稀な例として蛋白質の開始コドンとして使用されるときはメチオニンもコードしうる（ストーモ（Ｇ．Ｄ．Ｓｔｏｒｍｏ）、１９８６、マキシマイジング　ジーン　エクスプレッション（Ｍａｘｉ

ｍｉｚｉｎｇ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ），レツニコフ（Ｗ．Ｒｅｚｎｉｋｏｆｆ），ゴールド（Ｌ．Ｇｏｌｄ）編集、バターワース（Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ）、ストーンハム（Ｓｔｏｎｅｈａｍ）、マサチューセッツ、ｐｐ１９５－２２４）。すなわちこの比較から、リコペンサイクラーゼ遺伝子の５’末端は最初の位置で９３４０番目のＳａｌＩから約３３８ｂｐ下流から始まることが見いだされた。

ｃ． プラスミドｐＡＲＣ４６５

一連の実験を実行することにより、該遺伝子の３’末端の位置が決定された。プラスミドｐＡＲＣ４６５はＧＧＰＰシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよび抗生物質クロラムフェニコールに耐性を示すクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼのためのカロチノイド遺伝子を含み、以下の方法により構築された。

プラスミドｐＡＲＣ３０７Ｄは、アンピシリン遺伝子の代わりにクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む以外は、プラスミドｐＵＣ８と類似のプラスミドである。プラスミドｐＡＲＣ３０７ＤはｐＵＣ８と同一のポリクローニングリンカーも含む。

プラスミドｐＡＲＣ３０７ＤをＨｉｎｄＩＩＩおよびＥｃｏＲＩで消化した。プラスミドｐＡＲＣ３０７－Ａｖａ １０２（実施例９ｂ）もＨｉｎｄＩＩＩおよびＥｃｏＲＩで消化した。その結果生じたプラスミドｐＡＲＣ３０－Ａｖａ１０２のＨｉｎｄＩＩＩ（１３４６３）からＥｃｏＲＩ（３３７０）までの約８０００ｂｐの断片をアガロースゲルから単離した（前述のプラスミドｐＡＲＣ３７６－Ａｖａ １０２中のＡｖａＩの欠失により親のｐＡＲＣ３７６プラスミドの約２２００ｂｐを欠失していたので、断片の大きさは約８０００ｂｐでしかない）。この約８０００ｂｐのＨｉｎｄＩＩＩ－ＥｃｏＲＩ断片を、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＥｃｏＲＩで消化したプラスミドｐＡＲＣ３０７Ｄにクローン化した。その結果生じたプラスミドｐＡＲＣ４６５で大腸菌を形質転換するとリコペンを生産し、抗生物質クロラムフェニコールに耐性を示した。

リコペンサイクラーゼ遺伝子を含むプラスミドｐＡＲＣ１００９を、プラスミドｐＡＲＣ４６５を含む大腸菌細胞に導入し、細胞をクロラムフェニコールおよびアンピシリン中で生育させた。これらの細胞はベータカロチンを生産した。このことから、リコペンサイクラーゼ遺伝子の３’末端はＳｔｕＩ部位（最初の位置で約7306番目）の上流にあることが示唆された。

ｄ．プラスミドpARC1008

遺伝子の３’末端の位置をさらに限定するため、1548bpのSa I(9340)からPst I(7792)のＤＮＡ断片（実施例15a）がプラスミドpARC306A内へクローン化された。得られるプラスミドpARC1008はプラスミドpARC465を既に含んでいる大腸菌細胞内へ導入された。これらの細胞をクロラムフェニコールおよびアムピシリン存在下で増殖させるとベーターカロテンを産生した。これらの結果は遺伝子の３’末端Pst I(7792)部位の上流に存在していることを示した。

要約すると、リコペンシクラーゼの遺伝子はプラスミドpARC376の約1548bpのSal IからPst I断片に含まれている。実際の開始コドンはSa I部位から約338bp下流である。それ故、リコペンシクラーゼ遺伝子の境界は大体図５の9002位から7792位のPst I部位であり、約1210bpＤＮＡセグメントを含んでいる。図19は単鎖配列決定から得られたヌクレオチド配列およびリコペンシクラーゼのアミノ酸配列決定により得られた部分的アミノ酸配列を含んでいる。

リコペンシクラーゼの遺伝子の５’末端が変形されているいくつかの構成物が作成された。２つが以下に記載されている。

ｅ．プラスミドpARC147

１つの構成物においては、下記のごとく遺伝子の始めのイン ビトロでの突然変異誘発によるNco I部位の導入により開始コドンがＧＴＧ配列からＡＴＧ配列に変えられている。

下記の配列を持つオリゴヌクレオチドプローブが合成され、正常配列と比較されている。

天然ＤＮＡ配列

```
          *MET                              (SEQ ID NO:76)
A GAG CGT ATC GTG AGG GAT CTG ATT TTA GTC GGC G
```

新規ＤＮＡ配列

```
          Nco I                             (SEQ ID NO:77)
G CGC GGA TCC ATG GGG GAT CTG ATT TTA GTC GGC G
          *MET
```

＊開始メチオニン；ボールド体の字は前に説明したとおりである。Nco I制限部位配列はCCATGGであり、それ故、新規配列は開始メチオニンにNco I部位が導入されている。この新規に変形されたリコペンシクラーゼ遺伝子（導入されたNco I部位で始まる）がプラスミドpARC306A内へクローン化され、プラスミドpARC147が発生された。プラスミドpARC147はプラスミドpARC465をすでに含んでいる大腸菌細胞内へ導入され、細胞はクロラムフェニコールおよびアムピリシン存在下、増殖させられた。これらの細胞はベーターカロテンを産生した。それ故、酵素の発現のために他のプラスミドへ動くことができるNco IからPst Iの約1210bpのＤＮＡ断片内の機能性リコペンシクラーゼ遺伝子が構成された。

ｆ．リコペン　シクラーゼ　アッセイ

大腸菌にリコペン蓄積を起こすプラスミドpARC1606（後で説明）およびRec-7-駆動リコペンシクラーゼ遺伝子を含むプラスミドpARC147（前に説明）で別々に形質転換された培養大腸菌細胞を別々にホモジアイズした。ホモジネートは2.5mM $MgCl_2$，3mM $MnCl_2$，4mMジチオスレイトールおよび6mM ATP存在下１：１の比で30℃にて６時間混合した。

アッセイ混合物はその後凍結乾燥し、アセトン：メタノール（７：２，v,v）で抽出した。抽出物は濃縮し、HPLCにより分析した。β－カテロンが検出された；約54ngのシス－異性体および約27ngのトランス異性体。それ故プラスミドpARC147中に存在するリコペンシクラーゼの遺伝子工学による遺伝子は形質転換された大腸菌宿主細胞により能動的に転写された。

FAD,NADPおよびFMVのごとき補助因子はリコペンシクラーゼ活性には必要とされなかった。しかしながらATPは活性に必須である。

pARC1606の構成

プラスミドpARC1606の構成は一連の中間ベクターを経て進行した。

プラスミドpARC376をBam HIで部分消化し、再連結した。連結されたプラスミドは大腸菌細胞へ移され、pARC376から約1045bp（本来の位置3442から4487）および約815bp（本来の位置5302から4487）のBam HI断片が欠落したプラスミドを含む細胞が選択された。新規のプラスミドの名前はpARC376-Bam 100であり、β－カテロンヒドロキシラーゼの遺伝子が欠落されているので、このプラスミドは大腸菌細胞にβ－カテロンの産生を起こさせた。プラスミドpARC376- Bam 100をHind IIIおよびEco RIで消化した。エルウィニア　ヘルビコーラ（Erwinia herbicola）カロテノイド遺伝子を含む断片を単離し再連結した。プラスミドpARC376での元々のHind IIIおよびEco RI部位の配位は各々13463および3370である。

プラスミドpARC307D（上記）もまたpUC8 MCSを含んでいる。プラスミドpARC307DをHind IIIおよびEco RIで消化し、プラスミドpARC376-Ban 100から切り出されたエルウィニアヘルビコーラ（Erwinia herbicola）Hind IIIおよびEco RI断片がプラスミドpARC307D内へクーン化されプラスミドpARC279が形成された。このプラスミドは大腸菌細胞にクロラムフェニコール耐性を与え、またβ－カテロンを産生させるようにした。プラスミドpARC279は約11.7kbを含んでいる。

プラスミドpARC279をBgl IIおよびBam HIで部分消化し、再連結してβ－カテロン産生に必要でない特定の領域をpARC279プラスミドから欠失させ、プラスミドを可能なかぎり小さくした。約10kb（約1.7kbが欠失された）の大きさのプラスミドのクローンが発見され、それは大腸菌にクロラムフェニコール耐性を与え、β－カテロン合成を起こさせた。プラスミドはpARC281Bと名付けられた。

以下のプロトコールに従ってプラスミドpARC281Bを含む大腸菌細胞をニトロソグアジン（ＮＴＧ）で突然変異誘発させることによりプラスミドpARC281BからプラスミドpARC1606が

作製された。
以下はＮＴＧ突然変異誘発プロトコールである：
１．プラスミドpARC281Bを含む大腸菌細胞を対数増殖期で増殖させた－約3.5×10^{8}細胞／mlまたは600nmで0.3－0.6の吸光度。
２．細胞をリン酸緩衝液（50mM，pH7.0）で２度洗浄し、元々の容量の1/10の増殖培地に再懸濁した。
３．ＮＴＧはリン酸緩衝液中100μg／mlの最終濃度になるように細胞に添加した。細胞は37℃で１時間インキュベートした。
４．細胞をリン酸緩衝液中で３回洗浄してＮＴＧを除去した。細胞は続いて25μg／mlのクロラムフェニコールを含むルリア－ブロスに再懸濁し、37℃で約15－18時間増殖させた。
５．細胞を希釈し、25μg／mlのクロラムフェニコールを含む1.5パーセント寒天のルリア－ブロス培地上に置いた。コロニーの赤色発現を証拠とするリコペン産生のコロニーが観察された。そのコロニー中に含まれているプラスミドが単離されプラスミドpARC1606と称された。
ニトロソグアニジン処理後リコペンシクラーゼ遺伝子中のどこかに突然変異が誘発され酵素の不活性化を起こした。このため細胞はβ－カロテンの前駆体であるリコペンを蓄積した。この突然変異を持つプラスミドを含む細胞はリコペンの蓄積のため、β－カロテンの黄色のかわりに赤色であった。
プラスミドpARC1606を含む細胞は前に記載のリコペンシクラーゼアッセイのためのリコペン源として使用された。
ｇ．プラスミドpARC1509
新規構成物プラスミドpARC147は大腸菌中では効果的に働くが、酵母中では効果的でない。前記過程においてArgからGlyに変化した第２のＮ－末端アミノ酸がこの遺伝子を酵母中で不活性にしているように思われる。それ故、リコペンシクラーゼ遺伝子の５′および３′両方の末端を以下のごとく酸遺伝子工学処理を行った。
下記のプローブを用いてＰＣＲ（前に説明したとおり）により開始MetコドンにSph I制限部位および遺伝子の３′末端にBam HI制限部位が天然配列内に導入された：
５′末端のSph I部位のために

Sph I (SEQ ID NO:78)
5′ G CGG CGC ATG CGG GAT CTG ATT TTA GTC GGC G 3′

３′末端のBam HI部位のために

Bam HI (SEQ ID NO:79)
5′ CAT CGG ATC CTG TCA GGA AAA TGG TTC AGC 3′

Sa I(9407)からNco I部位(6395)の約3012bp断片が実施例８に記載したプラスミドpARC271Dから切り出された。この断片は前に説明したごとくして実施されるPCR反応の鋳型として使用された。
PCR後、反応混合物をSph IおよびBam HIで消化した。Sph I(18)部位の最初のＧ残基とBam HI(1168)部位の最初のＧ残基の間の図19に示した約1142bp断片が前に説明したごとくしてアガロースゲル上に単離された。シクラーゼ遺伝子のこの約1142bp Sph I－Bam HI断片がSph IおよびBam HIで前もって消化されているpUC18内へクローン化された。得られたプラスミドはpARC1509と称された。
ｈ．プラスミドpARC1510
プラスミドpARC1509のリコペンシクラーゼ遺伝子の遺伝子工学処理体のどこが活性タンパク質をコードしているかを決定するために、以下のごとくしてプラスミドpKK223-3（ファルマシア）のＴＡＣプロモーターに隣接して構造遺伝子セグメントが導入された。プラスミドpARC1509のSph I部位から上流は（多クローニング配列において）特異的Hind III部位である。プラスミドpARC1509をHind IIIおよびBam HIで消化すると、約1156bpのHind III－Bam HI断片が単離された。断片末端はＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片による処理により平滑化した。

プラスミドpKK223-3はＴＡＣプロモーターに隣接する特異的Eco RI部位を含んでいる。プラスミドpKK223-3をEco RIで消化して末端を同様にクレノー断片で平滑化した。リコペンシクラーゼの構造遺伝子セグメントを含む断片をＴＡＣプロモーターに隣接する平滑化Eco RI部位に連結して、プラスミドpARC1510を生成させた。
リコペンシクラーゼの遺伝子が活性タンパク質を発現できることを証明するためにプラスミドpARC1510を大腸菌細胞（ＣＡＴ耐性遺伝子およびリコペン産生に必要な遺伝子を含んでいるがリコペンシクラーゼ遺伝子は欠失されているプラスミドpARC465を既に含んでいる）に導入した。プラスミドpARC465およびpARC1510の両方を含んでいる大腸菌細胞をクロラムフェニコールおよびアムピシリン存在下に増殖させるとベーターカロテンを産生した。

実施例１６．大腸菌におけるベーターカロテン産生

ａ　方法１－GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Hおよびリコペンシクラーゼのための遺伝子工学による遺伝子を含むプラスミド
ユビキノン性前駆体からベーターカロテンを産生するのには４つのカロテノイド酵素遺伝子が必要とされる。即ち、GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Hおよびリコペンシクラーゼのための遺伝子。１つの実施例においては初めの３つの、即ちGGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼおよびフィトエンデヒドロゲナーゼ酵素のための遺伝子はプラスミドpARC465上に存在している。このプラスミドは大腸菌において抗生物質クロラムフェニコールに対する耐性を与えるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子も含んでいる。
実施例15に記載されたプラスミドpARC1009はプラスミドpARC306Aに挿入された約2038bpのSal IからStu IのＤＮＡ断片を含んでいる。プラスミドpARC1009がプラスミドpARC465を含んでいる大腸菌細胞に移された場合、細胞は約0.05パーセント（乾燥重量）のレベルでベーターカロテンを産生した。
実施例15に記載されているプラスミドpARC147はpARCプラスミド内へ挿入された約1215bpのNco IからPst Iの断片を含んでいる。このプラスミドはまたプラスミドpARC465を含む大腸菌細胞へ導入され、それらの細胞もまた約0.05パーセントのレベルでベーターカロテンを合成した。その後に見い出されたことであるがリコペンシクラーゼ構造遺伝子のこのバージョンは酵母中で不活性であり、その使用は中止され遺伝子は実施例15に記載したごとく変形されプラスミドpARC1510が形成された。プラスミドpARC1510はプラスミドpARC465と組合せて移入されると大腸菌中でベーターカロテンを産生した。

ｂ．別法－ベーターカロテンヒドロキシラーゼの欠損遺伝子とプラスミドpARC376の組合せ
プラスミドpARC376は大腸菌においてのゼアキサンチンジグルコシドを含むカロテノイドの合成を有効にする十分な遺伝子補完物を持っている。ベーターカロテンはベーターカロテンヒドロキシラーゼ酵素の代謝基質であり、それはベーターカロテンの３および３′位に２つのヒドロキシル基を添加し、ゼアキサンチンを産生する。もしベーターカロテンヒドロキシラーゼの遺伝子が欠損したら、突然変異を受けたら、または何らかの他の方法で機能を失ったら、細胞は基質ベーターカロテンを蓄積する。

ｉ．プラスミドpARC376－Pst102
ベーターカロテンヒドロキシラーゼの遺伝子はプラスミドpARC376のPst I部位(4886)およびSma I部位(5861)を境界とする975bp ＤＮＡ断片上に含まれている。この酵素の遺伝子の一部を欠落させるため、プラスミドpARC376をPst Iで部分的に消化し、適当な切断末端を再連結した。プラスミドＤＮＡの分析から本来の位置4886から5215の392bp PstI位置断片が欠落したことが決定された。このプラスミドpARC376-Pst102と名付けられた。
プラスミドpARC376-Pst102で大腸菌を形質転換した後、オレンジ－黄色のコロニーを取り上げ前に記載した方法でカロテノイド含量が分析された。正常の色の大腸菌コロニーは無傷のpARC376プラスミドを含んでおり、ゼアキサンチンジグルコシドを産生しているものは黄色である。オレンジ－黄色に色付いたコロニーはベーターカロテンのみを約0.1パーセント（乾燥重量）のレベルで産生していることが示された。

ii　プラスミドpARC376－Bam100
類似の方法により、プラスミドpARC376がBam HIで部分的に消化され、大よそ本来の位置4487から5302の約815bp断片の欠落を起こすように適切に再連結された。得られたプラスミドpARC376－Bam100と称された。このプラスミドＤＮＡが大腸菌HB101へ移入され、オレンジ－黄色コロニーが選択され、カロテノイド含量が分析された。これらの細胞において、ベーターカロテンは約0.1パーセントのレベルで蓄積された。
実施例１７．S.セレビジエ（S.cerevisiae）中でのベーターカロテンの産生
ベーターカロテン合成に必要とされる４つの酵素の各々に対する構造遺伝子がS.セレビジエ（S.cerevisiae）で適当に機能するであろう適当なプロモーターおよび終止配列に隣接して置かれる。適当なプロモーターとしては実施例５および詳細な説明に記載されているGAL １およびGAL 10分岐プロモーターおよびホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子プロモーター(PGK)（同様に記載されている）が挙げられる。適当なターミネーターはPGK遺伝子からの終止配列である。
GGPPシンターゼおよびフィトニンシンターゼの構造遺伝子はプラスミドpARC145Gに存在しており、実施例５に記載したごとく、GAL 10およびGAL １プロモーターに隣接している。PGK遺伝子からの終止配列はフィトエンシンターゼの遺伝子の３′末端である。ベーターカロテンを産生する為にはフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼのための遺伝子をこの微生物においてこれらの遺伝子の発現を支配しているベクターに導入する必要がある。
酵母においてベーターカロテン合成を誘発する１つのアプローチはこれらの２つの遺伝子をpARC146のごときGAL 10およびGAL １分岐プロモーターを含むベクター内へ挿入し、得られるプラスミドをS.セレビジエ（S.cerevisiae）（すでにプラスミドpARC145Gを含んでいる）に導入することである。得られる集団はベーターカロテン産生に必要とされる遺伝物質のすべてを遺伝子の高いレベルでの発現を可能にするような形で持っている。
ａ．プラスミドpARC1520
プラスミドpARC146D（実施例10）はすでにGAL １プロモーターに隣接するフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈのための遺伝子を含んでいる。実施例15に記載したリコペンシクラーゼの構造遺伝子が以下のごとくしてGAL 10プロモーターに隣接するプラスミドpARC146D内へクローン化された：
実施例15に記載したプラスミドpARC1509をHind IIIおよびBam HIで消化した。リコペンシクラーゼの構造遺伝子を含む約1156bp断片が単離され、末端がＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片による処理により平滑化された。
プラスミドpARC146DがEco RIで消化された（制限部位はプラスミドpARC14Dにおいて特異的である－図14参照）。Eco RI消化プラスミドの末端をまた平滑端化し、リコペンシクラーゼ遺伝子をクローン化し、プラスミドpARC1520が形成された。それ故プラスミドpARC1520はGAL １プロモーターに隣接するフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈの遺伝子、GAL 10プロモーターに隣接するリコペンシクラーゼの遺伝子および酵母での選択に有用なURA3遺伝子（前に記載）を含んでいる。プラスミドpARC1520をS.セレビジエ（S.cerevisiae）株yPH499（すでにプラスミドpARC145Gを含んでいる）に導入した。ベーターカロテンが乾燥重量で約0.01パーセントのレベルで産生された。
実施例１８．高等植物におけるベーターカロテンの産生
ａ．葉緑体
ベーターカロテンは植物の葉緑体中で合成されるが、大部分の高等植物種はそれを非常に高いレベルでは蓄積しない。中でもニンジンの根は最高の蓄積体であるが、これらの中でさえも約0.01－0.1パーセント（乾燥重量）の濃度でしかない。目標はリコペンシクラーゼの触媒活性を増加させ、それによりベーターカロテンを蓄積させることである。
リコペン産生はカロテノイド合成の分岐点と考えられている。１つの分岐においては、リコペンがアルファーカロテンに変換され、それは順にルテインに変換される。ルテインはすべてカロテノイドで最も高い濃度レベルで蓄積するカロテノイドである。他の分岐ではリコペンはベーターカロテンに変換され、それはルテインのレベルほど高くは蓄積されな

い。しかしながら、もしリコペンシクラーゼのための酵素のレベルが増加するとベーターカロテンはより高いレベルで蓄積する。
葉緑体中のリコペンシクラーゼのレベルを増加させるため下記の工程が実施された。プラスミドpARC212のタバコトランジットペプチド配列のための177bpのNco ＩからSph ＩのＤＮＡ断片をプラスミドpARC1509のメチオニンの開始コドンにSph Ｉ部位を持つリコペンシクラーゼ構造遺伝子の読みわく内に連結する。この方法は実施例14に記載した方法と類似しているが、ただし３′－Nco Ｉ部位ではなくリコペンシクラーゼ遺伝子の３′－Bam HI部位がＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片により平滑化される。
得られるプラスミドをXba Ｉで切断し、CaMv 35Sプロモーター（約450bp）、トランジットペプチド(約177bp)、リコペンシクラーゼ（約1150bp）およびNOSポリアデニル化(約300bp)配列を含むXba Ｉ－Xba Ｉ断片がプラスミドpGA482内へクローン化される。Xba Ｉ－Xba Ｉ断片は約2077bpを含有している。このプラスミドでアグロバクテリウム　ツメファシェンス(Agrobacterium tumefaciens)A281株を形質転換する。
pGA482の関連した特色が実施例14に記載されている。
（ｉ）Ｔ－ＤＮＡ配列の左および右境界－これらの境界間のＤＮＡ配列の植物ゲノム内への組込みを支配；（ii）発現にNOSプロモーターを用いるカナマイシン耐性遺伝子－リコペンシクラーゼ遺伝子を含むカナマイシン耐性植物の選択を可能にする；および（iii）アグロバクテリウム　ツメファシェンス(Agrobacterium tumefaciens)においてpGA482の複製を可能にする複製起点。pGA482はアグロバクテリウム　ツメファシェンス(Agrobacterium tumefaciens)A281株に導入された。
その後、タバコおよびアルファルファのごとき植物にこのアグロバクテリウム(Agrobacterium)を感染させる。リコペンシクラーゼのための遺伝子はCaMV 35Sプロモーターの影響下に発現され、前に説明したタバコトランジットペプチド配列により葉緑体に支配される。得られる植物はリコペンシクラーゼの産生量が増加し、その結果、付随してベーターカロテンの産生および蓄積のレベルが増加した。
他のカロテノイド酵素－特異的遺伝子もまたリコペンシクラーゼ遺伝子に関連してベーターカロテンの産生および蓄積の増加のために利用できる。これらにはGGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼおよびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈのための遺伝子が含まれる。高等植物へのこれらの遺伝子の導入はリコペンシクラーゼのために前に記載した操作と同一の操作である。遺伝子はタバコトランジットペプチドＤＮＡ配列に結合され、CaMV 35Sプロモーターのごとき機能性植物プロモーターに隣接して置かれる。またMOSポリアデニル化配列のごときポリアデニル化配列にも隣接して置かれる。
これらの構成物はリコペンシクラーゼの遺伝子と伴に植物に導入され、この組合せはカロテノイド合成経路のこの部分の全酵素活性を増加させる。このことは更に葉緑体におけるベーターカロテン合成および蓄積を増加させる結果を生む。
ｂ．細胞質
GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼのためのエルウィニア　ヘルビコーラ(Erwinia herbicola)遺伝子を導入すると細胞質のベーターカロテン合成が増加する。これらの酵素を植物細胞中で発現させるために、構造遺伝子を植物中で機能するであろうプロモーターおよびポリアデニル化配列を含む１つまたはそれ以上のベクター内へ個々にクローン化する。そのようなベクターの１つが前に説明したpCa MVCNであり、CaMV 35SプロモーターおよびNOSポリアデニル化配列を持っている。４つの遺伝子が適当なプロモーターおよびポリアデニル化信号とともに前記のプラスミドpGA482に挿入された。
プラスミドpGA482（４つのカロテノイド－特異性遺伝子を適当な制御信号とともに含んでいる）でA281株のごときA.ツメファシエンス(A.tumefaciens)で形質転換する。その後タバコおよびアルファルファのごとき植物に４つのカロテノイド遺伝子を含むA.ツメファシエンス(A.tumefaciens)を感染させるとその過程の間にカロテノイド遺伝子は植物ゲノム内へトランスフェクトおよび組み込まれる。その結果は形質転換された植物は必要とする遺伝子および細胞質中にベーターカロテンを産生および蓄積する能力を持つことになる。

CaMV 35S遺伝子はカロテノイド遺伝子の発現を起こさせた。

実施例１９．ピキア　パストリス(Pichia pastoris)におけるβ－カロテン産生

前記の方法はまた他の酵母にも拡張できる。例として示される１つの酵母系はメチロトローフ酵母、ピキア　パストリス(Pichia pastoris)である。

P.パストリス(P.pastoris)でβ－カロテンを産生させるには、GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼの構造遺伝子をピキア（Pichia）の構造遺伝子の発現を支配している制御配列の支配のもとに置く。得られるこれらの遺伝子の発現許容形がピキア（Pichia）細胞に導入される。

例えば、Cregg et al.,Biotechnology 5:479-485 (1987); Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385 (1987)に記載されている形質転換および発現系が使用できる。プラスミドpARC489Dからのごとき GGPPシンターゼの構造遺伝子はアルコールオキシターゼ遺伝子（AOX1）プロモーターの下流に、および同一のAOX1遺伝子の転写ターミネーター配列の上流に置かれる。同様に、プラスミドpARC146N、pARC146DおよびpARC1509からのごときフィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼの構造遺伝子はAOX1プロモーターおよびターミネーターの間に置かれる。これら４つのすべての遺伝子および側についている制御領域が次にP.パストリス（P.pastoris）HIS4遺伝子およびP.パストリス（P.pastoris）細胞内のプラスミド複製を可能にするP.パストリス（P.pastoris）ARS配列（自発的複製配列）〔Cregg et al.,Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385 (1987)〕の両方を運んでいるプラスミドへ導入される。

ベクターはまたプラスミドの大腸菌細胞での増殖を可能にするpBR322のごときプラスミドの適当な部分も含んでいる。最終的に得られたプラスミドで（GGPPフィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼ遺伝子ならびに上に記載の種々の追加の要素を運んでいる）例えばP.パストリス（P.pastoris）のhis4突然変異体（即ち機能性ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠く株の細胞）を形質転換させる。

ヒスチジンを欠く培地上で形質転換体コロニーを選択後、細胞をヒスチジンを欠くが、AOX1プロモーターを誘導するためCregg et al.,Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385 (1987)により記載されているごとくメタノールを含んでいる培地上で増殖させる。誘導されたAOX1プロモーターは酵素GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼを発現させ、P.パストリス（P.pastoris）においてβ－カロテンの産生を起こす。

GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼのための４つの遺伝子はCregg et al.,Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385（1987）により記載されているごとくARS配列の使用を必要としない組み込み的形質転換によっても導入できる。

実施例２０．A.ニデュランス（A.nidulans）におけるβ－カロテン産生

GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼをコードしている前に議論したような遺伝子はアスペルギルス　ニデュランス（Aspergillus nidulans）のごとき真菌中でのβ－カロテンの合成および蓄積に使用できる。遺伝子は組み込みによりアスペルギルス(Aspergillus)へ移される。

例えば、GGPPシンターゼの構造遺伝子を大腸菌プラスミドpBR322内へ導入する。argB〔Upshall et al.,Mol. Gen. Genet. 204:349－354 (1986)〕のごときクローン化アスペルギルス（Aspergillus）遺伝子からのプロモーターをGGPPシンターゼ構造遺伝子に隣接させてプラスミドに置く。それ故GGPPシンターゼ構造遺伝子はここではアスペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターの制御下である。

次に、完全クローン化amds遺伝子〔Corrick et al.,Gene 53:63-71 (1987)〕をプラスミドに導入する。amds遺伝子の存在によりアセトアミドのみを単一の炭素または窒素源として使用するようになり、それ故amds含有プラスミドで安定に形質転換されたアスペルギルス(Aspergillus)細胞を選択する手段を与える。

それ故、そのようにして調製されたプラスミドはGGPPシンターゼ遺伝子に融合されたアス

ペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターおよびアスペルギルス（Aspergillus）形質転換体の選択のために存在するamds遺伝子を含んでいる。アスペルギルス（Aspergillus）は続いてBallance et al, Biochem. Biophys. Res. Commun, 112:284-289（1983）の方法に従ってこのプラスミドで形質転換される。

GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびリコペンシクラーゼ構造遺伝子は各々同様にして大腸菌プラスミドpBR322内へ導入される。クローン化アスペルギルス（Aspergillus）argB遺伝子の為のプロモーター〔Upshall et al.,Mol. Gen. Genet. 204:349－354 (1984)〕がこれらの３つの構造遺伝子に直ぐ隣接して置かれる。それ故これらの構造遺伝子はアスペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターにより制御される。

完全クローン化アスペルギルス（Aspergillus）trpC遺伝子〔Hamer and Timberlake, Mol. Cell. Biol., 7:2352-2359 (1987)〕がプラスミドに導入される。trpC遺伝子は形質転換されたtrpC突然変異体アスペルギルス(Aspergillus)細胞がトリプトファン非存在下で増殖することを可能にすることにより組み込まれたプラスミドの選択を可能にする。GGPPシンターゼ遺伝子を含むプラスミドですでに形質転換されているアスペルギルス（Aspergillus）株はβ－カロテンを合成することが可能である。

実施例２１．大腸菌におけるゼアキサンチンの産生

ａ．プラスミドpARC404BHの構成

プラスミドpARC376の4323位のEco RV部位から7306位のStu Ｉ部位からの約2938bp断片（図５）をM13mp19（BRLから得られた）のSma Ｉ部位にクローン化した。得られたプラスミドはpARC404 BH-Bと名付けられた。このプラスミドはAusabel et alにより記載され、実施例２(f)で議論された方法を用いてβ－カロテンヒドロキシラーゼ酵素の開始メチオニンに（図５の4991位）Nco Ｉ部位を導入するのに使用された。

Nco Ｉ部位の導入のためのイン　ビトロ突然変異誘発に使用されたオリゴヌクレオチドプローブは：

5′ T TAA ACT ATT TAG TAC CAT GGC GGT GCG CGC TCC TG 3′
(SEQ ID NO:80)

である。β－カロテンヒドロキシラーゼ開始メチオニンへのNco Ｉ部位の導入により、酵素のヌクレオチド配列に下記のような変化が生じた。

本来の配列：

(SEQ ID NO:81)
CAG GAG CGC GCA CCG CT ATG CTA GTA AAT AGT TTA A...
Met Leu Val Asn Ser Leu...
(SEQ ID NO:82)

新規配列：

Nco I (SEQ ID NO:83)
CAG GAG CGC GCA CCG CC ATG GTA CTA AAT AGT TTA A...
Met Val Leu Asn Ser Leu...
(SEQ ID NO:84)

開始メチオニン残基にNco Ｉ部位が新しく導入されたプラスミドはプラスミドpARC404 BH-Cと名付けられた。

プラスミドpARC404 BH-CをNco ＩおよびBan HIで消化した。Nco ＩからBan HIの約311bp断片（プラスミドpARC376では本来新しく導入されたNco Ｉ部位の4991およびBam HI部位の5302にあたる）が単離され、実施例14のプラスミドpARC466のNco ＩおよびBam HI部位にクローン化された。このプラスミドpARC404 BH-Aと称された。

プラスミドpARC376をBam HIおよびSma Ｉで消化し、Ban HI（図５の5302からSma Ｉ（図５の5861）の約559bp断片が単離された。プラスミドpARC404 BH-AがBam HIおよびSma Ｉで消化された。得られたプラスミドはpARC404 BHと称された。このプラスミドは新しく導入されたNco Ｉ部位を遺伝子の始めに持つβ－カロテンヒドロキシラーゼの構造遺伝子を含んでおり、その配列は図21に含まれている。構造遺伝子は約870bp Nco Ｉ－Sma Ｉ断片

として動くことができる。
ｂ．大腸菌のゼアキサンチン産生
プラスミドpARC404 BHをNco Ｉおよび Sma Ｉで消化して、約870bpのNco Ｉ－Sma Ｉ断片が単離された。図６に模式的に示されているプラスミドpARC306A(Rec7プロモーターを含んでいる)をNco Ｉおよび Sma Ｉで消化した。約870bp Nco Ｉ－Sma Ｉ断片がpARC306Aプラスミド内へクローン化され、プラスミドpARC406 BHが形成された。このプラスミドは大腸菌Rec7プロモーターに隣接するβ－カテロンヒドロキシラーゼの構造遺伝子を含んでいる。
プラスミドpARC406 BHが機能性β－カテロンヒドロキシラーゼ酵素をコードしていることを示す為以下の研究が実施された。プラスミドpARC279を含んでいる大腸菌細胞はβ－カテロンヒドロキシラーゼの遺伝子がプラスミドから欠失しているのでβ－カロテンを産生するがゼアキサンチンは産生しない；実施例15(f)。プラスミドpARC279はまた大腸菌細胞に抗生物質クロラムフェニコールに対する耐性を与えるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子も含んでいる。プラスミドpARC279を含む大腸菌細胞は更にプラスミドpARC406 BHで形質転換され、クロラムフェニコールおよびアムピシリン存在下細胞を増殖させた。ピグメントを分析したところゼアキサンチンが観察された。このことはプラスミドpARC406 BH中に存在するβ－カテロンヒドロキシラーゼ遺伝子は機能性活性酵素を産生する活性な遺伝子であることを示している。
β－カテロンヒドロキシラーゼの構造遺伝子はプラスミドpARC406 BHから約870bp Nco Ｉ－Sma Ｉ断片として動くことができる。しかしながら、プラスミドpARC306Aの多クローニング配列中のSma Ｉ部位の下流に制限部位があり、それもまたプラスミドpARC406 BHから構造遺伝子を動かすのに使用できる。以下に記載されているプラスミドpARC145Hの構成においてこれらの下流制限部位の１つを用いてNco Ｉ－Hind III断片として構造遺伝子が移動された。
実施例２２．プラスミドpARC145Hの構成および酵母におけるゼアキサンチン産生のためのプラスミド145Hの使用
プラスミドpARC145GはGAL1およびGAL10プロモーターに隣接しているGGPPシンターゼおよびフィトエンシンターゼの構造遺伝子を含んでいる（図10）。プラスミドpARC145GのPGKターミネーター付近に独特のSph Ｉ部位がある。酵母PGKプロモーターおよびURA3遺伝子からの終止配列と結合されたβ－カテロンヒドロキシラーゼの遺伝子をプラスミドpARC145GのSph Ｉ部位内へクローン化した。得られたプラスミドpARC145HはGal 10/1プロモーターを使用するGGPPシンターゼおよびフィトエンシンターゼ遺伝子およびPGKプロモーターを使用するβ－カテロンヒドロキシラーゼ遺伝子の３つのカロテノイド遺伝子を含んでいる。酵母細胞中このプラスミドとフィトエンデヒドロゲナーゼおよびリコペンシクラーゼの遺伝子を含んでいるプラスミドpARC1520とで一緒に形質転換させると形質転換S.セレビジエ（S.cerevisiae）細胞がβ－カテロンヒドロキシラーゼ酵素によるβ－カロテンからゼアキサンチンの変換を通して、ゼアキサンチンを産生するようになる。
プラスミドpARC145Hは以下に記載する一連の中間体ベクターを経て構成された。
ｂ．PGKプロモーターの単離
サッカロミセス セレビジエ（Saccharomyces cerevisiae）からの３－ホスホグリセラートキナーゼ(PGK)の遺伝子はDr.Maynard Olsen（ワシントン大学，セントルイス，MO）により提供されたラムダMG14ライブラリーから単離された。遺伝子の単離戦略はPGK遺伝子のヌクレオチド配列を使用し、それは決定され発表されている〔Hitzeman et al.,Nucleic Acids Res., 10(23):7791-7808(1983)〕。PGK酵素の開始メチオニンの囲りの領域に対するオリゴヌクレオチドプローブが構成された。プローブは以下のものであった：
５′ATA AAG ACA TTG TTT TTA GAT CTG TTG TAA ３′（SEQ ID NO:100）
本来の配列から２つのヌクレオチドが変化しており、それらは上でボールド体で示されている。これらの２つの変化によりBgl IIの制限部位（AGATCT）が作製された。
ラムダMG14ライブラリーは上記オリゴヌクレオチドプローブによるハンブリダイゼーションによりスクリーニングされた。PGK遺伝子を含むラムダクローンが見い出された。ラム

ダクローンから2.6kb Hind III－Eco RI断片が切り出され、前もってHind IIIおよびEco RIで消化されているM13mp19 ＤＮＡ内へクローン化された。この得られたプラスミドの名前はmARC127である。2.6kb Hind III－Eco RI断片はPGKプロモーターのすべておよびPGK遺伝子の構造部の一部を含んでいる（この構成物は上記Hitzeman et alの論文の7795ページの制限地図に例示されている）。

ｃ．PGKプロモーターへのBgl IIおよびEco RI部位の導入

異種構造遺伝子の発現に使用できるPGKプロモーターの作りかえ物の作製のためPGKプロモーター領域へ２つの制限部位が導入された。これらの導入制限部位はPGKプロモーターをEco RIおよびBgl II断片として動かされることを可能にする。

Bgl II制限部位はPGK遺伝子の開始メチオニンから12bp上流に導入された。前に説明したAusabel et alのイン　ビトロ突然変異誘発プロトコールがPGKプロモーター中へのBgl II部位の導入に使用された。プラスミドmARC127が変形の出発ＤＮＡ源として使用された。PGK遺伝子の単離のために上に掲げたものと同一のオリゴヌクレオチドプローブがPGKプロモーター内へのBgl II部位の導入に使用された。天然PGK配列のヌクレオチド配列は下記のごとくである：

5′ TTA CAA CAA ATA TAA AAA CAA TGT CTT TAT...
MET (SEQ ID NO:85)

イン　ヒドロ突然変異誘発後にはヌクレオチド配列は

Bgl II
5′ TTA CAA CAG ATC TAA AAA CAA TGT CTT TAT...
MET (SEQ ID NO:86)

となり、式中ボールド字体は変化した塩基を示している。PGKプロモーター内へBgl II制限部位が導入されたプラスミドはmARC128と名付けられた。

続いてmARC128プラスミドのBgl II制限部位から530ヌクレオチド上流に、前記のごとく同一のイン　ビトロ突然変異誘発プロトコールを使用してEco RIの制限部位が導入された。イン　ビトロ突然変異誘発プロトコールのために使用されたオリゴヌクレオチドプローブは：

5′ CTT TAT GAG GGT AAC ATG AAT TCA AGA AGG 3′
(SEQ ID NO:87)

であり式中ボールド文字は前と同じである。本来のヌクレオチド配列は

5′ CCT TCT TGA ATT GAT GTT ACC CTC ATA AAG 3′
(SEQ ID NO:88)

であった。Eco RI部位を持つヌクレオチド配列は

Eco RI (SEQ ID NO:89)
5′ CCT TCT TGA AAT CAT GTT ACC CTC ATA AAG 3′

に変化した。

Eco RIおよびBgl II制限部位を持つプラスミドはpARC306Mと名付けられた。このプラスミドにより、PGKプロモーターは約530bpのEco RI－Bgl II断片として動くことができる。

ｄ．プラスミドpARC135Aの構成

プラスミドpUC18をSma Ｉで消化し平滑端を残す。Nco Ｉリンカー(CCCATGGG,ニューイングランド　バイオラボから得られた)を消化pUC18プラスミドのSmaI部位に結合させ、プラスミドを再環化した。得られたプラスミドpSOC109は元々Sma Ｉ部位があった所にNco Ｉ部位を含んでいる。

プラスミドpSOC109をEco RIおよびNco Ｉで消化した。プラスミドpARC306MをBal IIで消化し、末端をＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片を用いて処理して平滑端を形成させ、続いてNco Ｉリンカーを平滑化Bal II位置へ結合させて（前記のごとく）、プラスミドを再環化した。

処理され、再環化されたプラスミドpARC306Mは次にEco RIおよびNco Ｉで消化した。Eco RIおよびNco Ｉ末端を持つ約530bp PGKプロモーターがアガロースゲルにより単離された。このPGKプロモーター含有断片は続いてEco RIおよびNco Ｉ消化pSOC109内へクローン化

された。得られたプラスミドはpARC135Aと称された。

ｅ．プラスミドpARC300Tの構成

URA3遺伝子ターミネーターのための67bpオリゴヌクレオチドが化学的に合成された。Hind III部位がターミネーターの５′末端に置かれ、ターミネーターの３′末端にKpn Ｉ部位が置かれた。このHind III－Kpn Ｉ断片の配列が下に示されており制限部位は下線が引かれている：

Hind III
5′ AGCTTCGAAGAACGAAGGAAGGAGCACAGACTTAGATTGGTATATATACGCATATT
AGCTTCTTGCTTCCTTCCTGGTGTCTGAATCTAACCATATATATGCGTATAA

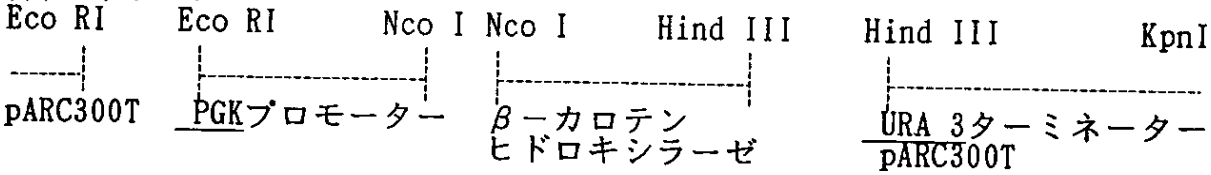
Kpn I
GCGGCCGCGGTAC 3′ (SEQ ID NO:90)
CGCCGGCGC (SEQ ID NO:91)

このHind III－Kpn Ｉ断片をプラスミドpARC300EのHind IIIおよびKpn Ｉ部位へクローン化し、プラスミドpARC300Mを形成させる。プラスミドpARC300Mはプラスミドp UC8の誘導体であるがプラスミドのAat IIおよびCla Ｉ部位の間に特異的Sma Ｉ部位を持っている。pARC300Eで１度だけ存在する制限部位のための制限地図は図22に示されており、一方プラスミドpARC300Mのための制限地図は図23に示されている。

本構成物には適切でないLEU2遺伝子は平滑端化断片としてプラスミドpARC300MのSma Ｉ部位内へクローン化されプラスミドpARC300Tが形成された。図22および23に類似したプラスミドpARC300Tの制限地図は図24に示されている。

ｆ．プラスミドpARC426BHの構成

プラスミドpARC300TをEco RIおよびHind IIIで消化した。プラスミドpARC135AがEco RIおよびNco Ｉで消化され、約530bpのPGKプロモーター断片が単離された。プラスミドpARC406BHがNco ＩおよびHind IIIで消化され、β－カロテンヒドロキシラーゼの構造遺伝子を含むNco Ｉ－Hind III断片が単離された。PGKプロモーターβ－カロテンヒドロキシラーゼ構造遺伝子およびプラスミドpARC307Tと３回の連結が実施された。このことが図解して以下に示してある：



３回連結の後、得られたプラスミドpARC426BHは遺伝子の３′末端にURA3ターミネーターを持つβ－カロテンヒドロキシラーゼ遺伝子を支配するPGKプロモーターを含んでいた。このカセットはこの遺伝子を酵母において発現するために他の酵母ベクター内へ約1500bp Eco RI－Kpn Ｉ断片として動くことができた。

ｇ．プラスミドpARC145Hの構成

プラスミドpARC426BHをEco RIおよびKpn Ｉで消化すると約1500bp断片が単離された（約530bpがPGKプロモーター、約900bpがβ－カロテンヒドロキシラーゼ遺伝子および約67bpがURA3ターミネーター）。末端はＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片による処理により平滑化された。Sph Ｉリンカー（GGCATCC,ニューイングランド バイオラボ）を約1500bpの断片に連結させた。断片は続いてSph Ｉで消化した。このSph Ｉ消化断片は次にGGPPシンターゼおよびフィトエンシンターゼのための遺伝子を含んでいるプラスミドpARC145G（図10）の特異的Sph Ｉ部位内へクローン化し、プラスミドpARC145Hを形成させた。

ｈ．サッカロミセス セレビジエ（Saccharomyces cerevisiae）におけるゼアキサンチンの産生

２つのプラスミドがS.セレビジエ（S.cerevisiae）酵母株YPH499内へ導入された：GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼおよびβ－カロテンヒドロキシラーゼの遺伝子を含むプラスミドpARC145H；およびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Hおよびリコペンシクラーゼ

を含むプラスミドpARC1520。二重に形質転換された酵母細胞はガラクトース存在下で増殖させGAL 10およびGAL 1プロモーターを誘導した。
これらの条件下形質転換された酵母細胞は乾燥細胞重量の約0.01パーセントのゼアキサンチンを産生した。β－カロテンヒドロキシラーゼの遺伝子はPGKプロモーターを用いて発現され、酵素はβ－カロテンをゼアキサンチンへ変換することができた。それ故この研究はゼアキサンチンを酵母で産生することができたことを示したものである。
実施例２３　ピキア　パストリス（Picihia pastoris）におけるゼアキサンチンの産生
前記の方法は他の酵母に対しても拡張可能である。例として挙げられる１つの酵母系はメチルトロフ酵母、ピキア　パストリス（Picihia pastoris）である。
P.パストリス（P.pastoris）においてゼアキサンチンを産生するには、GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４H、リコペンシクラーゼおよびベーターカロテンヒドロキシラーゼの構造遺伝子がピキア（Picihia）における構造遺伝子の発現を支配する制限配列の支配下に置かれる。得られるこれらの遺伝子の発現補完形がピキア（Picihia）細胞に導入される。例えば、Cregg et al.,Biotechnology 5:479-485 (1987);Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385 (1987)、により記載された形質転換および発現系が使用できる。プラスミドpARC489Dからのごとき GGPPシンターゼ構造遺伝子はアルコールオキシターゼ遺伝子（AOX1）プロモーターの下流に、および同一のAOX1遺伝子の転写ターミネーター配列の上流に置かれる。同様に、プラスミドpARC140N、pARC146D、pARC1509、pARC145HおよびpARC406Hからのごときフィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４H、リコペンシクラーゼおよびベーターカロテンヒドロキシラーゼの構造遺伝子はAOX1プロモーターおよびターミネーターの間に置かれる。これら５つの遺伝子すべておよびその側につながる制御領域は続いてP.パストリス（P.pastoris）HIS4遺伝子およびP.パストリス(P.pastoris)細胞内でプラスミド複製を可能にするP.パストリス（P.pastoris）ARS配列（自発的複製配列）〔Cregg et al.,Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385 (1987)〕の両方を運ぶプラスミドに導入される。
ベクターはまたプラスミドの大腸菌細胞での増殖を可能にするpBR322のごときプラスミドの適当な部分も含んでいる。GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４H、リコペンシクラーゼおよびベーターカロテンヒドロキシラーゼならびに上に記載の種々の追加の要素を運んでいる最終的に得られたプラスミドで例えばP.パストリス（P.pastoris）のhis4突然変異体（即ち機能性ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠く株の細胞）を形質転換させる。
ヒスチジンを欠く培地上で形質転換体コロニーを選択後、細胞はヒスチジンを欠くが、AOX1プロモーターを誘導するためCregg et al.,Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385 (1987)により記載されているごとくメタノールを含んでいる培地上で増殖させる。誘導されたAOX1プロモーターは酵素GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４H、リコペンシクラーゼおよびベーターカロテンヒドロキシラーゼを発現させ、P.パストリス（P.pastoris）においてゼアキサンチンの産生を起こす。
GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４H、リコペンシクラーゼおよびベーターカロテンヒドロキシラーゼの５つの遺伝子はCregg et al.,Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385 (1987)により記載されているごとくARS配列の使用を必要としない組み込み的形質転換によっても導入できる。
実施例２４．A.ニデュランス（A.nidulans）におけるゼアキサンチン産生
GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４H、リコペンシクラーゼおよびベーターカロテンヒドロキシラーゼをコードしている遺伝子は前に議論したようにアスペルギルス　ニデュランス（Aspergillus nidulans）のごとき真菌中でのゼアキサンチンの合成および蓄積に使用できる。遺伝子は組み込みによりアスペルギルス(Aspergillus)へ移される。
例えば、GGPPシンターゼの構造遺伝子を大腸菌プラスミドpBR322内へ導入する。argB〔Upshall et al.,Mol. Gen. Genet. 204:349－354 (1986)〕のごときクローン化アスペルギルス（Aspergillus）遺伝子からのプロモーターをGGPPシンターゼ構造遺伝子に隣接させ

てプラスミドに置く。それ故GGPPシンターゼ遺伝子はここではアスペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターの制御下である。
次に、完全クローン化amds遺伝子〔Corrick et al.,Gene 53:63-71 (1987)〕をプラスミドに導入する。amds遺伝子の存在によりアセトアミドのみを単一の炭素または窒素源として使用するようになり、それ故amds含有プラスミドで安定に形質転換されたアスペルギルス（Aspergillus）細胞を選択する手段を与える。
それ故、そのようにして調製されたプラスミドはGGPPシンターゼ遺伝子に融合されたアスペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターおよびアスペルギルス（Aspergillus）形質転換体の選択のために存在するamds遺伝子を含んでいる。アスペルギルス（Aspergillus）は続いてBallance et al, Biochem. Biophys. Res. Commun, 112:284-289（1983）の方法に従ってこのプラスミドで形質転換される。
GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ、リコペンシクラーゼおよびベーターカロテンヒドロキシラーゼ構造遺伝子は各々同様にして大腸菌プラスミドpBR322内へ導入される。クローン化アスペルギルス（Aspergillus）argB遺伝子の為のプロモーター〔Upshall et al.,Mol. Gen. Genet. 204:349－354 (1986)〕がこれらの５つの構造遺伝子に直ぐ隣接して置かれる。それ故これらの構造遺伝子はアスペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターにより制御される。
完全クローン化アスペルギルス（Aspergillus）trpC遺伝子〔Hamer and Timberlake, Mol. Cell. Biol., 7:2352-2359 (1987)〕がプラスミドに導入される。trpC遺伝子は形質転換されたtrpC突然変異体アスペルギルス(Aspergillus)細胞がトリプトファン非存在下で増殖することを可能にすることにより組み込まれたプラスミドの選択を可能にする。GGPPシンターゼ遺伝子を含むプラスミドですでに形質転換されているアスペルギルス（Aspergillus）株はここでゼアキサンチンを合成することが可能である。
実施例２５　高等植物中のベーターカロテンヒドロキシラーゼ
高等植物はカロテノイド産生に必要な酵素をコードしている遺伝子を持っており、そのため生得的にカロテノイドを産生する能力を持っている。しかしながら、大部分の植物においてはそのようにして産生されたゼアキサンチンは更に他の生成物に変換されるのでゼアキサンチンは通常蓄積されない。エルウィニア　ヘルビコーラ(Erwinia herbicola)からのカロテノイド－特異性遺伝子が植物による使用のためのベーターカロテンヒドロキシラーゼの発現ならびに植物におけるゼアキサンチンの蓄積の改良に使用できる。２つの有用なアプローチを以下に説明する。
ａ．葉緑体への転移
第１のアプローチにおいては、図21のベーターカロテンヒドロキシラーゼの遺伝子が前に議論したAusabel et al.の方法を用いて開始メチオニンコドンにおいて図21に示したNco Ｉ部位の代わりに制限部位Sph Ｉが導入されるように変形される。Nco ＩからSph Ｉ部位へのこの変化は発現される酵素変異体の第２番目のアミノ酸残基をロイシン残基に変え、そのため酵素の最初の３つの残基は配列Met-Leu-Leuをもつことになる。
実施例14の方法に従うと、遺伝子工学によるSph Ｉ部位を含むプラスミドがSma ＩおよびSph Ｉで切断され、ベーターカロテンヒドロキシラーゼ構造遺伝子を含む約870bpの断片を得る。CaMV 35Sプロモーター、トランジットペプチドおよびNOS部位を含むプラスミドpARC212がSph ＩおよびSma Ｉで切断され、前記約870bp断片が各々の部位へクローン化されプラスミドpARC1612に類似したプラスミドが形成される。
上記プラスミドをXba Ｉで切断すると約1797bpを含むXba Ｉ－Xba Ｉ断片が提供される。Xba Ｉ－Xba Ｉ断片は以下のものを含んでいる：
（ａ）約450bpのCaMV35Sプロモーター、（ｂ）177bpトランジットペプチド配列、（ｃ）約870bpベーターカロテンヒドロキシラーゼ遺伝子および（ｄ）約300bのNOSポリアデニル化配列。
このXba Ｉ－Xba Ｉ遺伝子構造物をプラスミドpGA482（ファルマシア）の多クローニングリンカー領域内のXba Ｉ制限部位へ挿入してプラスミドを生成させる。pGA482の関連した特色としては（ｉ）アグロバクテリウム　ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens

)中でプラスミドの維持を可能にする複製の起点、（ii）植物ゲノム内の境界間のＤＮＡセグメントの組み込みを支配するＴ－ＤＮＡ領域からの左および右境界配列、および（iii）植物細胞をカナマイシン存在下で生きのびさせることを可能にするカナマイシン耐性遺伝子に隣接するNOSプロモーターなどが挙げられる。

標準プロトコールに従ってアグロバクテリウム　ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens LBA4404(クロンテク．Inc)を上のごとくして形成されたプラスミドで形質転換した。トランジットペプチド－ベーターカロテンヒドロキシラーゼ遺伝子構成物を持つプラスミドを含むアグロバクテリウム（Agrobacterium）細胞がHorsh et al.,Science, 227:1229-1231（1985）の方法を用いてタバコ葉円盤状組織の感染により移される。感染過程の間に本来pGA482プラスミドの左および右境界間の全ＤＮＡセグメントが植物細胞にトランスフェクトされる。トランスフェクトされた植物細胞はカナマイシン耐性が選択され普通の条件下で増殖させゼアキサンチンを蓄積させる。

少くともリコペンシクラーゼの構造遺伝子を、および好適にはGGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼおよびフィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈのためにここで記載された遺伝子もすべて含み、実施例18aに記載されているごとき形質転換された植物もまた、本実施例に記載されている形質転換に宿主として有用である。

ｂ．植物細胞質における産生

前記のカロテノイド遺伝子が適当なベクター（葉緑体に対し前に記載したような）へ同様な技術を用いて導入されるが、ただしトランジットペプチドは除かれ、および図21に示されている５′Nco Ｉ部位は保持されている。pARC406BHのごときベーターカロテンヒドロキシラーゼを含むプラスミドをNco Ｉで切断する。得られる付着末端はＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片で埋めることにより平滑にする。Sma Ｉによる切断により二重の平滑端の断片が得られそれはプラスミドpATC209のSma Ｉ部位内へクローン化できXba Ｉで切断可能な約1620bpの断片を含むプラスミドを生じ、それをpGA482のごときプラスミドにクローン化してA.ツメファシエンス（A.tumefaciens）の形質転換に使用した。

得られる形質転換されたA.ツメファシエンス（A.tumefaciens）は続いて実施例18bにおいて示されたようにタバコまたはアルファルファのごとき高等植物の形質転換に利用した。得られる植物は必要な遺伝子を持ち、CaMV35Sプロモーターを経る発現により細胞質中にゼアキサンチンを産生および蓄積する能力を持っている。

実施例２６　大腸菌におけるゼアキサンチン　ジグルコシドの産生

実施例１はプラスミドpARC376で形質転換された大腸菌におけるゼアキサンチンジグルコシドの産生を例示している。以下の議論は２つのプラスミドで形質転換された大腸菌を用いるゼアキサンチンの産生である。

プラスミドpARC376において、ゼアキサンチングリコシラーゼをコードしているＤＮＡ配列の位置は前述の５つの構造遺伝子に関する前の実施例中に記載されている仕事を考慮すると容易にわかる。グリコシラーゼをコードしている構造遺伝子は大体10256位のEco RV制限部位からすぐ下流のところへ位置していることが見い出された（図５）。コードしている配列は10232位に位置しているATGコドンで始まることが見い出された。

構造遺伝子の５′末端にNde Ｉおよび３′末端にAva Ｉ部位を得るように計画されたPCRプライマーが調製された。天然配列の３つの塩基のみを変更すればよかった。PCRプライマーの配列は下記のごとくであった：

５′末端に対して

天然5′　ATACGCCATGAGCCATTTTGCCATTGTGGC
(SEQ ID NO:92)

プライマー5′ ATACCATATGAGCCATTTTGCCATTGTGGC 3′
Nde I (SEQ ID NO:93)

３′末端に対して

天然3′ GCCCCCCGGGAGTCAGATCGTCTTCATGGA
(SEQ ID NO:94)
3′

プライマー3′ GCCCCCCGGGAGTCAGATCGTCTTCATGGA
Ava I (SEQ ID NO:95)
3′

この突然変異誘発反応に利用された鋳型はプラスミドpARC137B（実施例８ｂ）から得られたBam HI－Bam HI（図５の10524-7775位）断片から得られた。実施例８で利用されたPCR技術がここにおいてもまた利用された。

PCR生成物をNde ＩおよびAva Ｉで消化すると約1390bpの断片が得られ、それをRec 7プロモータープラスミドpARC305N（実施例３）にクローン化するとプラスミドpARC2019が形成された。Ava Ｉ部位はプラスミドpARC376の8842位に生じた。Nde ＩおよびAva Ｉで消化後アガロースゲル上に断片に加えてベクターパターンを再生することによりクローンが確認された。

プラスミドpARC288（実施例１ｂ）で形質転換され、ゼアキサンチンを産生する大腸菌（HB101）を更にプラスミドpARC2019で形質転換した。得られる細胞を溶菌し、細胞抽出物を薄層クロマトグラフィーにより分析した。プラスミドpARC288およびpARC376で形質転換された大腸菌細胞からの抽出物が標準として使用された。pARC288およびpARC2019の両方のプラスミドで形質転換された大腸菌からの抽出物中にゼアキサンチンジグルコシドが同定された。

実施例２７　S.セレビジエ（S.cerevisiae）におけるゼアキサンチン　ジグルコシドの産生

酵母中でゼアキサンチングリコシラーゼを発現できる適当なベクターで更に形質転換された実施例22ｈに記載の多形質転換株YPH499を使用して酵母S.セレビジエ（S.cerevisiae）においてゼアキサンチンジグルコシドが産生された。そのようなベクターの調製が以下に説明される。

プラスミドpARC2019をNde Ｉで消化し、ＤＮＡポリメラーゼのクレノ断片で埋めて平滑端を持つＤＮＡを生成させる。合成リンカー

GAATTC
CTTAAG

を２つの平滑端の間に連結する。

得られる環状プラスミドをAva Ｉで切断する。配列

CCGGGAATTC (SEQ ID NO:96)
TTAAC

の合成リンカーを切断プラスミド内へ連結し、プラスミドを再循環させる。

上記の方法により２つのEco RI制限部位の間にゼアキサンチングリコシドのための構造遺伝子を持つプラスミドが提供される。プラスミドを続いてEco RIで切断すると約1401bpのEco RI－Eco RI断片が提供される。

プラスミドpSOC713をEco RIで切断し、上記約1401bpのEco RI－Eco RI断片を切り出してその中へ連結し、ゼアキサンチングリコシラーゼをコードしている構造遺伝子がGal 10プロモーターの支配下にあり、S.セレビジエ（S.cerevisiae）でのゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子発現のために適したプラスミドを形成させる。実施例22ｈの形質転換されたゼアキサンチン産生S.セレビジエ（S.cerevisiae）の形質転換によりゼアキサンチンジグリコシドを産生する酵母が提供される。

実施例２８　ピキア　パストリス（Picihia pastoris）におけるゼアキサンチンジグルコシドの産生

前に記載した方法がまた他の酵母にも拡張可能である。例として挙げられる１つの酵母系はメチルトロフ酵母、ピキア　パストリス（Picihia pastoris）である。

P.パストリス（P. pastoris）においてゼアキサンチンジグルコシドを産生するには、GGP

Pシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ、リコペンシクラーゼ、ベーターカロテンヒドロキシラーゼおよびゼアキサンチングリコシラーゼの構造遺伝子がピキア（Picihia）において構造遺伝子の発現を支配する制限配列の支配下に置かれる。得られるこれらの遺伝子の発現補完形がピキア（Picihia）細胞に導入される。

例えば、Cregg et al.,Biotechnology 5:479-485 (1987); Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385 (1987)、により記載されている形質転換および発現系が使用できる。pARC489Dからのもののごときggppシンターゼ構造遺伝子はアルコールオキシターゼ遺伝子（AOX1）プロモーターの下流には、および同一のAOX1遺伝子の転写ターミネーター配列の上流に置かれる。同様に、プラスミドpARC140N、pARC146D、pARC1509、pARC145H、pARC4068HおよびpARC2019からのフィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ、リコペンシクラーゼ、ベーターカロテンヒドロキシラーゼおよびゼアキサングリコシラーゼはAOX1プロモーターおよびターミネーターの間に置かれる。６つのこれら遺伝子全部およびその側にある制御領域はP.パストリス（P.pastoris）HIS4遺伝子およびP.パストリス(P.pastoris)細胞内でのプラスミド複製を可能にするP.パストリス（P.pastoris）ARS配列（自発的複製配列）〔Cregg et al.,Molecular and Cellular Biology12:3376-3385 (1987)〕の両方を運んでいるプラスミドに導入される。

ベクターはまた大腸菌細胞においてプラスミドの増殖を可能にするpBR322のごときプラスミドの適当な部分も含んでいる。ggppシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ、リコペンシクラーゼ、ベーターカロテンヒドロキシラーゼおよびゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子ならびに上記の種々の追加の要素を運ぶ最終的に得られたプラスミドでP.パストリス（P.pastoris）のhis4突然変異体（即ち機能性ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠く株の細胞）を例えば形質転換する。

ヒスチジンを欠く培地上で形質転換体コロニーを選択後、細胞をヒスチジンを欠くが、Cregg et al.,Molecular and Cellular Biology,12:3376-3385 (1987)により記載されているごとくAOX1プロモーターを誘導するためにメタノールが含まれている培地上で増殖させる。誘導されたAOX1プロモーターは酵素ggppシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ、リコペンシクラーゼ、ベーターカロテンヒドロキシラーゼおよびゼアキサンチングリコシラーゼを発現させ、P.パストリス（P.pastoris）においてゼアキサンチンジグルコシドの産生を起こす。

ggppシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ、リコペンシクラーゼ、ベーターカロテンヒドロキシラーゼおよびゼアキサンチングリコシラーゼの６つの遺伝子はCregg et al.,Molecular and Cellular Biology 12:3376-3385（1987）により記載されているごとき、ARS配列の使用を必要としない組み込み的形質転換によっても導入できる。

実施例２９．A.ニデュランス（A.nidulans）におけるゼアキサンチン　ジグルコシド産生

ggppシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ、リコペンシクラーゼ、ベーターカロテンヒドロキシラーゼおよびゼアキサンチングリコシラーゼをコードしている遺伝子は前に議論したようにアスペルギルス　ニデュランス（Aspergillus nidulans）のごとき真菌中でのゼアキサンチンジグルコシドの合成および蓄積に使用できる。遺伝子は組み込みによりアスペルギルス(Aspergillus)へ移される。

例えば、ggppシンターゼの構造遺伝子を大腸菌プラスミドpBR322内へ導入する。argB〔Upshall et al.,Mol. Gen. Genet. 204:349－354 (1986)〕のごときクローン化アスペルギルス（Aspergillus）遺伝子からのプロモーターをggppシンターゼ構造遺伝子に隣接させてプラスミドに置く。それ故ggppシンターゼ遺伝子はここではアスペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターの制御下である。

次に、完全クローン化amds遺伝子〔Corrick et al.,Gene 53:63-71 (1987)〕をプラスミドに導入する。amds遺伝子の存在によりアセトアミドのみを単一の炭素または窒素源として使用するようになり、それ故amds含有プラスミドで安定に形質転換されたアスペルギルス（Aspergillus）細胞を選択する手段を与える。

それ故、そのようにして調製されたプラスミドはGGPPシンターゼ遺伝子に融合されたアスペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターおよびアスペルギルス（Aspergillus）形質転換体の選択のために存在するamds遺伝子を含んでいる。アスペルギルス（Aspergillus）は続いてBallance et al, Biochem. Biophys. Res. Commun, 112:284-289（1983）の方法に従ってこのプラスミドで形質転換される。

GGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈ、リコペンシクラーゼ、ベーターカロテンヒドロキシラーゼおよびゼアキサンチングリコシラーゼ構造遺伝子は各々同様にして大腸菌プラスミドpBR322内へ導入される。クローン化アスペルギルス（Aspergillus）argB遺伝子の為のプロモーター〔Upshall et al.,Mol. Gen. Genet. 204:349－354 (1984)〕がこれら６つの構造遺伝子に直ぐ隣接して置かれる。それ故これらの構造遺伝子アスペルギルス（Aspergillus）argBプロモーターにより制御される。

完全クローン化アスペルギルス（Aspergillus）trpC遺伝子〔Hamer and Timberlake, Mol. Cell.Biol., 7:2352-2359 (1987)〕がプラスミドに導入される。trpC遺伝子は形質転換されたtrpC突然変異体アスペルギルス(Aspergillus)細胞がトリプトファン非存在下で増殖することを可能にすることにより組み込まれたプラスミドの選択を可能にする。GGPPシンターゼ遺伝子を含むプラスミドですでに形質転換されているアスペルギルス（Aspergillus）株はここでゼアキサンチンジグルコシドを合成することが可能である。

実施例３０　高等植物におけるゼアキサンチン　グリコシラーゼおよびゼアキサンチンジグルコシド

タバコおよびアルファルファのごとき高等植物はカロテノイド産生に必要な酵素をコードしている遺伝子を持っており、そのため生得的にカロテノイドを産生する能力を持っている。しかしながら、大部分の植物においてはそのようにして産生されたゼアキサンチンジグルコシドは更に他の生成物に変換されるのでゼアキサンチンジグルコシドは通常蓄積されない。エルウィニア　ヘルビコーラ(Erwinia herbicola)からのカロテノイド－特異性遺伝子が植物による使用のためのゼアキサンチングリコシラーゼの発現ならびに植物におけるゼアキサンチンジグルコシドの蓄積の改良に使用できる。２つの有用なアプローチを以下に説明する。

ａ．葉緑体への転移

第１のアプローチにおいては、図25のゼアキサンチングリコシラーゼの構造遺伝子が前記のAusabelらの方法を用いて開始メチオニンコドンにおいて図25に示されたNde Ｉの代わりに制限部位Sph Ｉを導入するように変形される。例えばプラスミドpARC2019を用いるとこの過程は酵素の第２番目のアミノ酸残基をセリンからアルギニンに変えるが、生物学的にはゼアキサンチングリコシラーゼ酵素変異体を与える。

実施例14の方法に従い、遺伝子工学によるSph Ｉ部位を含むプラスミドを最初にAva Ｉで切断し、ＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片により平滑端にする。その後Sph Ｉで切断するとゼアキサンチングリコシラーゼ構造遺伝子を含む約1200bpの断片が得られる。CaMV 35Sプロモーター、トランジットペプチドおよびNOSポリアデニル化部位を含むプラスミドpATC212をSph ＩおよびSma Ｉで切断し、上記の約1200bp断片をその各々の部位へクローン化してプラスミドpARC1612と類似のプラスミドを作製する。

上記プラスミドをXba Ｉで切断すると約2127bpを含むXba Ｉ－Xba Ｉ断片が得られる。そのXba Ｉ－Xba Ｉは以下のものを含んでいる：

（ａ）約450bpのCaMV35Sプロモーター、（ｂ）177bpトランジットペプチド配列、（ｃ）約1200bpのゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子および（ｄ）約300bのNOSポリアデニル化配列。

このXba Ｉ－Xba Ｉ遺伝子構造物をプラスミドpGA482（ファルマシア）の多クローニングリンカー領域内の都合の良い制限部位へ挿入してプラスミドを生成させる。pGA482の関連した特色としては（ｉ）アグロバクテリウム　ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)中でプラスミドの維持を可能にする複製の起点、（ii）植物ゲノム内の境界間のＤＮＡセグメントの組み込みを支配するＴ－ＤＮＡ領域からの左および右境界配列、および（iii）植物細胞をカナマイシン存在下で生きのびさせることを可能にするカナマイシン

耐性遺伝子に隣接するNOSプロモーターなどが挙げられる。
標準プロトコールに従ってアグロバクテリウム　ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)LBA4404(クロンテク．Inc)を上のごとくして形成されたプラスミドで形質転換した。トランジットペプチドーゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子構成物を持つプラスミドを含むアグロバクテリウム（Agrobacterium）細胞がHorsh et al.,Science, 227:1229-1231（1985）の方法を用いてタバコ葉円盤状組織の感染により移される。感染過程の間に本来pGA482プラスミドの左および右境界間の全ＤＮＡセグメントが植物細胞にトランスフェクトされる。トランスフェクトされた植物細胞はカナマイシン耐性が選択され普通の条件下で増殖させゼアキサンチンジグルコシドを蓄積させる。
少くともリコペンシクラーゼ構造遺伝子を、および好適にはGGPPシンターゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ－４Ｈおよびβ－カロテンヒドロキシラーゼのここに記載した遺伝子をまた含む実施例25ａに記載の形質転換体植物は、ここに記載したごとく形質転換の宿主としても有用でる。
ｂ．植物細胞質における産生
前記のカロテノイド遺伝子が適当なベクター（葉緑体に対し前に記載したような）へ同様な技術を用いて導入されるが、ただしトランジットペプチドは除かれ、および図25に示されている５′Nde Ｉ部位は保持されている。pARC2019のごときゼアキサンチングリコシラーゼ構造遺伝子を含むプラスミドをNde ＩおよびAva Ｉで切断する。得られる付着末端はＤＮＡポリメラーゼのクレノー断片で平滑にする。得られる二重平滑端をプラスミドpARC209のSma Ｉ部位へクローン化し、Xba Ｉ－切断可能断片を含むプラスミドを作製すると、それはCaMV35Sプロモーター、ゼアキサンチングリコシラーゼ遺伝子およびNOSポリアデニル化配列を含んでおり、pGA482のごときプラスミド内へクローン化でき続いてA.ツメファシエンス（A.tumefaciens）の形質転換に使用される。
得られる形質転換体A.ツメファシエンス（A.tumefaciens）は続いて実施例25ｂにおいて示されたようにタバコまたはアルファルファのごとき高等植物の形質転換に使用される。得られる植物は必要な遺伝子およびCaMV35Sプロモーターを経る発現により細胞質中にゼアキサンチンジグルコシドを産生および蓄積する能力を持っている。
本発明をある種の好適な実施態様およびそれに関する例示によって説明してきたが、当業者はその精神から離れることなく種々の変形、変更、省略および置換ができることを容易に理解するであろう。
それ故、本発明は以下の請求の範囲によってのみ制限されるつもりである。
配列表
(1)一般情報：
(i)出願人：オージッヒ，ロドニー　Ｌ
ブリンクハウス，フリードヘルム　Ｌ
ムクハルジ，インドラニ
プロフィト，ジョン　Ｈ
ヤーガー，ジエームズ　Ｇ
イエン，フエイーチェ　Ｂ
(ii)発明の名称：遺伝子工学宿主内でのゼアキサンチンおよびグリコシル化ゼアキサンチンの生合成
(iii)配列の数：１００
(iv)連絡先：
（A）連絡先：アモコ　コーポレーション，特許および契約部
（B）ストリート：２００　Ｅ　ランドルフ　ストリート
（C）都市：シカゴ
（D）州：イリノイ
（E）国：ＵＳＡ
（F）郵便番号：６０６８０－０７０３
(v)コンピューター読み取り可能形態：

（A）媒体タイプ：フロッピーディスク
（B）コンピューター：ＩＢＭ　ＰＣ　互換性
（C）オペレーティングシステム：ＰＣ－ＤＯＳ／ＭＳ－ＤＯＳ
（D）ソフトウェア：ＰａｔｅｎｔＩｎ　＃１．２４版
(vi)現在の出願データ：
（A）出願番号：
（B）出願日：
（C）分類：
(viii)代理人：
（A）氏名：ギャロウェイ，ノーバル　Ｂ
(ix)通信先：
（A）電話：３１２８５６７１８０
（B）ファクシミリ：３１２８５６４９７２
（２）配列Ｎｏ．１の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：１１５７bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．１

AGA -121

TCTAAAGGCA CAGCGTCTCA TGCTTCGCAC AATGTAAAAC TGCTTCAGAA CCTGGCGAGA -61

GCTATCCGCG CGGTCTACGG TTAACTGATA CTAAAAGACA ATTCAGCGGG TAACCTTGCA -1

ATGGTGAGTG GCAGTAAAGC GGGCGTTTCG CCTCATCGCG AAATAGAGGT AATGAGACAA 60

TCCATTGACG ATCACCTGGC TGGCCTGTTA CCTGAAACCG ACAGCCAGGA TATCGTCAGC 120

CTTGCGATGC GTGAAGGCGT CATGGCACCC GGTAAACGGA TCCGTCCGCT GCTGATGCTG 180

CTGGCCGCCC GCGACCTCCG CTACCAGGGC AGTATGCCTA CGCTGCTCGA TCTCGCCTGC 240

GCCGTTGAAC TGACCCATAC CGCGTCGCTG ATGCTCGACG ACATGCCCTG CATGGACACC 300

GCCGAGCTGC GCCGCGGTCA GCCCACTACC CACAAAAAAT TTGGTGAGAG CGTGGCGATC 360

CTTGCCTCCG TTGGGCTGCT CTCTAAAGCC TTTGGTCTGA TCGCCGCCAC CGGCGATCTG 420

CCGGGGGAGA GGCGTGCCCA GGCGGTCAAC GAGCTCTCTA CCGCCGTGGG GCTGCAGGGC 480

CTGGTACTGG GGCAGTTTCG CGATCTTAAC GATGCCGCCC TCGACCGTAC CCCTGACGCT 540

ATCCTCAGCA CCAACCACCT CAAGACCGGC ATTCTGTTCA GCGCGATGCT GCAGATCGTC 600

GCCATTGCTT CCGCCTCGTC GCCGAGCACG CGAGAGACGC TGCACGCCTT CGCCCTCGAC 660

TTCGGCCAGG CGTTTCAACT GCTGGACGAT CTGCGTGACG ATCACCCGGA AACCGGTAAA 720

GATCGCAATA AGGACGCGGG AAAATCGACG CTGGTCAACC GGCTGGGCGC AGACGCGGCC 780

CGGCAAAAGC TGCGCGAGCA TATTGATTCC GCCGACAAAC ACCTCACTTT TGCCTGTCCG 840

CAGGGCGGCG CCATCCGACA GTTTATGCAT CTGTGGTTTG GCCATCACCT TGCCGACTGG 900

TCACCGGTCA TGAAAATCGC CTGATACCGC CCTTTTGGGT TCAAGCAGTA CATAACGATG 960

GAACCACATT ACAGGAGTAG TGATGAATGA AGGACGAGCG CCTTGTTCAG CGTAAGAACG 1020

ATCATCTGGA TATC 1034

（２）配列Ｎｏ．２の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：３０７アミノ酸

（B）タイプ：アミノ酸

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：蛋白質

(xi)配列：配列Ｎｏ．２：

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

130 135 140

Arg Ala Gln Ala Val Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val Gly Leu Gln Gly
145 150 155 160

Leu Val Leu Gly Gln Phe Arg Asp Leu Asn Asp Ala Ala Leu Asp Arg
165 170 175

Thr Pro Asp Ala Ile Leu Ser Thr Asn His Leu Lys Thr Gly Ile Leu
180 185 190

Phe Ser Ala Met Leu Gln Ile Val Ala Ile Ala Ser Ala Ser Ser Pro
195 200 205

Ser Thr Arg Glu Thr Leu His Ala Phe Ala Leu Asp Phe Gly Gln Ala
210 215 220

Phe Gln Leu Leu Asp Asp Leu Arg Asp Asp His Pro Glu Thr Gly Lys
225 230 235 240

Asp Arg Asn Lys Asp Ala Gly Lys Ser Thr Leu Val Asn Arg Leu Gly
245 250 255

Ala Asp Ala Ala Arg Gln Lys Leu Arg Glu His Ile Asp Ser Ala Asp
260 265 270

Lys His Leu Thr Phe Ala Cys Pro Gln Gly Gly Ala Ile Arg Gln Phe
275 280 285

Met His Leu Trp Phe Gly His His Leu Ala Asp Trp Ser Pro Val Met
290 295 300

Lys Ile Ala
305

（２）配列Ｎｏ．３の情報：

(A) 長さ：１１５７bp

(B) タイプ：核酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．３：

```
                                    AGATCTAAAG GCACAGCGTC TCATGCTTCG -121
CACAATGTAA AACTGCTTCA GAACCTGGCG AGAGCTATCC GCGCGGTCTA CGGTTAACTG  -61
ATACTAAAAG ACAATTCAGC GGGTAACCTT GCAATGGTGA GTGGCAGTAA AGCGGGCGTC   -1
ATGGCCGAAT TCGAAATAGA GGTAATGAGA CAATCCATTG ACGATCACCT GGCTGGCCTG   60
TTACCTGAAA CCGACAGCCA GGATATCGTC AGCCTTGCGA TGCGTGAAGG CGTCATGGCA  120
CCCGGTAAAC GGATCCGTCC GCTGCTGATG CTGCTGGCCG CCCGCGACCT CCGCTACCAG  180
GGCAGTATGC CTACGCTGCT CGATCTCGCC TGCGCCGTTG AACTGACCCA TACCGCGTCG  240
CTGATGCTCG ACGACATGCC CTGCATGGAC ACCGCCGAGC TGCGCCGCGG TCAGCCCACT  300
ACCCACAAAA AATTTGGTGA GAGCGTGGCG ATCCTTGCCT CCGTTGGGCT GCTCTCTAAA  360
GCCTTTGGTC TGATCGCCGC CACCGGCGAT CTGCCGGGGG AGAGGCGTGC CCAGGCGGTC  420
AACGAGCTCT CTACCGCCGT GGGGCTGCAG GGCCTGGTAC TGGGGCAGTT TCGCGATCTT  480
AACGATGCCG CCCTCGACCG TACCCCTGAC GCTATCCTCA GCACCAACCA CCTCAAGACC  540
GGCATTCTGT TCAGCGCGAT GCTGCAGATC GTCGCCATTG CTTCCGCCTC GTCGCCGAGC  600
ACGCGAGAGA CGCTGCACGC CTTCGCCCTC GACTTCGGCC AGGCGTTTCA ACTGCTGGAC  660
GATCTGCGTG ACGATCACCC GGAAACCGGT AAAGATCGCA ATAAGGACGC GGGAAAATCG  720
ACGCTGGTCA ACCGGCTGGG CGCAGACGCG GCCCGGCAAA AGCTGCGCGA GCATATTGAT  780
TCCGCCGACA AACACCTCAC TTTTGCCTGT CCGCAGGGCG GCGCCATCCG ACAGTTTATG  840
CATCTGTGGT TTGGCCATCA CCTTGCCGAC TGGTCACCGG TCATGAAAAT CGCCTGATAC  900
CGCCCTTTTG GGTTCAAGCA GTACATAACG ATGGAACCAC ATTACAGGAG TAGTGATGAA  960
TGAAGGACGA GCGCCTTGTT CAGCGTAAGA ACGATCATCT GGATATC               1007
```

（２）配列Ｎｏ．４の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：２９８アミノ酸

（B）タイプ：アミノ酸

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：蛋白質

(xi)配列：配列Ｎｏ．４：

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

210 215 220

Asp His Pro Glu Thr Gly Lys Asp Arg Asn Lys Asp Ala Gly Lys Ser

225 230 235 240

Thr Leu Val Asn Arg Leu Gly Ala Asp Ala Ala Arg Gln Lys Leu Arg

245 250 255

Glu His Ile Asp Ser Ala Asp Lys His Leu Thr Phe Ala Cys Pro Gln

260 265 270

Gly Gly Ala Ile Arg Gln Phe Met His Leu Trp Phe Gly His His Leu

275 280 285

Ala Asp Trp Ser Pro Val Met Lys Ile Ala

290 295

（２）配列Ｎｏ．５の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：１１９８bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．５：

GATTG AGGATCTGCA -1

ATGAGCCAAC CGCCGCTGCT TGACCACGCC ACGCAGACCA TGGCCAACGG CTCGAAAAGT 60

TTTGCCACCG CTGCGAAGCT GTTCGACCCG GCCACCCGCC GTAGCGTGCT GATGCTCTAC 120

ACCTGGTGCC GCCACTGCGA TGACGTCATT GACGACCAGA CCCACGGCTT CGCCAGCGAG 180

GCCGCGGCGG AGGAGGAGGC CACCCAGCGC CTGGCCCGGC TGCGCACGCT GACCCTGGCG 240

GCGTTTGAAG GGGCCGAGAT GCAGGATCCG GCCTTCGCTG CCTTTCAGGA GGTGGCGCTG 300

ACCCACGGTA TTACGCCCCG CATGGCGCTC GATCACCTCG ACGGCTTTGC GATGGACGTG 360

GCTCAGACCC GGTATGTCAC CTTTGAGGAT ACGCTGCGCT ACTGCTATCA CGTGGCGGGC 420

GTGGTGGGTC TGATGATGGC CAGGGTGATG GGCGTGCGGG ATGAGCGGGT GCTGGATCGC 480

GCCTGCGATC TGGGGCTGGC CTTCCAGCTG ACGAATATGG CCCGGGATAT TATTGACGAT 540

GCGGCTATTG ACCGCTGCTA TCTGCCCGCC GAGTGGCTGC AGGATGCCGG GCTGGCCCCG 600

GAGAACTATG CCGCGCGGGA GAATCGCCCC GCGCTGGCGC GGTGGCGGAG GCTTATTGAT 660

GCCGCAGAGC CGTACTACAT CTCCTCCCAG GCCGGGCTAC ACGATCTGCG GCGGCGCTCC 720

GCGTGGGCGA TCGCCACCGC CCGCAGCGTC TACCGGGAGA TCGGTATTAA GGTAAAAGCG 780

GCGGGAGGCA GCGCCTGGGA TCGCCGCCAG CACACCAGCA AAGGTGAAAA AATTGCCATG 840

CTGATGGCGG CACCGGGGCA GGTTATTCGG GCGAAGACGA CGAGGGTGAC GCCGCGTCCG 900

GCCGGTCTTT GGCAGCGTCC CGTTTAGGCG GGCGGCCATG ACGTTCACGC AGGATCGCCT 960

GTAGGTCGGC AGGCTTGCGG GCGTAAATAA AACCGAAGGA GACGCAGCCC TCCCGGCCGC 1020

GCACCGCGTG GTGCAGGCGG TGGGCGACGT AGAGCCGCTT CAGGTAGCCC CGGCGCGGGA 1080

TCCAGTGGAA GGGCCAGCGC TGATGCACCA GACCGTCGTG CACCAGGAAG TAGAGCAGGC 1140

CATAGACCGT CATGCCGCAG CCAATCCACT GCAGGGGCCA AAC 1183

（２）配列Ｎｏ．６の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：３０８アミノ酸

（B）タイプ：アミノ酸

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：蛋白質

(xi)配列：配列Ｎｏ．６：

Met Ser Gln Pro Pro Leu Leu Asp His Ala Thr Gln Thr Met Ala Asn
1 5 10 15
Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ala Lys Leu Phe Asp Pro Ala Thr
20 25 30
Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Thr Trp Cys Arg His Cys Asp Asp
35 40 45
Val Ile Asp Asp Gln Thr His Gly Phe Ala Ser Glu Ala Ala Ala Glu
50 55 60
Glu Glu Ala Thr Gln Arg Leu Ala Arg Leu Arg Thr Leu Thr Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Glu Gly Ala Glu Met Gln Asp Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln

85 90 95

Glu Val Ala Leu Thr His Gly Ile Thr Pro Arg Met Ala Leu Asp His

100 105 110

Leu Asp Gly Phe Ala Met Asp Val Ala Gln Thr Arg Tyr Val Thr Phe

115 120 125

Glu Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu

130 135 140

Met Met Ala Arg Val Met Gly Val Arg Asp Glu Arg Val Leu Asp Arg

145 150 155 160

Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Met Ala Arg Asp

165 170 175

Ile Ile Asp Asp Ala Ala Ile Asp Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Glu Trp

180 185 190

Leu Gln Asp Ala Gly Leu Ala Pro Glu Asn Tyr Ala Ala Arg Glu Asn

195 200 205

Arg Pro Ala Leu Ala Arg Trp Arg Arg Leu Ile Asp Ala Ala Glu Pro

210 215 220

Tyr Tyr Ile Ser Ser Gln Ala Gly Leu His Asp Leu Arg Arg Arg Ser

225 230 235 240

Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Arg Ser Val Tyr Arg Glu Ile Gly Ile

245 250 255

Lys Val Lys Ala Ala Gly Gly Ser Ala Trp Asp Arg Arg Gln His Thr

260 265 270

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

275 280 285

Ile Arg Ala Lys Thr Thr Arg Val Thr Pro Arg Pro Ala Gly Leu Trp

290 295 300

Gln Arg Pro Val

305

（２）配列Ｎｏ．７の情報：

(i)配列の特徴
（A）長さ：１５１８bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．７：

TAAACC -1

ATGGAAAAAA CCGTTGTGAT TGGCGCAGGC TTTGGTGGCC TGGCGCTGGC GATTCGCCTG 60

CAGGCGGCAG GGATCCCAAC CGTACTGCTG GAGCAGCGGG ACAAGCCCGG CGGTCGGGCC 120

TACGTCTGGC ATGACCAGGG CTTTACCTTT GACGCCGGGC CGACGGTGAT CACCGATCCT 180

ACCGCGCTTG AGGCGCTGTT CACCCTGGCC GGCAGGCGCA TGGAGGATTA CGTCAGGCTG 240

CTGCCGGTAA AACCCTTCTA CCGACTCTGC TGGGAGTCCG GGAAGACCCT CGACTATGCT 300

AACGACAGCT TCGAGCTTGA GGCGCAGATT ACCCAGTTCA ACCCCCGCGA CGTCGAGGGC 360

TACCGGCGCT TTCTGGCTTA CTCCCAGGCG GTATTCCAGG AGGGATATTT GCGCCTCGGC 420

AGCGTGCCGT TCCTCTCTTT TCGCGACATG CTGCGCGCCG GGCCGCAGCT GCTTAAGCTC 480

CAGGCGTGGC AGAGCGTCTA CCAGTCGGTT TCGCGCTTTA TTGAGGATGA GCATCTGCGG 540

CAGGCCTTCT CGTTCCACTC CCTGCTGGTA GGCGGCAACC CCTTCACCAC CTCGOTCCATC 600

TACACCCTGA TCCACGCCCT TGAGCGGGAG TGGGGGGTCT GGTTCCCTGA GGGCGGCACC 660

GGGGCGCTGG TGAACGGCAT GGTGAAGCTG TTTACCGATC TGGGCGGGGA GATCGAACTC 720

AACGCCCGGG TCGAAGAGCT GGTGGTGGCC GATAACCGCG TAAGCCAGGT CCGGCTCGCG 780

GATGGTCGGA TCTTTGACAC CGACGCCGTA GCCTCGAACG CTGACGTGGT GAACACCTAT 840

AAAAAGCTGC TCGGCACCAT ACCGGTGGGG CAGAAGCGGG CGGCACGGCT GGAGCGCAAG 900

AGCATGAGCA ACTCGCTGTT TGTGCTCTAC TTCGGCCTGA ACCAGCCTCA TTCCCAGCTG 960

GCGCACCATA CCATCTGTTT TGGTCCCCGC TACCGGGAGC TGATCGACGA GATCTTTACC 1020

GGCAGCGCGC TGGCGGATGA CTTCTCGCTC TACCTGCACT CGCCCTGCGT GACCGATCCC 1080

TCGCTCGCGC CTCCCCCGTG CGCCAGCTTC TACGTGCTGG CCCCGGTGCC GCATCTTGGC 1140

AACGCGCCGC TGGACTGGGC GCAGGAGGGG CCGAAGCTGC GCGACCGCAT CTTTGACTAC 1200

CTTGAAGAGC GCTATATGCC CGGCCTGCGT AGCCAGCTGG TGACCCAGCG GATCTTTACC 1260

CGGCAGACTT CACGACACGC TTGGATCGCG ATCTTGGGAT CGCTTTTCAT CGAGCCGCCT 1320

TCGTTGACCC AAGGCTTGTT CGCCGCAAAC GCGACACGAC ATTCAAACCT CTACCTGGTG 1380

GCCGCAGGTA CTCACCCTGG CGCGGGCATT CCTGGCGTAG TGGGCCTCGC CGAAAGCACC 1440

GCCAGCCTGA TGATTGAGGA TCTGCAATGA GCCAACCGCC GCTGCTTGAC CACGCCACGC 1500

AGACCATGGC CA 1512

（２）配列Ｎｏ．８の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：４８９アミノ酸

（B）タイプ：アミノ酸

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：蛋白質

(xi)配列：配列Ｎｏ．８：

Met Lys Lys Thr Val Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu
1 5 10 15
Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Thr Val Leu Leu Glu Gln
20 25 30
Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Trp His Asp Gln Gly Phe
35 40 45
Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Thr Ala Leu Glu
50 55 60
Ala Leu Phe Thr Leu Ala Gly Arg Arg Met Glu Asp Tyr Val Arg Leu
65 70 75 80
Leu Pro Val Lys Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Thr
85 90 95

Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ser Phe Glu Leu Glu Ala Gln Ile Thr Gln
100 105 110
Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Arg Phe Leu Ala Tyr Ser
115 120 125
Gln Ala Val Phe Gln Glu Gly Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Val Pro Phe
130 135 140
Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Gly Pro Gln Leu Leu Lys Leu
145 150 155 160
Gln Ala Trp Gln Ser Val Tyr Gln Ser Val Ser Arg Phe Ile Glu Asp
165 170 175
Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly
186 185 190
Asn Pro Phe Thr Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu
195 200 205
Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Glu Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val
210 215 220
Asn Gly Met Val Lys Leu Phe Thr Asp Leu Gly Gly Glu Ile Glu Leu
225 230 235 240
Asn Ala Arg Val Glu Glu Leu Val Val Ala Asp Asn Arg Val Ser Gln
245 250 255
Val Arg Leu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Asp Thr Asp Ala Val Ala Ser
260 265 270
Asn Ala Asp Val Val Asn Thr Tyr Lys Lys Leu Leu Gly Thr Ile Pro
275 280 285
Val Gly Gln Lys Arg Ala Ala Arg Leu Glu Arg Lys Ser Met Ser Asn
290 295 300
Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn Gln Pro His Ser Gln Leu
305 310 315 320
Ala His His Thr Ile Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp

325 330 335

Glu Ile Phe Thr Gly Ser Ala Leu Ala Asp Asp Phe Ser Leu Tyr Leu

340 345 350

His Ser Pro Cys Val Thr Asp Pro Ser Leu Ala Pro Pro Pro Cys Ala

355 360 365

Ser Phe Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Asn Ala Pro Leu

370 375 380

Asp Trp Ala Gln Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Asp Tyr

385 390 395 400

Leu Glu Glu Arg Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr Gln

405 410 415

Arg Ile Phe Thr Arg Gln Thr Ser Arg His Ala Trp Ile Ala Ile Leu

420 425 430

Gly Ser Leu Phe Ile Glu Pro Pro Ser Leu Thr Gln Gly Leu Phe Ala

435 440 445

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

450 455 460

His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Val Gly Leu Ala Glu Ser Thr

465 470 475 480

Ala Ser Leu Met Ile Glu Asp Leu Gln

485

（２）配列Ｎｏ．９の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：１５２２bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．９：

GAGGTCGACG -1

ATGGAAAAAA CCGTTGTGAT TGGCGCAGGC TTTGGTGGCC TGGCGCTGGC GATTCGCCTG 60

CAGGCGGCAG GGATCCCAAC CGTACTGCTG GAGCAGCGGG ACAAGCCCGG CGGTCGGGCC 120

TACGTCTGGC ATGACCAGGG CTTTACCTTT GACGCCGGGC CGACGGTGAT CACCGATCCT 180

ACCGCGCTTG AGGCGCTGTT CACCCTGGCC GGCAGGCGCA TGGAGGATTA CGTCAGGCTG 240

CTGCCGGTAA AACCCTTCTA CCGACTCTGC TGGGAGTCCG GGAAGACCCT CGACTATGCT 300

AACGACAGCT TCGAGCTTGA GGCGCAGATT ACCCAGTTCA ACCCCCGCGA CGTCGAGGGC 360

TACCGGCGCT TTCTGGCTTA CTCCCAGGCG GTATTCCAGG AGGGATATTT GCGCCTCGGC 420

AGCGTGCCGT TCCTCTCTTT TCGCGACATG CTGCGCGCCG GGCCGCAGCT GCTTAAGCTC 480

CAGGCGTGGC AGAGCGTCTA CCAGTCGGTT TCGCGCTTTA TTGAGGATGA GCATCTGCGG 540

CAGGCCTTCT CGTTCCACTC CCTGCTGGTA GGCGGCAACC CCTTCACCAC CTCGTCCATC 600

TACACCCTGA TCCACGCCCT TGAGCGGGAG TGGGGGGTCT GGTTCCCTGA GGGCGGCACC 660

GGGGCGCTGG TGAACGGCAT GGTGAAGCTG TTTACCGATC TGGGCGGGGA GATCGAACTC 720

AACGCCCGGG TCGAAGAGCT GGTGGTGGCC GATAACCGCG TAAGCCAGGT CCGGCTCGCG 780

GATGGTCGGA TCTTTGACAC CGACGCCGTA GCCTCGAACG CTGACGTGGT GAACACCTAT 840

AAAAAGCTGC TCGGCACCAT ACCGGTGGGG CAGAAGCGGG CGGCACGGCT GGAGCGCAAG 900

AGCATGAGCA ACTCGCTGTT TGTGCTCTAC TTCGGCCTGA ACCAGCCTCA TTCCCAGCTG 960

GCGCACCATA CCATCTGTTT TGGTCCCCGC TACCGGGAGC TGATCGACGA GATCTTTACC 1020

GGCAGCGCGC TGGCGGATGA CTTCTCGCTC TACCTGCACT CGCCCTGCGT GACCGATCCC 1080

TCGCTCGCGC CTCCCCCGTG CGCCAGCTTC TACGTGCTGG CCCCGGTGCC GCATCTTGGC 1140

AACGCGCCGC TGGACTGGGC GCAGGAGGGG CCGAAGCTGC GCGACCGCAT CTTTGACTAC 1200

CTTGAAGAGC GCTATATGCC CGGCCTGCGT AGCCAGCTGG TGACCCAGCG GATCTTTACC 1260

CGGCAGACTT CACGACACGC TTGGATCGCG ATCTTGGGAT CGCTTTTCAT CGAGCCGCCT 1320

TCGTTGACCC AAGGCTTGTT CGCCGCAAAC GCGACACGAC ATTCAAACCT CTACCTGGTG 1380

GCCGCAGGTA CTCACCCTGG CGCGGGCATT CCTGGCGTAG TGGGCCTCGC CGAAAGCACC 1440

GCCAGCCTGA TGATTGAGGA TCTGCAATGA GCCAACCGCC GCTGCTTGAC CACGCCACGT 1500

CGACCATGGC CA 1512

（２）配列Ｎｏ．１０の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：１７７bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．１０：

ATGGCTTCCT CAGTTCTTTC CTCTGCAGCA GTTGCCACCC GCAGCAATGT TGCTCAAGCT 60

AACATGGTGG CGCCTTTCAC TGGCCTTAAG TCAGCTGCCT CATTCCCTGT TTCAAGGAAG 120

CAAAACCTTG ACATCACTTC CATTGCCAGC AACGGCGGAA GAGTGCAATG CATGCAG 177

（２）配列Ｎｏ．１１の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：１２３５bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．１１：

CAGGGAGTG AGAGCGTATC -1

GTGAGGGATC TGATTTTAGT CGGCCGCGGC CTGGCCAACG GGCTGATCGC CTGGCGTCTG 60

CGCCAGCGCT ACCCGCAGCT TAACCTGCTG CTGATCGAGG CCGGGGAGCA GCCCGGCGGG 120

AACCATACCT GGTCATTCCA TGAAGACGAT CTGACTCCCG GGCAGCACGC CTGGCTGGCC 180

CCGCTGGTGG CCCACGCCTG GCCGGGCTAT GAGGTGCAGT TTCCCGATCT TCGCCGTCGC 240

CTCGCGCGCG GCTACTACTC CATTACCTCA GAGCGCTTTG CCGAGGCCCT GCATCAGGCG 300

CTGGGGGAGA ACATCTGGCT AAACTGTTCG GTGAGCGAGG TGTTACCCAA TAGCGTGCGC 360

CTTGCCAACG GTGAGGCGCT GCTTGCCGGA GCGGTGATTG ACGGACGCGG CGTGACCGCC 420

AGTTCGGCGA TGCAAACCGG CTATCAGCTC TTTCTTGGTC AGCAGTGGCG GCTGACACAG 480

CCCCACGGCC TGACCGTACC GATCCTGATG GATGCCACGG TGGCGCAGCA GCAGGGCTAT 540

CGCTTTGTCT ACACGCTGCC GCTCTCCGCC GACACGCTGC TGATCGAGGA TACGCGCTAC 600

GCCAATGTCC CGCAGCGTGA TGATAATGCC CTACGCCAGA CGGTTACCGA CTATGCTCAC 660

AGCAAAGGGT GGCAGCTGGC CCAGCTTGAA CGCGAGGAGA CCGGCTGTCT GCCGATTACC 720

TGGCGGGTGA CATCCAGGCT CTGTGGGCCG ATGCGCCGGC GTGCCGCGTC GGGAATGCGG 780

GCTGGGCTAT TTCACCCTAC CACTGGCTAT TCGCTGCCGC TGGCGGTGGC CCTTGCCGAC 840

GCGATTGCCG ACAGCCCGCG GCTGGGCAGC GTTCCGCTCT ATCAGCTCAC CCGGCAGTTT 900

GCCGAACGCC ACTGGCGCAG GCAGGGATTC TTCCGCCTGC TGAACCGGAT GCTTTTCCTG 960

GCCGGGCGCG AGGAGAACCG CTGGCGGGTG ATGCAGCGCT TTTATGGGCT GCCGGAGCCC 1020

ACCGTAGAGC GCTTTTACGC CGGTCGGCTC TCTCTCTTTG ATAAGGCCCG CATTTTGACG 1080

GGCAAGCCAC CGGTTCCGCT GGCGAAGTCT GGCGGGCGGC GCTGAACCAT TTTCCTGACA 1140

GACGAGATAA AGGATGAAAA AAACCGTTGT GATTGGCGCA GGCTTTGGTG GCCTGGCGCT 1200

GGCGATTCGC CTGCAG 1216

（２）配列Ｎｏ．１２の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：１２３５bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．１２：

CAGGGAGTG AGAGGCGCGC -1

ATGCGGGATC TGATTTTAGT CGGCCGCGGC CTGGCCAACG GGCTGATCGC CTGGCGTCTG 60
CGCCAGCGCT ACCCGCAGCT TAACCTGCTG CTGATCGAGG CCGGGGAGCA GCCCGGCGGG 120
AACCATACCT GGTCATTCCA TGAAGACGAT CTGACTCCCG GGCAGCACGC CTGGCTGGCC 180
CCGCTGGTGG CCCACGCCTG GCCGGGCTAT GAGGTGCAGT TTCCCGATCT TCGCCGTCGC 240
CTCGCGCGCG GCTACTACTC CATTACCTCA GAGCGCTTTG CCGAGGCCCT GCATCAGGCG 300
CTGGGGGAGA ACATCTGGCT AAACTGTTCG GTGAGCGAGG TGTTACCCAA TAGCGTGCGC 360
CTTGCCAACG GTGAGGCGCT GCTTGCCGGA GCGGTGATTG ACGGACGCGG CGTGACCGCC 420
AGTTCGGCGA TGCAAACCGG CTATCAGCTC TTTCTTGGTC AGCAGTGGCG GCTGACACAG 480
CCCCACGGCC TGACCGTACC GATCCTGATG GATGCCACGG TGGCGCAGCA GCAGGGCTAT 540
CGCTTTGTCT ACACGCTGCC GCTCTCCGCC GACACGCTGC TGATCGAGGA TACGCGCTAC 600
GCCAATGTCC CGCAGCGTGA TGATAATGCC CTACGCCAGA CGGTTACCGA CTATGCTCAC 660
AGCAAAGGGT GGCAGCTGGC CCAGCTTGAA CGCGAGGAGA CCGGCTGTCT GCCGATTACC 720
TGGCGGGTGA CATCCAGGCT CTGTGGGCCG ATGCGCCGGC GTGCCGCGTC GGGAATGCGG 780
GCTGGGCTAT TTCACCCTAC CACTGGCTAT TCGCTGCCGC TGGCGGTGGC CCTTGCCGAC 840
GCGATTGCCG ACAGCCCGCG GCTGGGCAGC GTTCCGCTCT ATCAGCTCAC CCGGCAGTTT 900
GCCGAACCCC ACTGGCGCAG GCAGGGATTC TTCCGCCTGC TGAACCGGAT GCTTTTCCTG 960
GCCGGGCGCG AGGAGAACCG CTGGCGGGTG ATGCAGCGCT TTTATGGGCT GCCGGAGCCC 1020
ACCGTAGAGC GCTTTTACGC CGGTCGGCTC TCTCTCTTTG ATAAGGCCCG CATTTTGACG 1080
GGCAAGCCAC CGGTTCCGCT GGCGAAGTCT GGCGGGCGGC GCTGAACCAT TTTCCTGACA 1140
GACGAGATAA AGGGATCCGA TGACCGTTGT GATTGGCGCA GGCTTTGGTG GCCTGGCGCT 1200
GGCGATTCGC CTGCAG 1216

（２）配列Ｎｏ．１３の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：３７４アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：蛋白質

(xi)配列：配列Ｎｏ．１３：

Met Arg Asp Leu Ile Leu Val Gly Arg Gly Leu Ala Asn Gly Leu Ile

1 5 10 15

Ala Trp Arg Leu Arg Gln Arg Tyr Pro Gln Leu Asn Leu Leu Leu Ile

20 25 30

Glu Ala Gly Glu Gln Pro Gly Gly Asn His Thr Trp Ser Phe His Glu

35 40 45

Asp Asp Leu Thr Pro Gly Gln His Ala Trp Leu Ala Pro Leu Val Ala
50 55 60
His Ala Trp Pro Gly Tyr Glu Val Gln Phe Pro Asp Leu Arg Arg Arg
65 70 75 80
Leu Ala Arg Gly Tyr Tyr Ser Ile Thr Ser Glu Arg Phe Ala Glu Ala
85 90 95
Leu His Gln Ala Leu Gly Glu Asn Ile Trp Leu Asn Cys Ser Val Ser
100 105 110
Glu Val Leu Pro Asn Ser Val Arg Leu Ala Asn Gly Glu Ala Leu Leu
115 120 125
Ala Gly Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Val Thr Ala Ser Ser Ala Met
130 135 140
Gln Thr Gly Tyr Gln Leu Phe Leu Gly Gln Gln Trp Arg Leu Thr Gln
145 150 155 160
Pro His Gly Leu Thr Val Pro Ile Leu Met Asp Ala Thr Val Ala Gln
165 170 175
Gln Gln Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Thr Leu Pro Leu Ser Ala Asp Thr
180 185 190
Leu Leu Ile Glu Asp Thr Arg Tyr Ala Asn Val Pro Gln Arg Asp Asp
195 200 205
Asn Ala Leu Arg Gln Thr Val Thr Asp Tyr Ala His Ser Lys Gly Trp
210 215 220
Gln Leu Ala Gln Leu Glu Arg Glu Glu Thr Gly Cys Leu Pro Ile Thr
226 230 235 240
Trp Arg Val Thr Ser Arg Leu Cys Gly Pro Met Arg Arg Arg Ala Ala
245 250 255
Ser Gly Met Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr Thr Gly Tyr Ser Leu
260 265 270
Pro Leu Ala Val Ala Leu Ala Asp Ala Ile Ala Asp Ser Pro Arg Leu

275 280 285

Gly Ser Val Pro Leu Tyr Gln Leu Thr Arg Gln Phe Ala Glu Arg His

290 295 300

Trp Arg Arg Gln Gly Phe Phe Arg Leu Leu Asn Arg Met Leu Phe Leu

305 310 315 320

Ala Gly Arg Glu Glu Asn Arg Trp Arg Val Met Gln Arg Phe Tyr Gly

325 330 335

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

340 345 350

Phe Asp Lys Ala Arg Ile Leu Thr Gly Lys Pro Pro Val Pro Leu Ala

355 360 365

Lys Ser Gly Gly Arg Arg

370

（２）配列Ｎｏ．１４の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：９４７bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．１４：

TGAG TCGCAGGAGC GCGCACCGCT -1

ATGCTAGTAA ATAGTTTAAT CGTCATCTTG ACCGTTATTG CGATGGAGGG CATCGCCGCG 60

TTTACCCACC GCTACATTAT GCACGGCTGG GGATGGCGCT GGCATGAGCC ACACCATACC 120

CCGCGCAAGG GCGTATTTGA GCTAAACGAT CTCTTTGCGG TGGTGTTTGC CGGGGTGGCT 180

ATCGCGCTGA TTGCCGTGGG CACGGCGGGC GTTTGGCCCC TGCAGTGGAT TGGCTGCGGC 240

ATGACGGTCT ATGGCCTGCT CTACTTCCTG GTGCACGACG GTCTGGTGCA TCAGCGCTGG 300

CCCTTCCACT GGATCCCGCG CCGGGGCTAC CTGAAGCGGC TCTACGTCGC CCACCGCCTG 360

CACCACGCGG TGCGCGGCCG GGAGGGCTGC GTCTCCTTCG GTTTTATTTA CGCCCGCAAG 420

CCTGCCGACC TACAGGCGAT CCTGCGTGAA CGTCATGGCC GCCCGCCTAA ACGGGACGCT 480

GCCAAAGACC GGCCGGACGC GGCGTCACCC TCGTCGTCTT CGCCCGAATA ACCTGCCCCG 540

GTGCCGCCAT CAGCATGGCA ATTTTTTCAC CTTTGCTGGT GTGCTGGCGG CGATCCCAGG 600

CGCTGCCTCC CGCCGCTTTT ACCTTAATAC CGATCTCCCG GTAGACGCTG CGGGCGGTGG 660

CGATCGCCCA CGCGGAGCGC CGCCGCAGAT CGTGTAGCCC GGCCTGGGAG GAGATGTAGT 720

ACGGCTCTGC GGCATCAATA AGCCTCCGCC ACCGCGCCAG CGCGGGGCGA TTCTCCCGCG 780

CGGCATAGTT CTCCGGGGCC AGCCCGGCAT CCTGCAGCCA CTCGGCGGGC AGATAGCAGC 840

GGTCAATAGC CGCATCGTCA ATAATATCCC GGGCCATATT CGTCAGCTGG AAGGCCAGCC 900

CCAGATCGCA GGCGCGATCC AGC 923

（２）配列Ｎｏ．１５の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：９４７bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．１５：

TGAG TCGCAGGAGC GCGCACCGCC -1

ATGGTACTAA ATAGTTTAAT CGTCATCTTG ACCGTTATTG CGATGGAGGG CATCGCCGCG 60

TTTACCCACC GCTACATTAT GCACGGCTGG GGATGGCGCT GGCATGAGCC ACACCATACC 120

CCGCGCAAGG GCGTATTTGA GCTAAACGAT CTCTTTGCGG TGGTGTTTGC CGGGGTGGCT 180

ATCGCGCTGA TTGCCGTGGG CACGGCGGGC GTTTGGCCCC TGCAGTGGAT TGGCTGCGGC 240

ATGACGGTCT ATGGCCTGCT CTACTTCCTG GTGCACGACG GTCTGGTGCA TCAGCGCTGG 300

CCCTTCCACT GGATCCCGCG CCGGGGCTAC CTGAAGCGGC TCTACGTCGC CCACCGCCTG 360

CACCACGCGG TGCGCGGCCG GGAGGGCTGC GTCTCCTTCG GTTTTATTTA CGCCCGCAAG 420

CCTGCCGACC TACAGGCGAT CCTGCGTGAA CGTCATGGCC GCCCGCCTAA ACGGGACGCT 480

GCCAAAGACC GGCCGGACGC GGCGTCACCC TCGTCGTCTT CGCCCGAATA ACCTGCCCCG 540

GTGCCGCCAT CAGCATGGCA ATTTTTTCAC CTTTGCTGGT GTGCTGGCGG CGATCCCAGG 600

CGCTGCCTCC CGCCGCTTTT ACCTTAATAC CGATCTCCCG GTAGACGCTG CGGGCGGTGG 660

CGATCGCCCA CGCGGAGCGC CGCCGCAGAT CGTGTAGCCC GGCCTGGGAG GAGATGTAGT 720

ACGGCTCTGC GGCATCAATA AGCCTCCGCC ACCGCGCCAG CGCGGGGCGA TTCTCCCGCG 780

CGGCATAGTT CTCCGGGGCC AGCCCGGCAT CCTGCAGCCA CTCGGCGGGC AGATAGCAGC 840

GGTCAATAGC CGCATCGTCA ATAATATCCC GGGCCATATT CGTCAGCTGG AAGGCCAGCC 900

CCAGATCGCA GGCGCGATCC AGC 923

（２）配列Ｎｏ．１６の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：１７６アミノ酸

（B）タイプ：アミノ酸

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：蛋白質

(xi)配列：配列Ｎｏ．１６：

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

（２）配列Ｎｏ．１７の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：３９９アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：蛋白質
(xi)配列：配列Ｎｏ．１７：

Met Ser His Phe Ala Ile Val Ala Pro Pro Leu Tyr Ser His Ala Val
1 5 10 15
Ala Leu His Ala Leu Ala Leu Glu Met Ala Gln Arg Gly His Arg Val
20 25 30
Thr Phe Leu Thr Gly Asn Val Ala Ser Leu Ala Glu Gln Glu Thr Glu
35 40 45
Arg Val Ala Phe Tyr Pro Leu Pro Ala Ser Val Gln Gln Ala Gln Arg
50 55 60
Asn Val Gln Gln Gln Ser Asn Gly Asn Leu Leu Arg Leu Ile Ala Ala
65 70 75 80
Met Ser Ser Leu Thr Asp Val Leu Cys Gln Gln Leu Pro Ala Ile Leu
85 90 95
Gln Arg Leu Ala Val Asp Ala Leu Ile Val Asp Glu Met Glu Pro Ala

100 105 110

Gly Ser Leu Val Ala Glu Ala Leu Gly Leu Pro Phe Ile Ser Ile Ala

115 120 125

Cys Ala Leu Pro Val Asn Arg Glu Leu Pro Leu Pro Val Met Pro Phe

130 135 140

His Tyr Ala Glu Asp Lys Arg Ala Arg Ala Arg Phe Gln Val Ser Glu

145 150 155 160

Arg Ile Tyr Asp Ala Leu Met Tyr Pro His Gly Gln Thr Ile Leu Arg

165 170 175

His Ala Gln Arg Phe Gly Leu Pro Glu Arg Arg Arg Leu Asp Glu Cys

189 185 190

Leu Ser Pro Leu Ala Gln Ile Ser Gln Ser Val Pro Ala Leu Asp Phe

195 200 205

Pro Arg Arg Ala Leu Pro Asn Cys Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu Arg

210 215 220

Tyr Gln Pro Pro Pro Gln Val Glu Arg Ser Pro Arg Ser Thr Pro Arg

225 230 235 240

Ile Phe Ala Ser Leu Gly Thr Leu Gln Gly His Arg Leu Arg Leu Phe

245 250 255

Gln Lys Ile Ala Arg Ala Cys Ala Ser Val Gly Ala Glu Val Thr Ile

260 265 270

Ala His Cys Asp Gly Leu Thr Pro Ala Gln Ala Asp Ser Leu Tyr Cys

275 280 285

Gly Ala Thr Glu Val Val Ser Phe Val Asp Gln Pro Arg Tyr Val Ala

290 295 300

Glu Ala Asn Leu Val Ile Thr His Gly Gly Leu Asn Thr Val Leu Asp

305 310 315 320

Ala Leu Ala Ala Ala Thr Pro Val Leu Ala Val Pro Leu Ser Phe Asp

325 330 335

Gln Pro Ala Val Ala Ala Arg Leu Val Tyr Asn Gly Leu Gly Arg Arg
340 345 350
Val Ser Arg Phe Ala Arg Gln Gln Thr Leu Ala Asp Glu Ile Ala Gln
355 360 365
Leu Leu Gly Asp Glu Thr Leu His Gln Arg Val Ala Thr Ala Arg Gln
370 375 380
Gln Leu Asn Asp Ala Gly Gly Thr Pro Arg Cys Gly Asp Pro Asp
385 390 395

（２）配列Ｎｏ．１８の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：３９bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．１８：
TCAGCGGGTA ACCTTGCCAT GGGGAGTGGC AGTAAAGCG 39

（２）配列Ｎｏ．１９の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：１２bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．１９：
TTGCAATGGT GA 12

（２）配列Ｎｏ．２０の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：１２bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．２０：
TTGCCATGGG GA 12

（２）配列Ｎｏ．２１の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：３９bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．２１：
CATGGCGAAA TAGAAGCCAT GGGACAATCC ATTGACGAT 39

（２）配列Ｎｏ．２２の情報：

(i)配列の特徴
（A）長さ：１２bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．２２：
AAGTAATGAG AC 12

（２）配列Ｎｏ．２３の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：１２bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．２３：
AAGCCATGGG AC 12

（２）配列Ｎｏ．２４の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：１５アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．２４：
Met Val Ser Gly Ser Lys Ala Gly Val Ser Pro His Arg Glu Ile

1 5 10 15

（２）配列Ｎｏ．２５の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：６アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．２５：
Met Ala Glu Phe Glu Ile

1 5

（２）配列Ｎｏ．２６の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：４６bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．２６：
GATCTAAAAT GAGCCAACCG CCGCTGCTTG ACCACGCCAC GCAGAC 46

（２）配列Ｎｏ．２７の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：４６bp
（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．２７：
CATGGTCTGC GTGGCGTGGT CAAGCAGCGG CGGTTGGCTC ATTTTA 46

（２）配列Ｎｏ．28の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：28bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．28：
ACAACAAAAT ATAAAAACAA TGTCTTTA 28

（２）配列Ｎｏ．29の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：28bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．29：
ACAACAAGAT CTAAAAACAA TGTCTTTA 28

（２）配列Ｎｏ．30の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：17bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．30：
AATTCCCGGG CCATGGC 17

（２）配列Ｎｏ．31の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：17bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．31：
AATTGCCATG GCCCGGG 17

（２）配列Ｎｏ．32の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：29bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．32：
AAACCATGGA AAAAACCGTT GTGATTGGC 29

（２）配列Ｎｏ．33の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：21bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．33：
GGCCATGGTC TGCGTGGCGT G 21

（２）配列Ｎｏ．34の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．34：
TAAAGGATGA AAAAAACCGT TGTGATTGGC 30

（２）配列Ｎｏ．35の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：８アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．35：
Met Lys Lys Thr Val Val Ile Gly
1 5

（２）配列Ｎｏ．36の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．36：
TAAACCATGG AAAAAACCGT TGTGATTGGC 30

（２）配列Ｎｏ．37の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：８アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．37：
Met Glu Lys Thr Val Val Ile Gly
1 5

（２）配列Ｎｏ．38の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp

（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．38：
GAGATAAAGG ATGAAAAAAA CCGTTGTGAT 30
（２）配列Ｎｏ．39の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．39：
GAGGTCGACG ATGAAAAAAA CCGTTGTGAT 30
（２）配列Ｎｏ．40の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：29bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．40：
ATGGTCGACG TGGCGTGGTC AAGCAGCGG 29
（２）配列Ｎｏ．41の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．41：
GAGATAAAGG ATGAAAAAAA CCGTTGTGAT 30
（２）配列Ｎｏ．42の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：６アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．42：
Met Lys Lys Thr Val Val
1 5
（２）配列Ｎｏ．43の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：22bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．43：
CCATGGAAAA AACCGTTGTG AT 22

（２）配列Ｎｏ．44の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：６アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．44：
Met Glu Lys Thr Val Val
1 5

（２）配列Ｎｏ．45の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．45：
GAGGTCGACG ATGAAAAAAA CCGTTGTGAT 30

（２）配列Ｎｏ．46の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：６アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．46：
Met Lys Lys Thr Val Val
1 5

（２）配列Ｎｏ．47の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：31bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．47：
CCGCTGCTTG ACCACGCCAC GCAGACCATG G 31

（２）配列Ｎｏ．48の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：31bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．48：
CCGCTGCTTG ACCACGCCAC GTCGACCATG G 31

（２）配列Ｎｏ．49の情報：

(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．49：
GACGAGATAA AGCATGCAAA AAACCGTTGT 30

（２）配列Ｎｏ．50の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：5アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．50：
Met Gln Lys Thr Val
1 5

（２）配列Ｎｏ．51の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．51：
GACGAGATAA AGGATGAAAA AAACCGTTGT 30

（２）配列Ｎｏ．52の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：5アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．52：
Met Lys Lys Thr Val
1 5

（２）配列Ｎｏ．53の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．53：
GACGAGATAA AGCATGCAAA AAACCGTTGT 30

（２）配列Ｎｏ．54の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：5アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸

（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．54：
Met Gln Lys Thr Val

1 5

（２）配列Ｎｏ．55の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：37bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．55：
CATGGCTTCC TCAGTTCTTT CCTCTGCAGC AGTTGCC 37

（２）配列Ｎｏ．56の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：37bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．56：
GGGTGGCAAC TGCTGCAGAG GAAAGAACTG AGGAAGC 37

（２）配列Ｎｏ．57の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：34bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．57：
ACCCGCAGCA ATGTTGCTCA AGCTAACATG GTGG 34

（２）配列Ｎｏ．58の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：32bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．58：
CGCCACCATG TTAGCTTGAG CAACATTGCT GC 32

（２）配列Ｎｏ．59の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：50bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．50：

CGCCTTTCAC TGGCCTTAAG TCAGCTGCCT CATTCCCTGT TTCAAGGAAG 50

（２）配列Ｎｏ．60の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：64bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．60：

TTTGCTTCCT TGAAACAGGG AATGAGGCAG CGAATGAGGC AGCTGACTTA AGGCCAGTCA 60

AAGG 64

（２）配列Ｎｏ．61の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：54bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．61：

CAAAACCTTG ACATCACTTC CATTGCCAGC AACGGCGGAA GAGTGCAATG CATG 54

（２）配列Ｎｏ．62の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：46bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．62：

CATTGCACTC TTCCGCCGTT GCTGGCAATG GAAGTGATGT CAAGGT 46

（２）配列Ｎｏ．63の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：37bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．63：

CATGGCTTCC TCAGTTCTTT CCTCTGCAGC AGTTGCC 37

（２）配列Ｎｏ．64の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：37bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．64：

GGGTGGCAAC TGCTGCAGAG GAAAGAACTG AGGAAGC 37

（２）配列Ｎｏ．65の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：34bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．65：
ACCCGCAGCA ATGTTGCTCA AGCTAACATG GTGG 34
（２）配列Ｎｏ．66の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：32bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．66：
CGCCACCATG TTAGCTTGAG CAACATTGCT GC 32
（２）配列Ｎｏ．67の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：50bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．67：
CGCCTTTCAC TGGCCTTAAG TCAGCTGCCT CATTCCCTGT TTCAAGGAAG 50
（２）配列Ｎｏ．68の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：52bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．68：
TTTGCTTCCT TGAAACAGGG AATGAGGCAG CTGACTTAAG GCCAGTGAAA GG 52
（２）配列Ｎｏ．69の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：54bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．69：
CAAAACCTTG ACATCACTTC CATTGCCAGC AACGGCGGAA GAGTGCAATG CATG 54
（２）配列Ｎｏ．70の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：46bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．70：
CATTGCACTC TTCCGCCGTT GCTGGCAATG GAAGTGATGT CAAGGT 46

（２）配列Ｎｏ．71の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：71bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．71：
CATGGCTTCC TCAGTTCTTT CCTCTGCAGC AGTTGCCACC CGCAGCAATG TTGCTCAAGC 60

TAACATGGTG G 71

（２）配列Ｎｏ．72の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：69bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．72：
CGCCACCATG TTAGCTTGAG CAACATTGCT GCGGGTGGCA CTGCTGCAG AGGAAAGAAC 60

TGAGGAAGC 69

（２）配列Ｎｏ．73の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：104bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．73：
CGCCTTTCAC TGGCCTTAAG TCAGCTGCCT CATTCCCTGT TTCAAGGAAG CAAAACCTTG 60

ACATCACTTC CATTGCCAGC AACGGCGGAA GAGTGCAATG CATG 104

（２）配列Ｎｏ．74の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：98bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．74：
CATTGCACTC TCCGCCGTT GCTGGCAATG GAAGTGATGT CAAGGTTTTG CTTCCTTGAA 60

ACAGGGAATG AGGCAGCTGA CTTAAGGCCA GTGAAAGG 98

（２）配列Ｎｏ．75の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：36bp
（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．75：
CCTGCAGGCA TCCAACCATG GCGTAATCAT GGTCAT 36

（２）配列Ｎｏ．76の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：35bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．76：
AGAGCGTATC GTGAGGGATC TGATTTTAGT CGGCG 35

（２）配列Ｎｏ．77の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：35bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．77：
GCGCGGATCC ATGGGGGATC TGATTTTAGT CGGCG 35

（２）配列Ｎｏ．78の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：32bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．78：
GCGGCGCATG CGGGATCTGA TTTTAGTCGG CG 32

（２）配列Ｎｏ．79の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．79：
CATCGGATCC TGTCAGGAAA ATGGTTCAGC 30

（２）配列Ｎｏ．80の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：36bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．80：
TTAAACTATT TAGTACCATG GCGGTGCGCG CTCCTG 36

（２）配列Ｎｏ．81の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：36bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．81：
CAGGAGCGCG CACCGCTATG CTAGTAAATA GTTTAA 36

（２）配列Ｎｏ．82の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：6アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．82：
Met Leu Val Asn Ser Leu

1 5

（２）配列Ｎｏ．83の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：36bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．83：
CAGGAGCGCG CACCGCCATG GTACTAAATA GTTTAA 36

（２）配列Ｎｏ．84の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：6アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ペプチド
(xi)配列：配列Ｎｏ．84：
Met Val Leu Asn Ser Leu

1 5

（２）配列Ｎｏ．85の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．85：
TTACAACAAA TATAAAAACA ATGTCTTTAT 30
（２）配列Ｎｏ．86の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．86：
TTACAACAGA TCTAAAAACA ATGTCTTTAT 30
（２）配列Ｎｏ．87の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．87：
CTTTATGAGG GTAACATGAA TTCAAGAAGG 30
（２）配列Ｎｏ．88の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．88：
CCTTCTTGAA TTGATGTTAC CCTCATAAAG 30
（２）配列Ｎｏ．89の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．89：
CCTTCTTGAA ATCATGTTAC CCTCATAAAG 30
（２）配列Ｎｏ．90の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：69bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．90：
AGCTTCGAAG AACGAAGGAA GGAGCACAGA CTTAGATTGG TATATATACG CATATTGCGG

CCGCGGTAC
（２）配列Ｎｏ．91の情報：

(i)配列の特徴
（A）長さ：61bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．91：
AGCTTCTTGC TTCCTTCCTG GTGTCTGAAT CTAACCATAT ATATGCGTAT AACGCCGGCG 60

C 61

（２）配列Ｎｏ．92の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．92：
ATACGCCATG AGCCATTTTG CCATTGTGGC 30

（２）配列Ｎｏ．93の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．93：
ATACCATATG AGCCATTTTG CCATTGTGGC 30

（２）配列Ｎｏ．94の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．94：
GCCCCCCGGG AGTCAGATCG TCTTCATGGA 30

（２）配列Ｎｏ．95の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：30bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．95：
GCCCCCCGGG AGTCAGATCG TCTTCATGGA 30

（２）配列Ｎｏ．96の情報：
(i)配列の特徴

（A）長さ：10bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．96：
CCGGGAATTC 10
（２）配列Ｎｏ．97の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：1200bp
（B）タイプ：核酸
（C）鎖：一本鎖
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）
(xi)配列：配列Ｎｏ．97：

ATGAGCCATT TTGCCATTGT GGCACCGCCG CTCTACAGTC ATGCGGTGGC GCTGCATGCC 60

CTGGCGCTGG AGATGGCCCA ACGCGGCCAC CGGGTGACCT TTCTCACCGG CAACGTCGCC 120

TCGCTGGCAG AGCAGGAAAC GGAGCGGGTG GCGTTCTATC CACTTCCCGC CAGCGTGCAA 180

CAGGCCCAGC GCAACGTCCA GCAGCAGAGT AACGGCAACC TGCTGCGGCT GATTGCGGCC 240

ATGTCATCCC TGACCGATGT GCTCTGCCAG CAGTTGCCCG CTATTCTACA GCGGCTGGCG 300

GTGGACGCGC TGATTGTCGA TGAGATGGAG CCCGCCGGAA GCCTGGTCGC CGAGGCGCTG 360

GGACTACCAT TTATCTCTAT TGCCTGCGCG CTGCCGGTCA ACCGCGAGCT GCCGCTGCCG 420

GTGATGCCGT TTCACTACGC CGAGGATAAG AGAGCCCGTG CGCGTTTTCA GGTCAGCGAA 480

CGGATCTACG ATGCGCTGAT GTACCCGCAC GGGCAGACGA TCCTGCGCCA CGCCCAGCGC 540

TTTGGTTTGC CGGAGCGCAG GCGTCTCGAC GAGTGTCTCT CGCCCCTGGC GCAGATTAGC 600

CAGTCCGTTC CGGCCCTCGA CTTCCCACGC CGGGCGCTGC CGAACTGTTT TACCTACGTG 660

GGAGCACTGC GCTATCAGCC CCCGCCGCAG GTAGAACGCT CGCCACGCAG CACGCCGCGG 720

ATCTTTGCCT CGCTGGGCAC CCTCCAGGGC CACCGTCTAC GCCTGTTTCA GAAGATCGCC 780

CGCGCCTGTG CCAGCGTGGG CGCGGAGGTG ACCATTGCCC ACTGCGATGG CCTGACGCCC 840

GCCCAGGCCG ACTCGCTCTA CTGCGGCGCG ACGGAGGTGG TCAGCTTTGT CGACCAGCCG 900

CGCTACGTTG CCGAGGCTAA TCTGGTGATC ACCCACGGCG GTCTCAATAC CGTACTGGAT 960

GCGCTGGCTG CCGCGACGCC GGTGCTGGCG GTGCCACTCT CTTTCGACCA GCCCGCCGTG 1020

GCTGCCCGGC TGGTCTATAA CGGGCTGGGT CGCCGGGTAT CGCGCTTTGC CAGACAGCAG 1080

ACGCTGGCGG ATGAGATTGC CCAACTGCTG GGGGATGAGA CGCTGCATCA GCGTGTGGCG 1140

ACGGCCCGCC AGCAGCTTAA CGACGCCGGG GGCACGCCCC GTTGCGGCGA CCCTGATTGA 1200

（２）配列Ｎｏ．98の情報：
(i)配列の特徴

（A）長さ：59アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：蛋白質
(xi)配列：配列Ｎｏ．98：

Met Ala Ser Ser Val Leu Ser Ser Ala Ala Val Ala Thr Arg Ser Asn
1 5 10 15
Val Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Ala
20 25 30
Ala Ser Phe Pro Val Ser Arg Lys Gln Asn Leu Asp Ile Thr Ser Ile
35 40 45
Ala Ser Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln
50 55

（２）配列Ｎｏ．99の情報：
(i)配列の特徴
（A）長さ：489アミノ酸
（B）タイプ：アミノ酸
（D）トポロジー：直鎖
(ii)分子タイプ：蛋白質
(xi)配列：配列Ｎｏ．99：

Met Glu Lys Thr Val Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu
1 5 10 15
Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Thr Val Leu Leu Glu Gln
20 25 30
Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Trp His Asp Gln Gly Phe
35 40 45
Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Thr Ala Leu Glu
50 55 60
Ala Leu Phe Thr Leu Ala Gly Arg Arg Met Glu Asp Tyr Val Arg Leu
65 70 75 80
Leu Pro Val Lys Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Thr
85 90 95
Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ser Phe Glu Leu Glu Ala Gln Ile Thr Gln

100 105 110

Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Arg Phe Leu Ala Tyr Ser

115 120 125

Gln Ala Val Phe Gln Glu Gly Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Val Pro Phe

130 135 140

Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Gly Pro Gln Leu Leu Lys Leu

145 150 155 160

Gln Ala Trp Gln Ser Val Tyr Gln Ser Val Ser Arg Phe Ile Glu Asp

165 170 175

Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly

180 185 190

Asn Pro Phe Thr Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu

195 200 205

Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Glu Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val

210 215 220

Asn Gly Met Val Lys Leu Phe Thr Asp Leu Gly Gly Glu Ile Glu Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Asn Ala Asp Val Val Asn Thr Tyr Lys Lys Leu Leu Gly Thr Ile Pro

275 280 285

Val Gly Gln Lys Arg Ala Ala Arg Leu Glu Arg Lys Ser Met Ser Asn

290 295 300

Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn Gln Pro His Ser Gln Leu

305 310 315 320

Ala His His Thr Ile Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp

325 330 335

Glu Ile Phe Thr Gly Ser Ala Leu Ala Asp Asp Phe Ser Leu Tyr Leu
340 345 350
His Ser Pro Cys Val Thr Asp Pro Ser Leu Ala Pro Pro Pro Cys Ala
355 360 365
Ser Phe Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Asn Ala Pro Leu
370 375 380
Asp Trp Ala Gln Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Asp Tyr
385 390 395 400
Leu Glu Glu Arg Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr Gln
405 410 415
Arg Ile Phe Thr Arg Gln Thr Ser Arg His Ala Trp Ile Ala Ile Leu
420 425 430
Gly Ser Leu Phe Ile Glu Pro Pro Ser Leu Thr Gln Gly Leu Phe Ala
435 440 445
Ala Asn Ala Thr Arg His Ser Asn Leu Tyr Leu Val Ala Ala Gly Thr
450 455 460
His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Val Gly Leu Ala Glu Ser Thr
465 470 475 480
Ala Ser Leu Met Ile Glu Asp Leu Gln
485

（２）配列Ｎｏ．100の情報：

(i)配列の特徴

（A）長さ：30bp

（B）タイプ：核酸

（C）鎖：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖

(ii)分子タイプ：ＤＮＡ（ゲノミック）

(xi)配列：配列Ｎｏ．100：

ATAAAGACAT TGTTTTTAGA TCTGTTGTAA 30

【図１】

Figure 1

【図２－１】

```
                                                                    60
                                                                Bgl II
                                                                AGATCTAAAGGCACAGCGTCTCATGCTTCGCACAATGTAAAACTGCTTCAGAACCTGGCG
                                                                    Hpa I
                                                                AGAGCTATCCGCGCGGTCTACGGTTAACTGATACTAAAAGACAATTCAGCGGGTAACCTT   120
                                                                                                    Nru I
                                                                GCAATGGTGAGTGGCAGTAAAGCGGGCGTTTCGCCTCATCGCGAAATAGAGGTAATGAGA   180
                                                                   MetValSerGlySerLysAlaGlyValSerProHisArgGluIleGluValMetArg
CAATCCATTGACGATCACCTGGCTGGCCTGTTACCTGAAACCGACAGCCAGGATATCGTC   240
GlnSerIleAspAspHisLeuAlaGlyLeuLeuProGluThrAspSerGlnAspIleVal
                                                                                Bam HI
AGCCTTGCGATGCGTGAAGGCGTCATGGCACCCGGTAAACGGATCCGTCCGCTGCTGATG   300
SerLeuAlaMetArgGluGlyValMetAlaProGlyLysArgIleArgProLeuLeuMet
CTGCTGGCCGCCGCCGACCTCCGCTACCAGGGCAGTATGCCTACGCTGCTCGATCTCGCC   360
LeuLeuAlaAlaArgAspLeuArgTyrGlnGlySerMetProThrLeuLeuAspLeuAla
TGCGCCGTTGAACTGACCCATACCGCGTCGCTGATGCTCGACGACATGCCCTGCATGGAC   420
CysAlaValGluLeuThrHisThrAlaSerLeuMetLeuAspAspMetProCysMetAsp
```

FIGURE 2-1

【図２－２】

```
ACCGCCGAGCTGCCGCCGCGGTCAGCCCACTACCCACAAAAAATTTGGTGAGAGCGTGGCG   480
AsnAlaGluLeuArgArgGlyGlnProThrThrHisLysLysPheGlyGluSerValAla

ATCCTTGCCTCCGTTGGGCTGCTCTCTAAAGCCTTTGGTCTGATCGCCGCCACCGGCGAT   540
IleLeuAlaSerValGlyLeuLeuSerLysAlaPheGlyLeuIleAlaAlaThrGlyAsp

CTGCCGGGGGAGAGGCGTGCCCAGCGGTCAACGAGCTCTCTACCGCCGTGGGGCTGCAG   600
LeuProGlyGluArgArgAlaGlnAlaValAsnGluLeuSerThrAlaValGlyLeuGln

GGCCTGGTACTGGGGCAGTTTCGCGATCTTAACGATGCCGCCCTCGACCGTACCCCTGAC   660
GlyLeuValLeuGlyGlnPheArgAspLeuAsnAspAlaAlaLeuAspArgThrProAsp

GCTATCCTCAGCACCAACCTCAAGACCGGCATTCTGTTCAGCGCGATGCTGCAGATC   720
AlaIleLeuSerThrAsnHisLeuLysThrGlyIleLeuPheSerAlaMetLeuGlnIle

GTCGCCATTGCTTCCGCCTCGTCGCCGAGCACGCGAGACGCTGCACGCCTTCGCCCTC   780
ValAlaIleAlaSerAlaSerProSerThrArgGluThrLeuHisAlaPheAlaLeu

GACTTCGGCCAGGCGTTTCAACTGCTGGACGATCTGCGTGACGATCACCCGGAAACCGGT   840
AspPheGlyGlnAlaPheGlnLeuLeuAspAspLeuArgAspAspHisProGluThrGly
```

FIGURE 2-2

【図２－３】

```
AAAGATCGCAATAAGGACGCGGGAAAATCGACGCTGGTCAACCGGCTGGGCGCAGACGCG   900
LysAspArgAsnLysAspAlaGlyLysSerThrLeuValAsnArgLeuGlyAlaAspAla

GCCCGGCAAAAGCTGCGCCAGCATATTGATCCGCCGACAAACACCTCACTTTTGCCTGT   960
AlaArgGlnLysLeuArgGluHisIleAspSerAlaAspLysHisLeuThrPheAlaCys
                                    Bal I
CCGCAGGGCGGCGCCATCCGACAGTTTATGCATCTGTGGTTTGGCCATCACCTTGCCGAC  1020
ProGlnGlyGlyAlaIleArgGlnPheMetHisLeuTrpPheGlyHisHisLeuAlaAsp

TGGTCACCGGTCATGAAAATCGCCTGATACCGCCCTTTTGGGTTCAAGCAGTACATAACG  1080
TrpSerProValMetLysIleAla

ATGGAACCACATTACAGGAGTAGTGATGAATGAAGGACGAGCGCCTTGTTCAGCGTAAGA  1140
        Eco RV
ACGATCATCTGGATATC
```

FIGURE 2-3

```
AAAGATCGCAATAAGGACGCGGGAAAATCGACGCTGGTCAACCGGCTGGGCGCAGACGCG   900
LysAspArgAsnLysAspAlaGlyLysSerThrLeuValAsnArgLeuGlyAlaAspAla

GCCCGGCAAAAGCTGCGCGAGCATATTGATTCCGCCGACAAACACCTCACTTTTGCCTGT   960
AlaArgGlnLysLeuArgGluHisIleAspSerAlaAspLysHisLeuThrPheAlaCys

                                        Bal I
CCGCAGGGCGGCGCCATCCGACAGTTTATGCATCTGTGGTTTGGCCATCACCTTGCCGAC  1020
ProGlnGlyGlyAlaIleArgGlnPheMetHisLeuTrpPheGlyHisHisLeuAlaAsp

TGGTCACCGGTCATGAAAATCGCCTGATACCGCCCTTTTGGGTTCAAGCAGTACATAACG  1080
TrpSerProValMetLysIleAla

ATGGAACCACATTACAGGAGTAGTGATGAATGAAGGACGAGCGCCTTGTTCAGCGTAAGA  1140

          Eco RV
ACGATCATCTGGATATC
```

【図3－3】

FIGURE 3-3

FIGURE 4-1

```
      Bgl II                                                Nco I
GATTGAGGATCTGCAATGAGCCAACCGCCGCTGCTTGACCACGCCACGCAGACCATGGCC    60
                MetSerGlnProProLeuLeuAspHisAlaThrGlnThrMetAla

AACGGCTCGAAAAGTTTTGCCACCGCTGCGAAGCTGTTCGACCCGGCCACCCGCCGTAGC   120
AsnGlySerLysSerPheAlaThrAlaAlaLysLeuPheAspProAlaThrArgArgSer

GTGCTGATGCTCTACACCTGGTGCCGCCACTGCGATGACGTCATTGACGACCAGACCCAC   180
ValLeuMetLeuTyrThrTrpCysArgHisCysAspAspValIleAspAspGlnThrHis

GGCTTCGCCAGCGAGGCCGCGGCGGAGGAGGAGGCCACCCAGCGCCTGGCCCGGCTGCGC   240
GlyPheAlaSerGluAlaAlaAlaGluGluGluAlaThrGlnArgLeuAlaArgLeuArg

                                        Bam HI
ACGCTGACCCTGGCGGCGTTTGAAGGGGCCGAGATGCAGGATCCGGCCTTCGCTGCCTTT   300
ThrLeuThrLeuAlaAlaPheGluGlyAlaGluMetGlnAspProAlaPheAlaAlaPhe

CAGGAGGTGGCGCTGACCCACGGTATTACGCCCCGCATGGCGCTCGATCACCTCGACGGC   360
GlnGluValAlaLeuThrHisGlyIleThrProArgMetAlaLeuAspHisLeuAspGly

TTTGCGATGGACGTGGCTCAGACCCGGTATGTCACCTTTGAGGATACGCTGCGCTACTGC   420
PheAlaMetAspValAlaGlnThrArgTyrValThrPheGluAspThrLeuArgTyrCys
```

【図4－1】

```
Bgl II
AGATCTAAAGGCACAGCGTCTCATGCTTCGCACAATGTAAAACTGCTTCAGAACCTGGCG    60

                Hpa I
AGAGCTATCCGCGCGGTCTACGGTTAACTGATACTAAAAGACAATTCAGCGGGTAACCTT   120

                                Nco I       Nru I
GCAATGGTGAGTGGCAGTAAAGCGGGCGTCATGGCCGAATTCGAAATAGAGGTAATGAGA   180
                                MetAlaGluPheGluIleGluValMetArg

CAATCCATTGACGATCACCTGGCTGGCCTGTTACCTGAAACCGACAGCCAGGATATCGTC   240
GlnSerIleAspAspHisLeuAlaGlyLeuLeuProGluThrAspSerGlnAspIleVal

                                        Bam HI
AGCCTTGCGATGCGTGAAGGCGTCATGGCACCCGGTAAACGGATCCGTCCGCTGCTGATG   300
SerLeuAlaMetArgGluGlyValMetAlaProGlyLysArgIleArgProLeuLeuMet

CTGCTGGCCGCCCGCGACCTCCGCTACCAGGGCAGTATGCCTACGCTGCTCGATCTCGCC   360
LeuLeuAlaAlaArgAspLeuArgTyrGlnGlySerMetProThrLeuLeuAspLeuAla

TGCGCCGTTGAACTGACCCATACCGCGTCGCTGATGCTCGACGACATGCCCTGCATGGAC   420
CysAlaValGluLeuThrHisThrAlaSerLeuMetLeuAspAspMetProCysMetAsp
```

【図3－1】

FIGURE 3-1

```
ACCGCCGAGCTGCGCCGCGGTCAGCCCACTACCCACAAAAAATTTGGTGAGAGCGTGGCG   480
AsnAlaGluLeuArgArgGlyGlnProThrThrHisLysLysPheGlyGluSerValAla

ATCCTTGCCTCCGTTGGGCTGCTCTCTAAAGCCTTTGGTCTGATCGCCGCCACCGGCGAT   540
IleLeuAlaSerValGlyLeuLeuSerLysAlaPheGlyLeuIleAlaAlaThrGlyAsp

CTGCCGGGGGGAGAGGCGTGCCCAGGCGGTCAACGAGCTCTCTACCGCCGTGGGGCTGCAG   600
LeuProGlyGluArgArgAlaGlnAlaValAsnGluLeuSerThrAlaValGlyLeuGln

GGCCTGGTACTGGGGCAGTTTCGCGATCTTAACGATGCCGCCCTCGACCGTACCCCTGAC   660
GlyLeuValLeuGlyGlnPheArgAspLeuAsnAspAlaAlaLeuAspArgThrProAsp

GCTATCCTCAGCACCAACCACCTCAAGACCGGCATTCTGTTCAGCGCGATGCTGCAGATC   720
AlaIleLeuSerThrAsnHisLeuLysThrGlyIleLeuPheSerAlaMetLeuGlnIle

GTCGCCATTGCTTCCGCCTCGTCGCCGAGCACGCGAGAGACGCTGCACGCCTTCGCCCTC   780
ValAlaIleAlaSerAlaSerSerProSerThrArgGluThrLeuHisAlaPheAlaLeu

GACTTCGGCCAGGCGTTTCAACTGCTGGACGATCTGCGTGACGATCACCCGGAAACCGGT   840
AspPheGlyGlnAlaPheGlnLeuLeuAspAspLeuArgAspAspHisProGluThrGly
```

【図3－2】

FIGURE 3-2

【図５】

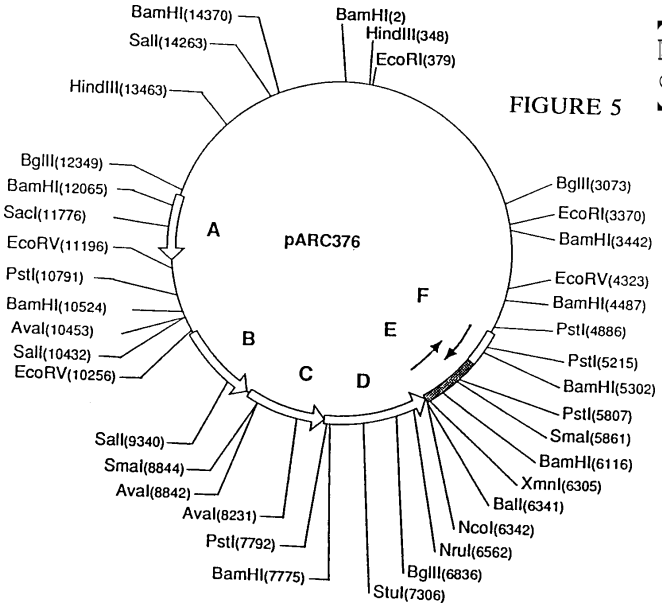


FIGURE 5

【図６】

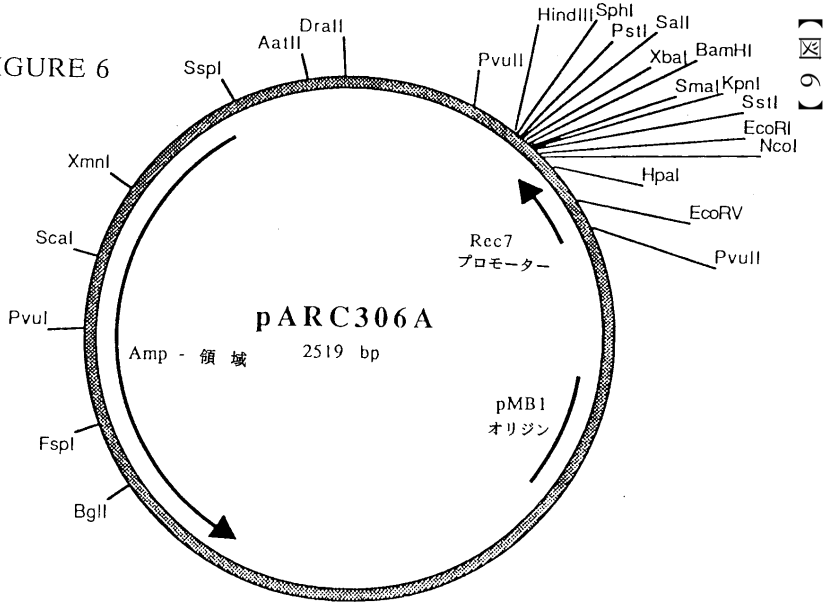


FIGURE 6

【図４－２】

```
TATCACGTGGCGGGCGTGGTGGGTCTGATGATGGCCAGGGTGATGGGCGTGCGGGATGAG   480
TyrHisValAlaGlyValValGlyLeuMetMetAlaArgValMetGlyValArgAspGlu

                                                    Sma I
CGGGTGCTGGATCGCGCCTGCGATCTGGGGCTGGCCTTCCAGCTGACGAATATGGCCCGG   540
ArgValLeuAspArgAlaCysAspLeuGlyLeuAlaPheGlnLeuThrAsnMetAlaArg

                                                    Pst I
GATATTATTGACGATGCGGCTATTGACCGCTGCTATCTGCCCGCCGAGTGGCTGCAGGAT   600
AspIleIleAspAspAlaAlaIleAspArgCysTyrLeuProAlaGluTrpLeuGlnAsp

GCCGGGCTGGCCCCGGAGAACTATGCCGCGCGGGAGAATCGCCCCGCGCTGGCGCGGTGG   660
AlaGlyLeuAlaProGluAsnTyrAlaAlaArgGluAsnArgProAlaLeuAlaArgTrp

CGGAGGCTTATTGATGCCGCAGAGCCGTACTACATCTCCTCCCAGGCCGGGCTACACGAT   720
ArgArgLeuIleAspAlaAlaGluProTyrTyrIleSerSerGlnAlaGlyLeuHisAsp

CTGCGGCGGCGCTCCGCGTGGGCGATCGCCACCGCCCGCAGCGTCTACCGGGAGATCGGT   780
LeuArgArgArgSerAlaTrpAlaIleAlaThrAlaArgSerValTyrArgGluIleGly

ATTAAGGTAAAAGCGGCGGGAGGCAGCGCCTGGGATCGCCGCCAGCACACCAGCAAAGGT   840
IleLysValLysAlaAlaGlyGlySerAlaTrpAspArgArgGlnHisThrSerLysGly
```

FIGURE 4-2

【図４－３】

```
GAAAAAATTGCCATGCTGATGGCGGCACCGGGGCAGGTTATTCGGGCGAAGACGACGAGG   900
GluLysIleAlaMetLeuMetAlaAlaProGlyGlnValIleArgAlaLysThrThrArg

GTGACGCCGCGTCCGGCCGGTCTTTGGCAGCGTCCCGTTTAGGCGGGCGGCCATGACGTT   960
ValThrProArgProAlaGlyLeuTrpGlnArgProVal

CACGCAGGATCGCCTGTAGGTCGGCAGGCTTGCGGGCGTAAATAAAACCGAAGGAGACGC  1020

AGCCCTCCCGGCCGCGCACCGCGTGGTGCAGGCGGTGGGCGACGTAGAGCCGCTTCAGGT  1080

                Bam HI
AGCCCCGGCGCGGGATCCAGTGGAAGGGCCAGCGCTGATGCACCAGACCGTCGTGCACCA  1140

                                                    Pst I
GGAAGTAGAGCAGGCCATAGACCGTCATGCCGCAGCCAATCCACTGCAGGGGCCAAAC    1200
```

FIGURE 4-3

【図７】

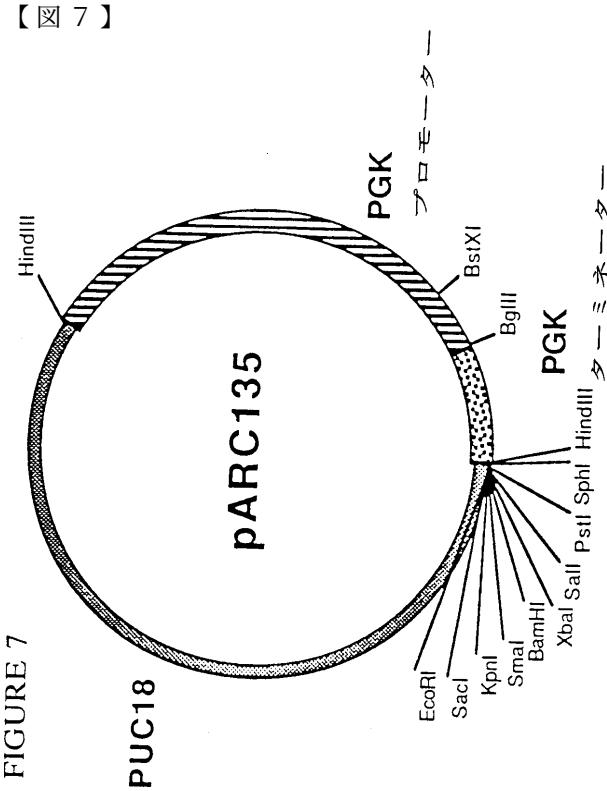


FIGURE 7

【図８】

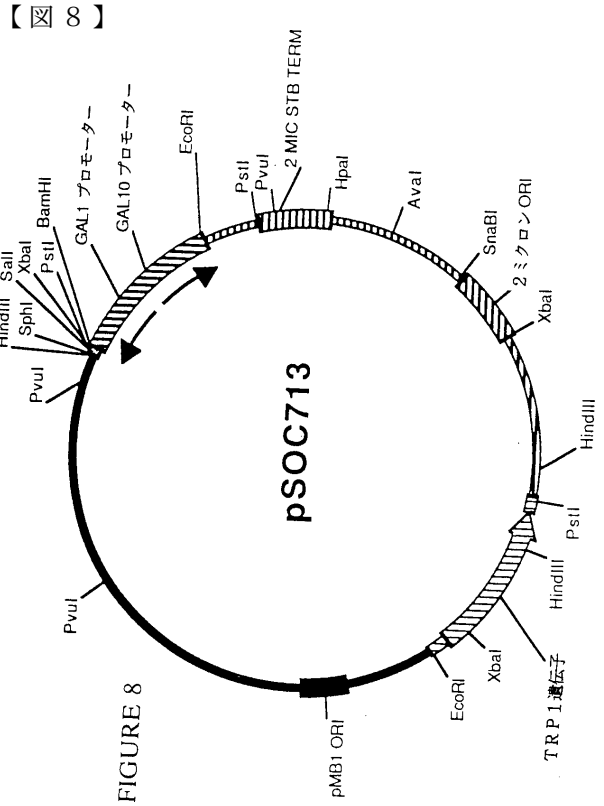


FIGURE 8

【図９】

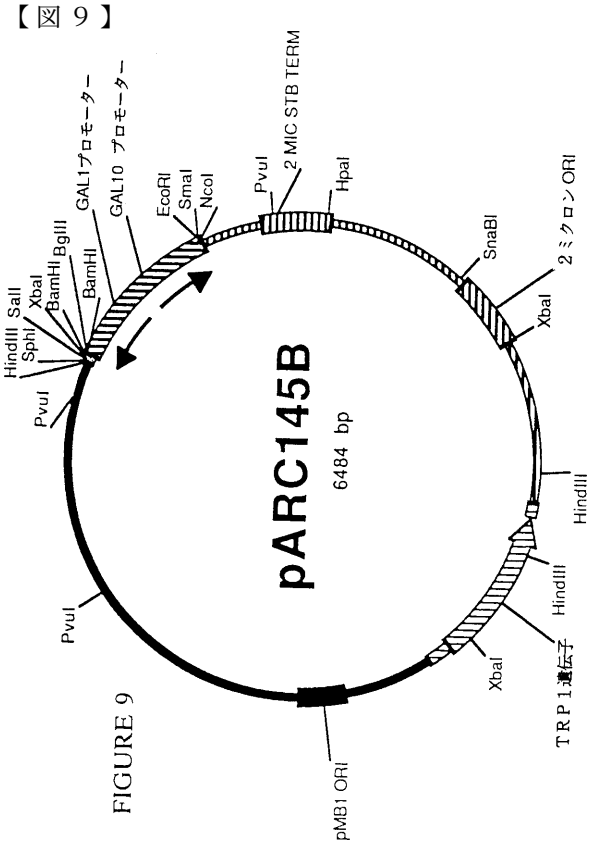


FIGURE 9

【図１０】

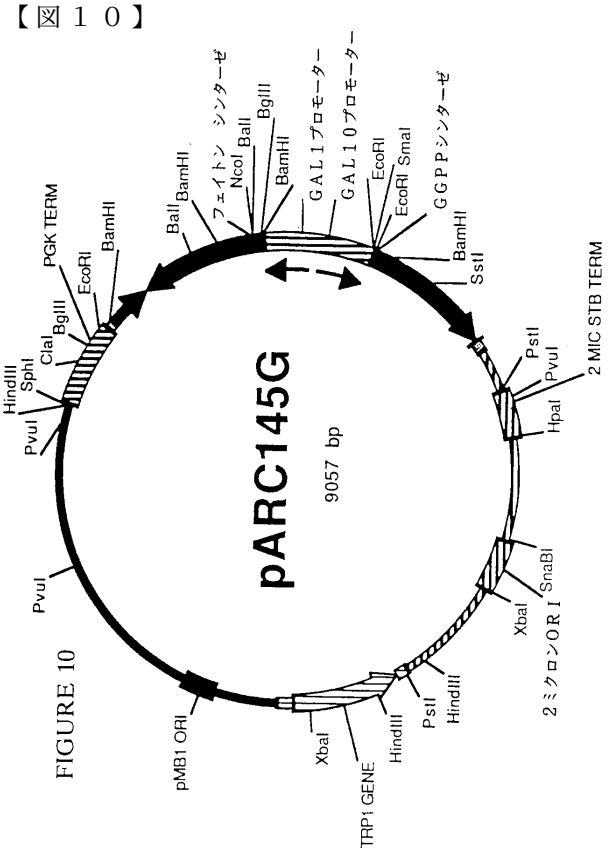


FIGURE 10

FIGURE 11-3

```
ACCTATAAAAAGCTGCTCGGCACCATACCGGTGGGGCAGAAGCGGGCGGCACGGCTGGAG      900
ThrTyrLysLysLeuLeuGlyThrIleProValGlyGlnLysArgAlaAlaArgLeuGlu

CGCAAGAGCATGAGCAACTCGCTGTTTGTGCTCTACTTCGGCCTGAACCAGCCTCATTCC      960
ArgLysSerMetSerAsnSerLeuPheValLeuTyrPheGlyLeuAsnGlnProHisSer

                                                    Bgl II
CAGCTGGCGCACCATACCATCTGTTTTGGTCCCCGCTACCGGGAGCTGATCGACGAGATC     1020
GlnLeuAlaHisHisThrIleCysPheGlyProArgTyrArgGluLeuIleAspGluIle

TTTACCGGCAGCGCGCTGGCGGATGACTTCTCGCTCTACCTGCACTCGCCCTGCGTGACC     1080
PheThrGlySerAlaLeuAlaAspAspPheSerLeuTyrLeuHisSerProCysValThr

GATCCCTCGCTCGCGCCTCCCCCGTGCGCCAGCTTCTACGTGCTGGCCCCGGTGCCGCAT     1140
AspProSerLeuAlaProProProCysAlaSerPheTyrValLeuAlaProValProHis

CTTGGCAACGCGCCGCTGGACTGGGCGCAGGAGGGGCCGAAGCTGCGCGACCGCATCTTT     1200
LeuGlyAsnAlaProLeuAspTrpAlaGlnGluGlyProLysLeuArgAspArgIlePhe

GACTACCTTGAAGAGCGCTATATGCCCGGCCTGCGTAGCCAGCTGGTGACCCAGCGGATC     1260
AspTyrLeuGluGluArgTyrMetProGlyLeuArgSerGlnLeuValThrGlnArgIle

TTTACCCGGCAGACTTCACGACACGCTTGGATCGCGATCTTGGGATCGCTTTTCATCGAG     1320
PheThrArgGlnThrSerArgHisAlaTrpIleAlaIleLeuGlySerLeuPheIleGlu

CCGCCTTCGTTGACCCAAGGCTTGTTCGCCGCAAACGCGACACGACATTCAAACCTCTAC     1380
ProProSerLeuThrGlnGlyLeuPheAlaAlaAsnAlaThrArgHisSerAsnLeuTyr

CTGGTGGCCGCAGGTACTCACCCTGGCGCGGGCATTCCTGGCGTAGTGGGCCTCGCCGAA     1440
LeuValAlaAlaGlyThrHisProGlyAlaGlyIleProGlyValValGlyLeuAlaGlu

AGCACCGCCAGCCTGATGATTGAGGATCTGCAATGAGCCAACCGCCGCTGCTTGACCACG     1500
SerThrAlaSerLeuMetIleGluAspLeuGln

         Nco I Bal I
CCACGCAGACCATGGCCA
```

【図11-3】

FIGURE 11-4

FIGURE 11-1

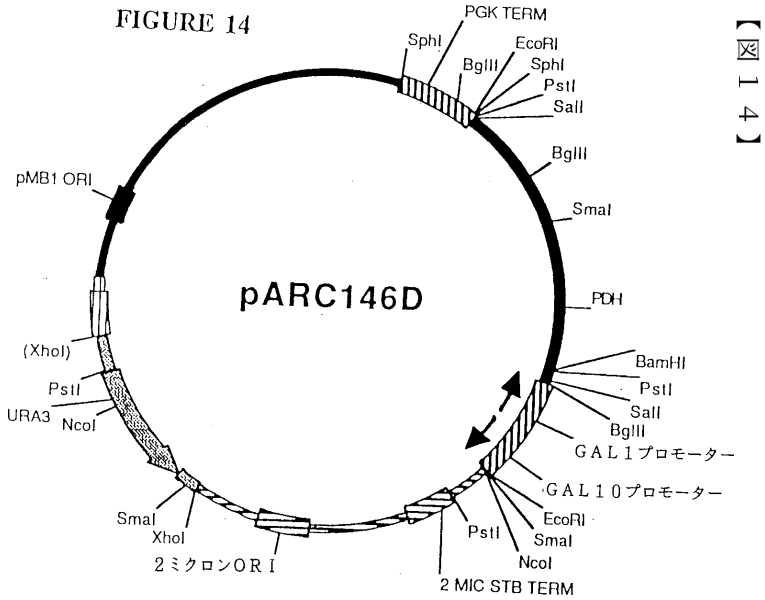
```
  Nco I
TAAACCATGGAAAAAACCGTTGTGATTGGCGCAGGCTTTGGTGGCCTGGCGCTGGCGATT       60
    MetLysLysThrValValIleGlyAlaGlyPheGlyGlyLeuAlaLeuAlaIle

   Pst I          Bam HI
CGCCTGCAGGCGGCAGGGATCCCAACCGTACTGCTGGAGCAGCGGGACAAGCCCGGCGGT      120
ArgLeuGlnAlaAlaGlyIleProThrValLeuLeuGluGlnArgAspLysProGlyGly

CGGGCCTACGTCTGGCATGACCAGGGCTTTACCTTTGACGCCGGGCCGACGGTGATCACC      180
ArgAlaTyrValTrpHisAspGlnGlyPheThrPheAspAlaGlyProThrValIleThr

GATCCTACCGCGCTTGAGGCGCTGTTCACCCTGGCCGGCAGGCGCATGGAGGATTACGTC      240
AspProThrAlaLeuGluAlaLeuPheThrLeuAlaGlyArgArgMetGluAspTyrVal

AGGCTGCTGCCGGTAAAACCCTTCTACCGACTCTGCTGGGAGTCCGGGAAGACCCTCGAC      300
ArgLeuLeuProValLysProPheTyrArgLeuCysTrpGluSerGlyLysThrLeuAsp

TATGCTAACGACAGCTTCGAGCTTGAGGCGCAGATTACCCAGTTCAACCCCCGCGACGTC      360
TyrAlaAsnAspSerPheGluLeuGluAlaGlnIleThrGlnPheAsnProArgAspVal

GAGGGCTACCGGCGCTTTCTGGCTTACTCCCAGGCGGTATTCCAGGAGGGATATTTGCGC      420
GluGlyTyrArgArgPheLeuAlaTyrSerGlnAlaValPheGlnGluGlyTyrLeuArg

                Nru I
CTCGGCAGCGTGCCGTTCCTCTCTTTTCGCGACATGCTGCGCGCCGGGCCGCAGCTGCTT      480
LeuGlySerValProPheLeuSerPheArgAspMetLeuArgAlaGlyProGlnLeuLeu

AAGCTCCAGGCGTGGCAGAGCGTCTACCAGTCGGTTTCGCGCTTTATTGAGGATGAGCAT      540
LysLeuGlnAlaTrpGlnSerValTyrGlnSerValSerArgPheIleGluAspGluHis

CTGCGGCAGGCCTTCTCGTTCCACTCCCTGCTGGTAGGCGGCAACCCCTTCACCACCTCG      600
LeuArgGlnAlaPheSerPheHisSerLeuLeuValGlyGlyAsnProPheThrThrSer

TCCATCTACACCCTGATCCACGCCCTTGAGCGGGAGTGGGGGGTCTGGTTCCCTGAGGGC      660
SerIleTyrThrLeuIleHisAlaLeuGluArgGluTrpGlyValTrpPheProGluGly

GGCACCGGGGCGCTGGTGAACGGCATGGTGAAGCTGTTTACCGATCTGGGCGGGGAGATC      720
GlyThrGlyAlaLeuValAsnGlyMetValLysLeuPheThrAspLeuGlyGlyGluIle

        Sma I
GAACTCAACGCCCGGGTCGAAGAGCTGGTGGTGGCCGATAACCGCGTAAGCCAGGTCCGG      780
GluLeuAsnAlaArgValGluGluLeuValValAlaAspAsnArgValSerGlnValArg

CTCGCGGATGGTCGGATCTTTGACACCGACGCCGTAGCCTCGAACGCTGACGTGGTGAAC      840
LeuAlaAspGlyArgIlePheAspThrAspAlaValAlaSerAsnAlaAspValValAsn
```

【図11-1】

FIGURE 11-2

【図11-2】

FIGURE 14



【図14】

GAGG

Sal I

TCGACGATGGAAAAAACCGTTGTGATTGGCGCAGGCTTTGGTGGCCTGGCGCTGGCGATT 64

MetGluLysThrValValIleGlyAlaGlyPheGlyGlyLeuAlaLeuAlaIle

Pst I Bam HI

CGCCTGCAGGCGGCAGGGATCCCAACCGTACTGCTGGAGCAGCGGGACAAGCCCGGCGGT 124

ArgLeuGlnAlaAlaGlyIleProThrValLeuLeuGluGlnArgAspLysProGlyGly

CGGGCCTACGTCTGGCATGACCAGGGCTTTACCTTTGACGCCGGGCCGACGGTGATCACC 184

ArgAlaTyrValTrpHisAspGlnGlyPheThrPheAspAlaGlyProThrValIleThr

GATCCTACCGCGCTTGAGGCGCTGTTCACCCTGGCCGGCAGGCGCATGGAGGATTACGTC 244

AspProThrAlaLeuGluAlaLeuPheThrLeuAlaGlyArgArgMetGluAspTyrVal

AGGCTGCTGCCGGTAAAACCCTTCTACCGACTCTGCTGGGAGTCCGGGAAGACCCTCGAC 304

ArgLeuLeuProValLysProPheTyrArgLeuCysTrpGluSerGlyLysThrLeuAsp

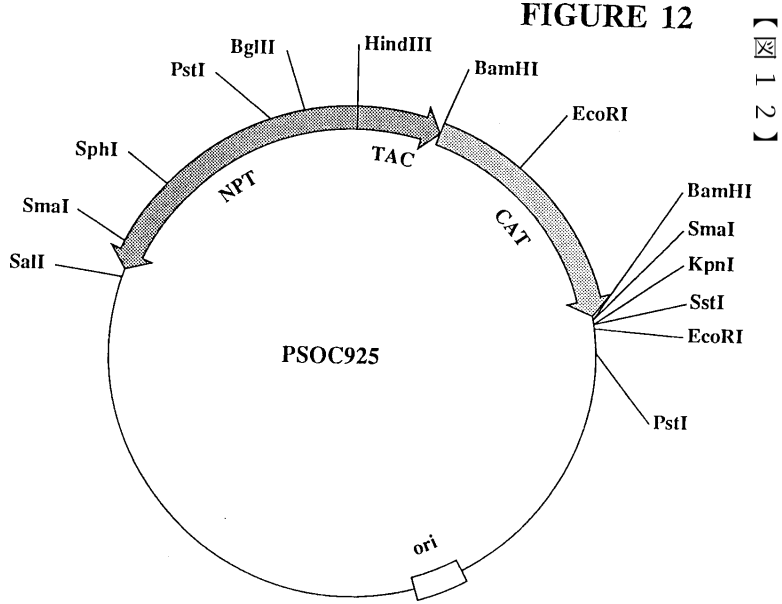
TATGCTAACGACAGCTTCGAGCTTGAGGCGCAGATTACCCAGTTCAACCCCCGCGACGTC 364

TyrAlaAsnAspSerPheGluLeuGluAlaGlnIleThrGlnPheAsnProArgAspVal

【図15－1】

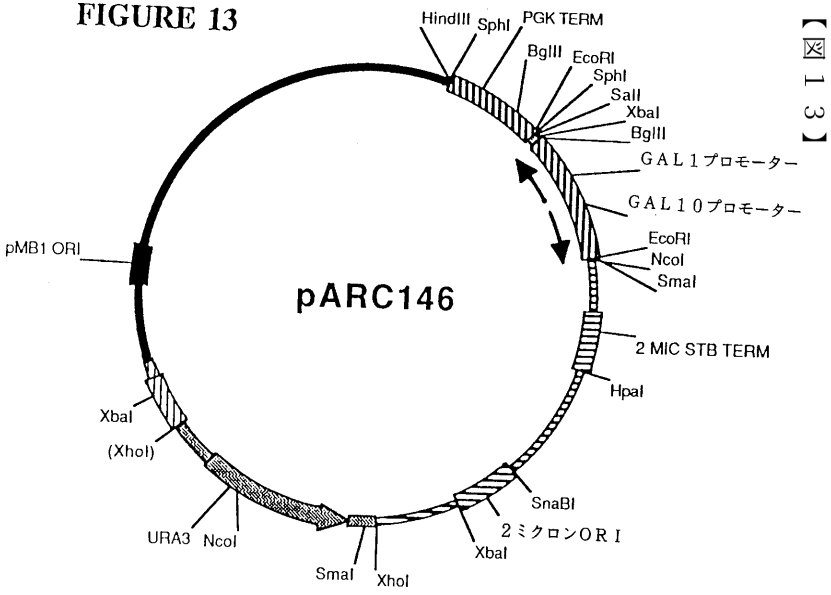
FIGURE 15-1

FIGURE 12



【図12】

FIGURE 13



【図13】

【図15－4】

```
CTTGGCAACGCGCCGCTGGACTGGGCGCAGGAGGGGCCGAAGCTGCGCGACCGCATCTTT  1204
LeuGlyAsnAlaProLeuAspTrpAlaGlnGluGlyProLysLeuArgAspArgIlePhe

GACTACCTTGAAGAGCGCTATATGCCCGGCCTGCGTAGCCAGCTGGTGACCCAGCGGATC  1264
AspTyrLeuGluGluArgTyrMetProGlyLeuArgSerGlnLeuValThrGlnArgIle

TTTACCCGGCAGACTTCACGACACGCTTGGATCGCGATCTTGGGATCGCTTTTCATCGAG  1324
PheThrArgGlnThrSerArgHisAlaTrpIleAlaIleLeuGlySerLeuPheIleGlu

CCGCCTTCGTTGACCCAAGGCTTGTTCGCCGCAAACGCGACACGACATTCAAACCTCTAC  1384
ProProSerLeuThrGlnGlyLeuPheAlaAlaAsnAlaThrArgHisSerAsnLeuTyr

CTGGTGGCCGCAGGTACTCACCCTGGCGCGGGCATTCCTGGCGTAGTGGGCCTCGCCGAA  1444
LeuValAlaAlaGlyThrHisProGlyAlaGlyIleProGlyValValGlyLeuAlaGlu

AGCACCGCCAGCCTGATGATTGAGGATCTGCAATGAGCCAACCGCCGCTGCTTGACCACG  1504
SerThrAlaSerLeuMetIleGluAspLeuGln

    Sal I
CCACGTCGACCATGGCCA
```

FIGURE 15-4

【図15－2】

```
GAGGGCTACCGGCGCTTTCTGGCTTACTCCCAGGCGGTATTCCAGGAGGGATATTTGCGC  424
GluGlyTyrArgArgPheLeuAlaTyrSerGlnAlaValPheGlnGluGlyTyrLeuArg

                    Nru I
CTCGGCAGCGTGCCGTTCCTCTCTTTTCGCGACATGCTGCGCGCCGGGCCGCAGCTGCTT  484
LeuGlySerValProPheLeuSerPheArgAspMetLeuArgAlaGlyProGlnLeuLeu

AAGCTCCAGGCGTGGCAGAGCGTCTACCAGTCGGTTTCGCGCTTTATTGAGGATGAGCAT  544
LysLeuGlnAlaTrpGlnSerValTyrGlnSerValSerArgPheIleGluAspGluHis

CTGCGGCAGGCCTTCTCGTTCCACTCCCTGCTGGTAGGCGGCAACCCCTTCACCACCTCG  604
LeuArgGlnAlaPheSerPheHisSerLeuLeuValGlyGlyAsnProPheThrThrSer

TCCATCTACACCCTGATCCACGCCCTTGAGCGGGAGTGGGGGGTCTGGTTCCCTGAGGGC  664
SerIleTyrThrLeuIleHisAlaLeuGluArgGluTrpGlyValTrpPheProGluGly

GGCACCGGGGCGCTGGTGAACGGCATGGTGAAGCTGTTTACCGATCTGGGCGGGGAGATC  724
GlyThrGlyAlaLeuValAsnGlyMetValLysLeuPheThrAspLeuGlyGlyGluIle

          Sma I
GAACTCAACGCCCGGGTCGAAGAGCTGGTGGTGGCCGATAACCGCGTAAGCCAGGTCCGG  784
GluLeuAsnAlaArgValGluGluLeuValValAlaAspAsnArgValSerGlnValArg
```

FIGURE 15-2

【図16】

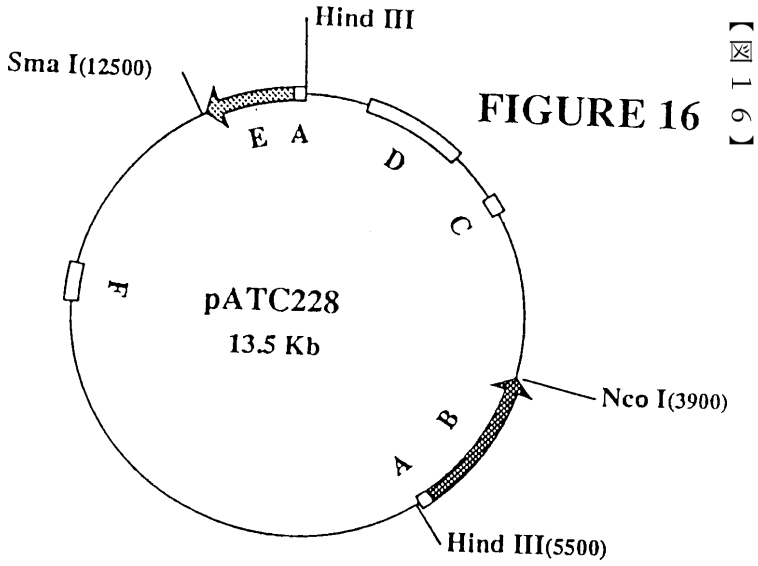


FIGURE 16

【図15－3】

```
CTCGCGGATGGTCGGATCTTTGACACCGACGCCGTAGCCTCGAACGCTGACGTGGTGAAC  844
LeuAlaAspGlyArgIlePheAspThrAspAlaValAlaSerAsnAlaAspValValAsn

ACCTATAAAAAGCTGCTCGGCACCATACCGGTGGGGCAGAAGCGGGCGGCACGGCTGGAG  904
ThrTyrLysLysLeuLeuGlyThrIleProValGlyGlnLysArgAlaAlaArgLeuGlu

CGCAAGAGCATGAGCAACTCGCTGTTTGTGCTCTACTTCGGCCTGAACCAGCCTCATTCC  964
ArgLysSerMetSerAsnSerLeuPheValLeuTyrPheGlyLeuAsnGlnProHisSer

                                                    Bgl II
CAGCTGGCGCACCATACCATCTGTTTTGGTCCCCGCTACCGGGAGCTGATCGACGAGATC 1024
GlnLeuAlaHisHisThrIleCysPheGlyProArgTyrArgGluLeuIleAspGluIle

TTTACCGGCAGCGCGCTGGCGGATGACTTCTCGCTCTACCTGCACTCGCCCTGCGTGACC 1084
PheThrArgGlnThrSerArgHisAlaTrpIleAlaIleLeuGlySerLeuPheIleGlu

GATCCCTCGCTCGCGCCTCCCCCGTGCGCCAGCTTCTACGTGCTGGCCCCGGTGCCGCAT 1144
AspProSerLeuAlaProProProCysAlaSerPheTyrValLeuAlaProValProHis
```

FIGURE 15-3

【図１９－１】

```
                Sph I
AGGGAGTGAGAGCGTATCGTGAGGGATCTGATTTTAGTCGGCCGCGGCCTGGCCAACGGG   60
          GCGCGCATGCGG
                MetArgAspLeuIleLeuValGlyArgGlyLeuAlaAsnGly

CTGATCGCCTGGCGTCTGCGCCAGCGCTACCCGCAGCTTAACCTGCTGCTGATCGAGGCC  120
LeuIleAlaTrpArgLeuArgGlnArgTyrProGlnLeuAsnLeuLeuLeuIleGluAla

GGGGAGCAGCCCGGCGGGAACCATACCTGGTCATTCCATGAAGACGATCTGACTCCCGGG  180
GlyGluGlnProGlyGlyAsnHisThrTrpSerPheHisGluAspAspLeuThrProGly

CAGCACGCCTGGCTGGCCCCGCTGGTGGCCCACGCCTGGCCGGGCTATGAGGTGCAGTTT  240
GlnHisAlaTrpLeuAlaProLeuValAlaHisAlaTrpProGlyTyrGluValGlnPhe

CCCGATCTTCGCCGTCGCCTCGCGCGCGGCTACTACTCCATTACCTCAGAGCGCTTTGCC  300
ProAspLeuArgArgArgLeuAlaArgGlyTyrTyrSerIleThrSerGluArgPheAla

GAGGCCCTGCATCAGGCGCTGGGGGAGAACATCTGGCTAAACTGTTCGGTGAGCGAGGTG  360
GluAlaLeuHisGlnAlaLeuGlyGluAsnIleTrpLeuAsnCysSerValSerGluVal

TTACCCAATAGCGTGCGCCTTGCCAACGGTGAGGCGCTGCTTGCCGGAGCGGTGATTGAC  420
LeuProAsnSerValArgLeuAlaAsnGlyGluAlaLeuLeuAlaGlyAlaValIleAsp
```

FIGURE 19-1

【図１９－２】

```
GGACGCGGCGTGACCGCCAGTTCGGCGATGCAAACCGGCTATCAGCTCTTTCTTGGTCAG  480
GlyArgGlyValThrAlaSerSerAlaMetGlnThrGlyTyrGlnLeuPheLeuGlyGln

CAGTGGCGGCTGACACAGCCCCACGGCCTGACCGTACCGATCCTGATGGATGCCACGGTG  540
GlnTrpArgLeuThrGlnProHisGlyLeuThrValProIleLeuMetAspAlaThrVal

GCGCAGCAGCAGGGCTATCGCTTTGTCTACACGCTGCCGCTCTCCGCCGACACGCTGCTG  600
AlaGlnGlnGlnGlyTyrArgPheValTyrThrLeuProLeuSerAlaAspThrLeuLeu

ATCGAGGATACGCGCTACGCCAATGTCCCGCAGCGTGATGATAATGCCCTACGCCAGACG  660
IleGluAspThrArgTyrAlaAsnValProGlnArgAspAspAsnAlaLeuArgGlnThr

GTTACCGACTATGCTCACAGCAAAGGGTGGCAGCTGGCCCAGCTTGAACGCGAGGAGACC  720
ValThrAspTyrAlaHisSerLysGlyTrpGlnLeuAlaGlnLeuGluArgGluGluThr

GGCTGTCTGCCGATTACCTGGCGGGTGACATCCAGGCTCTGTGGGCCGATGCGCCGGCGT  780
GlyCysLeuProIleThrTrpArgValThrSerArgLeuCysGlyProMetArgArgArg

GCCGCGTCGGGAATGCGGGCTGGGCTATTTCACCCTACCACTGGCTATTCGCTGCCGCTG  840
AlaAlaSerGlyMetArgAlaGlyLeuPheHisProThrThrGlyTyrSerLeuProLeu
```

FIGURE 19-2

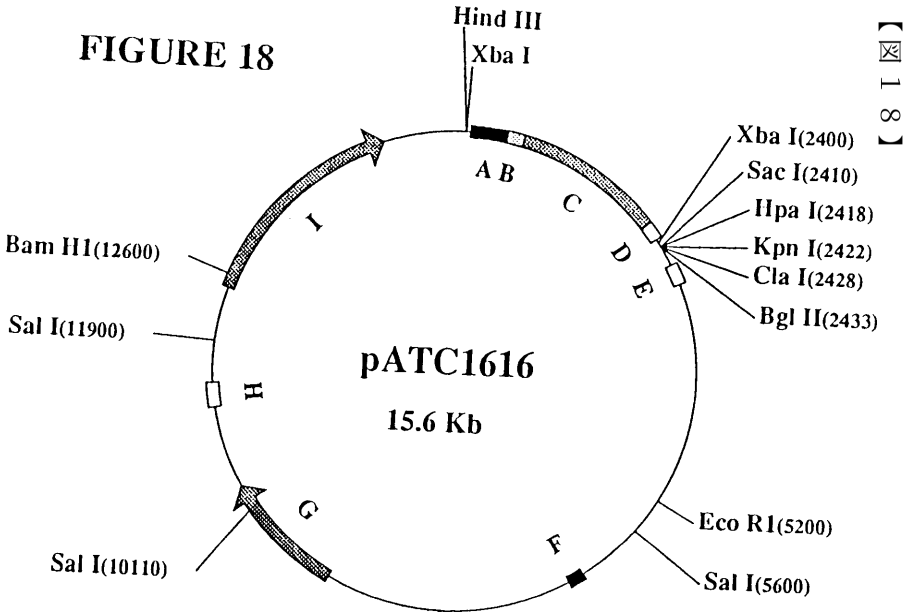
FIGURE 17

【図１７】

```
ATG GCT TCC TCA GTT CTT TCC TCT GCA GCA GTT GCC ACC CGC AGC
MET Ala Ser Ser Val Leu Ser Ser Ala Ala Val Ala Thr Arg Ser

AAT GTT GCT CAA GCT AAC ATG GTG GCG CCT TTC ACT GGC CTT AAG
Asn Val Ala Gln Ala Asn MET Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys

TCA GCT GCC TCA TTC CCT GTT TCA AGG AAG CAA AAC CTT GAC ATC
Ser Ala Ala Ser Phe Pro Val Ser Arg Lys Gln Asn Leu Asp Ile

ACT TCC ATT GCC AGC AAC GGC GGA AGA GTG CAA TGC ATG CAG
Thr Ser Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys MET Gln
```

FIGURE 18

【図１８】



TTCGGTTTTATTTACGCCCGCAAGCCTGCCGACCTACAGGCGATCCTGCGTGAACGTCAT 480

GGCCGCCCGCCTAAACGGGACGCTGCCAAAGACCGGCCGGACGCGGCGTCACCCTCGTCG 540

TCTTCGCCCGAATAACCTGCCCCGGTGCCGCCATCAGCATGGCAATTTTTTCACCTTTGC 600

TGGTGTGCTGGCGGCGATCCCAGGCGCTGCCTCCCGCCGCTTTTACCTTAATACCGATCT 660

CCCGGTAGACGCTGCGGGCGGTGGCGATCGCCCACGCGGAGCGCCGCCGCAGATCGTGTA 720

GCCCGGCCTGGGAGGAGATGTAGTACGGCTCTGCGGCATCAATAAGCCTCCGCCACCGCG 780

CCAGCGCGGGGCGATTCTCCCGCGCGGCATAGTTCTCCGGGGCCAGCCCGGCATCCTGCA 840

【図20-2】

FIGURE 20-2

Sma I

GCCACTCGGCGGGCAGATAGCAGCGGTCAATAGCCGCATCGTCAATAATATCCCGGGCCA 900

TATTCGTCAGCTGGAAGGCCAGCCCCAGATCGCAGGCGCGATCCAGC

【図20-3】

FIGURE 20-3

GCGGTGGCCCTTGCCGACGCGATTGCCGACAGCCCGCGGCTGGGCAGCGTTCCGCTCTAT 900
AlaValAlaLeuAlaAspAlaIleAlaAspSerProArgLeuGlySerValProLeuTyr

CAGCTCACCCGGCAGTTTGCCGAACGCCACTGGCGCAGGCAGGGATTCTTCCGCCTGCTG 960
GlnLeuThrArgGlnPheAlaGluArgHisTrpArgArgGlnGlyPhePheArgLeuLeu

AACCGGATGCTTTTCCTGGCCGGGCGCGAGGAGAACCGCTGGCGGGTGATGCAGCGCTTT 1020
AsnArgMetLeuPheLeuAlaGlyArgGluGluAsnArgTrpArgValMetGlnArgPhe

TATGGGCTGCCGGAGCCCACCGTAGAGCGCTTTTACGCCGGTCGGCTCTCTCTCTTTGAT 1080
TyrGlyLeuProGluProThrValGluArgPheTyrAlaGlyArgLeuSerLeuPheAsp

AAGGCCCGCATTTTGACGGGCAAGCCACCGGTTCCGCTGGCGAAGTCTGGCGGGCGGCGC 1140
LysAlaArgIleLeuThrGlyLysProProValProLeuAlaLysSerGlyGlyArgArg

Bam HI

TGAACCATTTTCCTGACAGACGAGATAAAGGATGAAAAAAACCGTTGTGATTGGCGCAGG 1200
GATCCGATG

Pst I

CTTTGGTGGCCTGGCGCTGGCGATTCGCCTGCAG

【図19-3】

FIGURE 19-3

TGAGTCGCAGGAGCGCGCACCGCTATGCTAGTAAATAGTTTAATCGTCATCTTGACCGTT 60

ATTGCGATGGAGGGCATCGCCGCGTTTACCCACCGCTACATTATGCACGGCTGGGGATGG 120

CGCTGGCATGAGCCACACCATACCCCGCGCAAGGGCGTATTTGAGCTAAACGATCTCTTT 180

GCGGTGGTGTTTGCCGGGGTGGCTATCGCGCTGATTGCCGTGGGCACGGCGGGCGTTTGG 240

CCCCTGCAGTGGATTGGCTGCGGCATGACGGTCTATGGCCTGCTCTACTTCCTGGTGCAC 300

Bam HI

GACGGTCTGGTGCATCAGCGCTGGCCCTTCCACTGGATCCCGCGCCGGGGCTACCTGAAG 360

CGGCTCTACGTCGCCCACCGCCTGCACCACGCGGTGCGCGGCCGGGAGGGCTGCGTCTCC 420

【図20-1】

FIGURE 20-1

【図21－1】

```
                                                Nco I
TGAGTCGCAGGAGCGCGCACCGCCATGGTACTAAATAGTTTAATCGTCATCTTGACCGTT   60
                                MetValLeuAsnSerLeuIleValIleLeuThrVal

ATTGCGATGGAGGGCATCGCCGCGTTTACCCACCGCTACATTATGCACGGCTGGGGATGG  120
IleAlaMetGluGlyIleAlaAlaPheThrHisArgTyrIleMetHisGlyTrpGlyTrp

CGCTGGCATGAGCCACACCATACCCCGCGCAAGGGCGTATTTGAGCTAAACGATCTCTTT  180
ArgTrpHisGluProHisHisThrProArgLysGlyValPheGluLeuAsnAspLeuPhe

GCGGTGGTGTTTGCCGGGGTGGCTATCGCGCTGATTGCCGTGGGCACGGCGGGCGTTTGG  240
AlaValValPheAlaGlyValAlaIleAlaLeuIleAlaValGlyThrAlaGlyValTrp

CCCCTGCAGTGGATTGGCTGCGGCATGACGGTCTATGGCCTGCTCTACTTCCTGGTGCAC  300
ProLeuGlnTrpIleGlyCysGlyMetThrValTyrGlyLeuLeuTyrPheLeuValHis

                                        Bam HI
GACGGTCTGGTGCATCAGCGCTGGCCCTTCCACTGGATCCCGCGCCGGGGCTACCTGAAG  360
AspGlyLeuValHisGlnArgTrpProPheHisTrpIleProArgArgGlyTyrLeuLys

CGGCTCTACGTCGCCCACCGCCTGCACCACGCGGTGCGCGGCCGGGAGGGCTGCGTCTCC  420
ArgLeuTyrValAlaHisArgLeuHisHisAlaValArgGlyArgGluGlyCysValSer
```

FIGURE 21-1

【図21－2】

```
TTCGGTTTTATTTACGCCCGCAAGCCTGCCGACCTACAGGCGATCCTGCGTGAACGTCAT  480
PheGlyPheIleTyrAlaArgLysProAlaAspLeuGlnAlaIleLeuArgGluArgHis

GGCCGCCCGCCTAAACGGGACGCTGCCAAAGACCGGCCGGACGCGGCGTCACCCTCGTCG  540
GlyArgProProLysArgAspAlaAlaLysAspArgProAspAlaAlaSerProSerSer

TCTTCGCCCGAATAACCTGCCCCGGTGCCGCCATCAGCATGGCAATTTTTTCACCTTTGC  600
SerSerProGlu

TGGTGTGCTGGCGGCGATCCCAGGCGCTGCCTCCCGCCGCTTTTACCTTAATACCGATCT  660

CCCGGTAGACGCTGCGGGCGGTGGCGATCGCCCACGCGGAGCGCCGCCGCAGATCGTGTA  720

GCCCGGCCTGGGAGGAGATGTAGTACGGCTCTGCGGCATCAATAAGCCTCCGCCACCGCG  780

CCAGCGCGGGGCGATTCTCCCGCGCGGCATAGTTCTCCGGGGCCAGCCCGGCATCCTGCA  840
```

FIGURE 21-2

【図21－3】

```
                                                Sma I
GCCACTCGGCGGGCAGATAGCAGCGGTCAATAGCCGCATCGTCAATAATATCCCGGGCCA  900

TATTCGTCAGCTGGAAGGCCAGCCCCAGATCGCAGGCGCGATCCAGC
```

FIGURE 21-3

【図22】

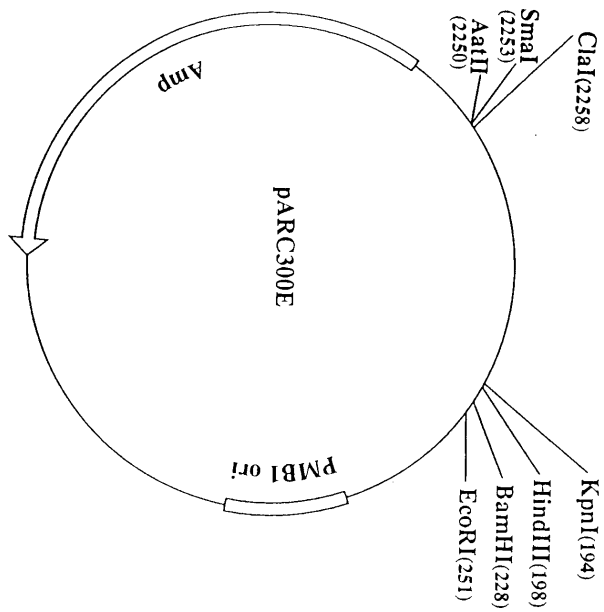
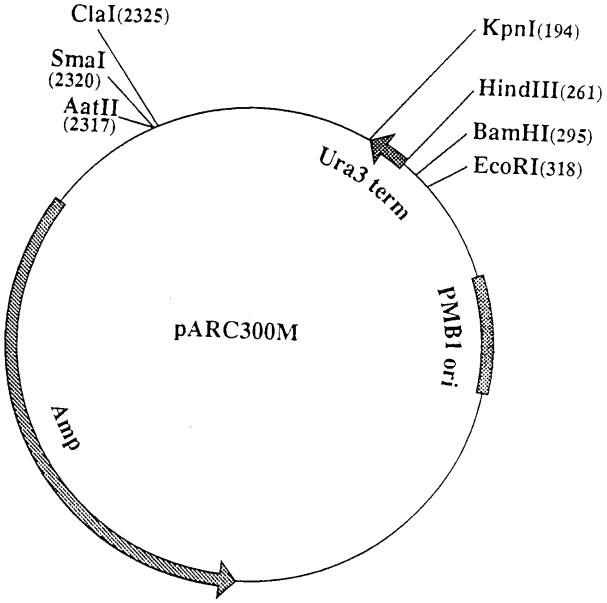


FIGURE 22

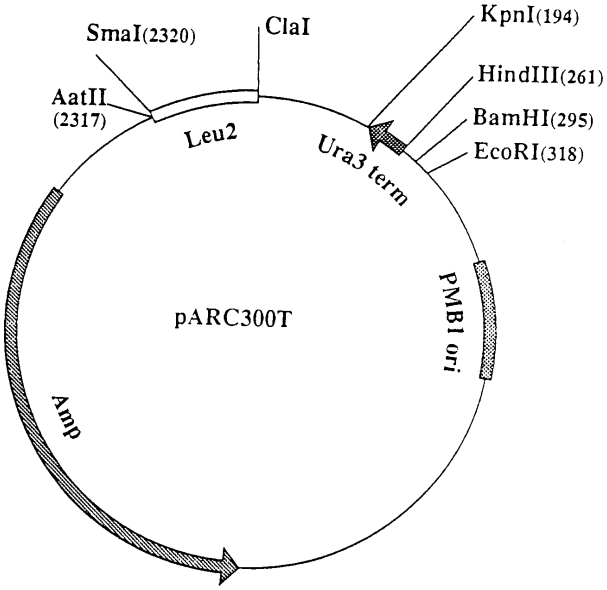
【図２３】

FIGURE 23



【図２４】

FIGURE 24



【図２５－１】

FIGURE 25-1

```
ATGAGCCATTTTGCCATTGTGGCACCGCCGCTCTACAGTCATGCGGTGGCGGTGCATGCC
METSerHisPheAlaIleValAlaProProLeuTyrSerHisAlaValAlaLeuHisAla

CTGGCGCTGCAGATGGCCCAACGCGGCCACCGGGTGACCTTTCTCACCGGCAACGTCGCC
LeuAlaLeuGluMETAlaGlnArgGlyHisArgValThrPheLeuThrGlyAsnValAla

TCGCTGGCAGAGCAGGAAACGGAGCGGTGGCGTTCTATCCACTTCCCGCCAGCGTGCAA
SerLeuAlaGluGlnGluThrGluArgValAlaPheTyrProLeuProAlaSerValGln

CAGGCCCAGCGCAACGTCCAGCAGACAGTAACGGCAACCTGCTGCGGCTGATTGCGGCC
GlnAlaGlnArgAsnValGlnGlnGlnSerAsnGlyAsnLeuLeuArgLeuIleAlaAla

ATGTCATCCCTGACCGATGTGCTCTGCGAGCAGTTGCCCCGCTATTCTACAGCGGCTGGCG
METSerSerLeuThrAspValLeuCysGlnGlnLeuProAlaIleLeuGlnArgLeuAla

GTGGACGCGCTGATTGTCGATGAGATGGAGCCCGCCGGAAGCCTGGTCGCCGAGGCGCTG
ValAspAlaLeuIleValAspGluMETGluProAlaGlySerLeuValAlaGluAlaLeu

GGACTACCATTTATCTCTATTGCCTGCGCGCTGCCCGTCAACCGCGAGCTGCCGCTGCCG
GlyLeuProPheIleSerIleAlaCysAlaLeuProValAsnArgGluLeuProLeuPro
```

【図２５－２】

```
GTGATGCCGTTTCACTACGCCGAGGATAAGAGAGCCCGTGCGCGTTTTCAGGTCAGCGAA
ValMETProPheHisTyrAlaGluAspLysArgAlaArgAlaArgPheGlnValSerGlu

CGGATCTACGATGCGCTGATGTACCCGGACGGGCAGACGATCCTGCGCCCACGCGCAGCGC
ArgIleTyrAspAlaLeuMETTyrProHisGlyGlnThrIleLeuArgHisAlaGlnArg

TTTGGTTTGCCGGAGCGCAGGCGTCTCGACGAGTGTCTCTCGCCCCCTGGCGCAGATTAGC
PheGlyLeuProGluArgArgArgLeuAspGluCysLeuSerProLeuAlaGlnIleSer

CAGTCCGTTCCGGCCCTCGACTTCCCACGCCGGGGCGCTGCCGAACTGTTTTACCTACGTG
GlnSerValProAlaLeuAspPheProArgArgAlaLeuProAsnCysPheThrTyrVal

GGAGCACTGCGCTATCAGCCCCCGCCGCAGGTAGAACGCTCGCCACGCAGCACGCCGCGG
GlyAlaLeuArgTyrGlnProProProGlnValGluArgSerProArgSerThrProArg

ATCTTTGCCTCGCTGGCACCCTCCAGGCCACCGTCTACGCCTGTTTCAGAAGATCGCC
IlePheAlaSerLeuGlyThrLeuGlnGlyHisArgLeuArgLeuPheGlnLysIleAla

CGCGCCTGTGCCAGCGTGGGCGCGGAGGTGACCATTGCCCACTGCGATGCCCTGACGCCC
ArgAlaCysAlaSerValGlyAlaGluValThrIleAlaHisCysAspGlyLeuThrPro
```

FIGURE 25-2

【図２５－３】

```
GCCCAGGCCGACTCGCTCTACTGCGGCGCGACGGAGGTGGTCAGCTTTGTCGACCAGCCG  940
AlaGlnAlaAspSerLeuTyrCysGlyAlaThrGluValValSerPheValAspGlnPro

CGCTACGTTGCCGAGGCTAATCTGGTGATCACCCACGGCGGTCTCAATACCGTACTGGAT 1000
ArgTyrValAlaGluAlaAsnLeuValIleThrHisGlyGlyLeuAsnThrValLeuAsp

GCGCTGGCTGCCGCGACGCCGGTGCTGGCGGTGCCACTCTCTTTCGACCAGCCCGCCGTG 1060
AlaLeuAlaAlaAlaThrProValLeuAlaValProLeuSerPheAspGlnProAlaVal

GCTGCCCGGCTGGTCTATAACGGGCTGGGTCGCCGGGTATCGCGCTTTGCCCAGACAGGAG 1140
AlaAlaArgLeuValTyrAsnGlyLeuGlyArgArgValSerArgPheAlaArgGlnGln

ACGCTGGCGGATGAGATTGCCCAACTGCTGGGGGATGAGACGCTGCATGAGCGTGTGGCG 1200
ThrLeuAlaAspGluIleAlaGlnLeuLeuGlyAspGluThrLeuHisGlnArgValAla

ACGGCCCAGCAGCAGCTTAACGACGCCGGGGGCACGCCCCGTTGCGGCGACCCTGATTGA 1260
ThrAlaArgGlnGlnLeuAsnAspAlaGlyGlyThrProArgCysGlyAspProAsp
```

FIGURE 25-3

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 562,674
(32)優先日 平成2年8月3日(1990.8.3)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 662,921
(32)優先日 平成3年2月28日(1991.2.28)
(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC 40754
微生物の受託番号 ATCC 40756

(74)代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74)代理人 100092886
弁理士 村上 清
(72)発明者 オーシック，ロドニー・リー
アメリカ合衆国イリノイ州６０１３７，グレン・エリン，フォレスト・ストリート １５８
(72)発明者 ブリンカウス，フリードヘルム・ルートク
アメリカ合衆国イリノイ州６０５３２，リズル，フォレスト・ヴュー・ロード ５８８５，ナンバー ６１１
(72)発明者 ムカージ，インドラニ
アメリカ合衆国イリノイ州６０２０１，エヴァンストン，セントラル・パーク・アベニュー ２３００
(72)発明者 プロフィット，ジョン・ヒューストン
アメリカ合衆国イリノイ州６０３０２，オーク・パーク，ノース・ヘイズ・アベニュー １００８
(72)発明者 ヤーガー，ジェームズ・グレゴリー
アメリカ合衆国イリノイ州６０１７４，セント・チャールズ，チェイス・サークル ２２１
(72)発明者 イェン，フェイ―チェ・ビル
アメリカ合衆国イリノイ州６０５４０，ナパーヴィル，ジェーン・アベニュー １３１１

合議体
審判長 佐伯 裕子
審判官 鈴木 恵理子
審判官 種村 慈樹

(56)参考文献 Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（Ｄｅｃ．１９９０）Ｖｏｌ．８７，ｐ．９９７５－９９７９