

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4287046号  
(P4287046)

(45) 発行日 平成21年7月1日(2009.7.1)

(24) 登録日 平成21年4月3日(2009.4.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
A O 1 H 5/00	(2006.01)	A O 1 H 5/00	A
C O 8 B 37/18	(2006.01)	C O 8 B 37/18	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	C
C 12 N 9/10	(2006.01)	C 12 N 9/10	

請求項の数 26 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2000-519587 (P2000-519587)  
 (86) (22) 出願日 平成10年11月6日 (1998.11.6)  
 (65) 公表番号 特表2001-521757 (P2001-521757A)  
 (43) 公表日 平成13年11月13日 (2001.11.13)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP1998/007115  
 (87) 國際公開番号 WO1999/024593  
 (87) 國際公開日 平成11年5月20日 (1999.5.20)  
 審査請求日 平成17年10月25日 (2005.10.25)  
 (31) 優先権主張番号 197 49 122.7  
 (32) 優先日 平成9年11月6日 (1997.11.6)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

前置審査

(73) 特許権者 500059047  
 マックス-プランク-ゲゼルシャフト ツ  
 ル フォルデルング テル ヴィッセン  
 シャフテン エー. ファウ.  
 ドイツ国 ベルリン (番地なし)  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (72) 発明者 ヘイヤー アーンド ゲー.  
 ドイツ国 ベルリン コッテシュタイク  
 10  
 (72) 発明者 ヘルウェゲ エルク ダブリュー.  
 ドイツ国 ベルリン ストックウェグ 4  
 (72) 発明者 グリッシュル ドミニク  
 ドイツ国 ベルリン ツィッタウエルスト  
 ラッセ 51

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】フルクトシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする核酸分子および長鎖イヌリンの製造方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

20よりも高い平均重合度(DP)を示すイヌリンの合成を生じるフルクトシルトランスフェラーゼ(FFT)の酵素活性を有する蛋白質をコードする核酸分子であって、

(a) 配列番号:2および配列番号:4に示されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする核酸分子と、

(b) 配列番号:1もしくは配列番号:3に示されるヌクレオチド配列または対応するリボヌクレオチド配列を含む核酸分子と、

(c) 配列番号:2のアミノ酸配列と少なくとも90%同一性のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸分子と、

(d) (a)、(b)または(c)のヌクレオチド配列の断片を含む核酸分子、  
とかなる群より選択される核酸分子。

## 【請求項 2】

DNA分子である、請求項1記載の核酸分子。

## 【請求項 3】

cDNA分子である、請求項2記載の核酸分子。

## 【請求項 4】

RNA分子である、請求項1記載の核酸分子。

## 【請求項 5】

チョウセンアザミ由来である、請求項1～4のいずれか一項記載の核酸分子。

10

20

**【請求項 6】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の核酸分子を含むベクター。

**【請求項 7】**

核酸分子が、原核および / または真核細胞中の翻訳可能RNAの転写および合成を確実にする調節エレメントに機能的に連結されている、請求項 6 記載のベクター。

**【請求項 8】**

調節エレメントがパタチンB33プロモーターまたはCaMV 35Sプロモーターに由来する、請求項 7 記載のベクター。

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の核酸分子もしくは請求項 6 ~ 8 のいずれか一項記載のベクターにより形質転換された宿主細胞またはそのような細胞に由来する宿主細胞。 10

**【請求項 10】**

ショ糖依存的ショ糖フルクトシルトランスフェラーゼ (SST) をコードする遺伝子をさらに含む、請求項 9 記載の宿主細胞。

**【請求項 11】**

FFTの製造方法であって、請求項 9 記載の宿主細胞がFFTの合成を可能にする条件下で培養され、且つFFTが培養された細胞および / または培地から単離される方法。

**【請求項 12】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の核酸分子によってコードされるか、または請求項 1 1 記載の方法によって製造されるFFT。 20

**【請求項 13】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の核酸分子またはその相補鎖に特異的にハイブリダイズする核酸分子。

**【請求項 14】**

請求項 9 または 1 0 記載の形質転換された宿主細胞、特にトランスジェニック植物細胞、トランスジェニック植物組織およびトランスジェニック植物を製造するための方法であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の核酸分子または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項記載のベクターの、宿主細胞、植物細胞、植物組織または植物への導入を含む方法。

**【請求項 15】**

形質転換された宿主細胞、トランスジェニック植物細胞、植物組織または植物であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の核酸分子もしくは請求項 6 ~ 8 のいずれか一項記載のベクターを含むか、もしくは請求項 1 4 記載の方法によって得られる、またはこのような細胞、組織もしくは植物に由来する形質転換された宿主細胞、トランスジェニック植物細胞、植物組織または植物。 30

**【請求項 16】**

ショ糖依存的ショ糖フルクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をさらに含む、請求項 1 5 記載の形質転換された宿主細胞、トランスジェニック植物細胞、植物組織または植物。

**【請求項 17】**

請求項 1 5 または 1 6 記載の植物細胞または植物組織を含む植物。 40

**【請求項 18】**

有用植物である、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項記載の植物。

**【請求項 19】**

有用植物がショ糖含有植物である、請求項 1 8 記載の植物。

**【請求項 2 0】**

請求項 1 5 または 1 6 記載の植物細胞を含む、請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項記載の植物の繁殖材料。

**【請求項 2 1】**

請求項 1 5 または 1 6 記載の植物細胞を含む、請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項記載の植物の収穫産物。 50

**【請求項 2 2】**

下記の段階を含む高分子イヌリンを製造するための方法：

(a) 請求項 1 5 もしくは 1 6 記載の形質転換された宿主細胞、トランスジェニック植物細胞もしくは植物組織、または請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項記載の植物を、FFTの產生と、選択的には外部から供給された、1-ケストースまたは等価な基質の高分子イヌリンへの変換とを可能にする条件下で培養する段階と、

(b) このようにして產生されたイヌリンを培養細胞、組織もしくは植物から、または培地から回収する段階。

**【請求項 2 3】**

下記の段階を含む高分子イヌリンを製造するための方法：

10

(a) 1-ケストースまたは等価な基質を請求項 1 2 記載のFFTと、高分子イヌリンへの変換を可能にする条件下で接触させる段階、および

(b) このようにして產生されたイヌリンを回収する段階。

**【請求項 2 4】**

20よりも高い平均重合度 (DP) を示す高分子イヌリンを製造するためのインビトロでの方法であって、基質であるショ糖がSSTおよび請求項 1 2 に記載のFFTを含む酵素の組み合わせによって高分子イヌリンに変換される方法。

**【請求項 2 5】**

請求項 1 5 もしくは 1 6 記載の宿主細胞、植物細胞もしくは植物組織から、請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項記載の植物から、請求項 2 0 記載の繁殖材料から、もしくは請求項 2 1 記載の収穫産物から、または請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか一項記載の方法によって得られる高分子イヌリン。

20

**【請求項 2 6】**

水系における粘度を増大させるための界面活性剤を製造するため、洗剤として、懸濁化剤として、沈降速度を高めるため、且つ水を複合化または結合するための請求項 2 5 記載のイヌリンの使用。

**【発明の詳細な説明】****【0 0 0 1】**

本発明は、フルクトシルトランスフェラーゼ (FFT) の酵素活性を有する蛋白質をコードする核酸分子に関する。本発明はまた、このような核酸分子を含むベクター、ならびに該核酸分子によって形質転換された宿主細胞、特に植物細胞、植物組織および植物にも関する。さらに、FFTをコードする核酸分子の導入によって長鎖イヌリンを合成するトランスジェニック植物の製造法を記載する。本発明はまた、FFTを製造するための方法および様々な宿主生物、特に植物における長鎖イヌリンの製造に関し、また本発明のFFTを用いて長鎖イヌリンを製造するためのインビトロでの方法にも関する。本発明はさらに、本発明の宿主細胞と、本発明の方法によって得られるイヌリンにも関する。

30

**【0 0 0 2】**

水溶性の直線状ポリマーは、例えば水系の粘度を上げるため、界面活性剤として、懸濁化剤として、または沈降を早めるため、および水を複合化するだけでなく結合させるためといった様々な適用が可能である。例えばフルクトシル多糖といった糖類を基にするポリマーは、生体分解性であるため特に興味深い原料である。

40

**【0 0 0 3】**

工業生産および処理用の再生原料としての適用とは別に、フルクトシルポリマーは、例えば甘味料といった食品添加物としても考えられる。様々な用途のために、異なる鎖長のポリマーが必要とされる。食品加工業においては短鎖および中鎖ポリマーが特に好ましいが、界面活性剤の產生などの工業的用途には重合度 (DP) の高いポリマーが必要である。

**【0 0 0 4】**

これまででは、細菌由来のフルクトシルトランスフェラーゼが発現される、植物中で長鎖フルクトタン多糖を製造する方法のみが記載されている。ほとんどの細菌フルクトシルトランスフェラーゼは、多くの -2,1- 分枝を有する -2,6 連結フルクトシルポリマーのレバン

50

を合成する。その多くの分枝のために、レバパンを工業加工する際には決定的不都合があり、したがって工業原料としてはイヌリンに比べてかなり重要性が低い。これまで、その遺伝子産物がイヌリン合成に関与する細菌遺伝子は一つだけ、すなわちミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*) 由来の ftf 遺伝子だけが知られている。遺伝子が以前に遺伝子操作されていれば、その遺伝子を植物中で発現することは、原理的には可能である。しかし、トランスジェニック植物から得られるイヌリンの収量は非常に低いため、トランスジェニック植物の経済的利用は論外である。

#### 【 0 0 0 5 】

さらに、キクイモ (*Helianthus tuberosus*) 由来のフルクトシルトランスフェラーゼを発現するトランスジェニック植物を製造する方法が公知である。10 トランスジェニック植物においてこれらの遺伝子を発現させると、DP = 6からDP = 10の平均的重合度のイヌリンが製造される。この程度の重合度のポリマーは長鎖イヌリンとは呼ばないと考えられる。平均 DP = 6からDP = 10のイヌリンはほとんどの工業的用途に不適切である。

#### 【 0 0 0 6 】

植物における長鎖イヌリンの経済的製造法または長鎖イヌリン製造のための酵素の合成方法が公知である。

#### 【 0 0 0 7 】

PCT/US89/02729に、トランスジェニック植物細胞、具体的にはトランスジェニック植物の果実における炭水化物ポリマー、特にデキストランまたはポリフルクトースの合成の可能性が記載されている。このように改変された植物を产生するために、微生物、特にアエロバクター・レバニクム (*Aerobacter levanicum*)、唾液連鎖球菌 (*Streptococcus salivarius*) および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来のレバンスクラーゼ、またはリウコノストック・メゼンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) 由来のデキストランスクラーゼの使用が推奨されている。活性酵素の生成またはレバンもしくはデキストランの生成、あるいはトランスジェニック植物の产生についてはいずれも記載されていない。PCT/EP93/02110は、グラム陰性細菌エルウィニア・アミロボーラ (*Erwinia amylovora*) 由来のレバンスクラーゼの lsc 遺伝子を発現するトランスジェニック植物製造法を開示している。20 これらの植物は高分子で分枝度の高いレバンを产生する。PCT/NL93/00279は、枯草菌由来 sacB 遺伝子またはミュータンス連鎖球菌由来 ftf 遺伝子を含むキメラ遺伝子を有する植物の形質転換について記載している。sacB 遺伝子を発現するトランスジェニック植物は分枝レバンを产生する。ftf 遺伝子を発現する植物は高分子イヌリンを合成する。しかし、収量は非常に低く、経済的利用は論外である。30 PCT/NL96/00012は、炭水化物ポリマーを合成する酵素をコードするDNA配列、ならびにこれらのDNA配列を用いたトランスジェニック植物の製造について開示している。開示された配列はキクイモ由来のものである。PCT/NL96/00012によれば、開示された配列をツクバネアサガオおよびジャガイモのフルクトタン特性を改変するために用いることができるが、キクイモ自体のフルクトタン特性を改変するために用いることもできる。トランスジェニック植物においてSSTおよびFFT遺伝子を発現するとき、イヌリンを产生することが可能である。しかし、イヌリンの平均重合度はDP = 6からDP = 10の範囲である。高分子イヌリンの产生は、PCT/NL96/00012に記載の方法では不可能である。40 PCT/EP97/02195は、イヌリンを产生するトランスジェニック植物をミュータンス連鎖球菌由来の ftf 遺伝子を用いて製造する方法を記載している。高分子イヌリンの収量は、PCT/NL93/00279に記載の植物の場合と同様に低い。DE19708774.4は、フルクトシルポリメラーゼ活性を示す酵素を用いた短鎖イヌリンの製造について記載している。短鎖イヌリンをトランスジェニック植物において製造することができる。短鎖イヌリンの収量は高く、ジャガイモでは収量は細胞のショ糖含有量に対応する。しかし、長鎖イヌリンの製造については記載されていない。

#### 【 0 0 0 8 】

植物におけるイヌリンの合成が徹底的に試験されている (PollockおよびChatterton、フルクトタンス (Fructans)、植物の生化学 (The Biochemistry of Plants) 第14巻 (1988)、Academic Press、109 ~ 140ページ)。しかし、植物中で天然に生じるイヌリンは短鎖フ50

ルクタンで、最大重合度はおよそDP = 35である (PollockおよびChatterton, 1988、上記)。植物におけるフルクタンの合成および代謝は、少なくとも三つの酵素の活性に基づく。すなわち、三糖ケストースを生成するショ糖依存的ショ糖-フルクトシルトランスフェラーゼ (SST)、DP = 3の最小重合度フルクタン分子 (ケストース) のフルクトシル残基をショ糖およびより高分子のフルクタンに転換するフルクタン依存的フルクトン-フルクトシルトランスフェラーゼ (FFT)、ならびにフルクタン分子からフルクトース残基を除去するフルクタンエキソヒドロラーゼ (FEH) である。様々な植物種におけるイヌリンの平均分子量の差、例えばタマネギ (*Allium cepa*) の場合には約 $2 \times 10^3$ でキクイモの場合には $5 \times 10^3$ といった差が、それらのSST、FFTまたはFEHの異なる特性に基づいているのかどうかは不明である。

10

## 【0009】

このため、植物におけるイヌリン合成に関する現在の知識から見て、それを用いることによって植物中で経済的に興味が持てる量の高分子イヌリンを合成することができる、適当なDNA配列を同定することは不可能である。

## 【0010】

したがって、本発明の根底にある技術的問題は、長鎖イヌリンを生成することができる遺伝的に改変された生物、特に植物の産生を可能にする核酸分子および方法を提供することである。

## 【0011】

この課題は特許請求の範囲において特徴づけられる態様を提供することにより解決される。

20

## 【0012】

従って、本発明はFFTの酵素活性を有するタンパク質をコードし、且つ下記の(a)～(e)からなる群より選択される核酸分子に関する：

(a) 配列番号：2および配列番号：4に示しているアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸分子、

(b) 配列番号：1または配列番号：3に示しているヌクレオチド配列または対応するリボヌクレオチド配列を含む核酸分子、

(c) (a)または(b)に述べられている核酸分子の相補鎖に、ストリンジエントな条件下ハイブリダイズする核酸分子、および

30

(d) (a)、(b)または(c)のヌクレオチド配列の断片を含む核酸分子。

## 【0013】

本発明の文脈において、フルクトシルトランスフェラーゼ (FFT) はフルクトースユニット間の -2,1-グリコシド結合および / または 2,6-グリコシド結合の生成を触媒することができる蛋白質である。これにより転移されるフルクトシル残基は、1-ケストースから誘導することもでき、またはフルクタンポリマーから誘導することもできる。本発明に関連して、高分子フルクタンは、その分子が平均で20よりも多く、好ましくは25よりも多く、さらに好ましくは少なくとも32のフルクトシル残基を含むポリマーである。さらに、高分子フルクタンは好ましくはその分子が平均で3000未満、より好ましくは300未満、特に好ましくは100未満のフルクトシル残基を含むポリマーである。フルクトシル残基は -2,1結合または -2,6結合のいずれによってグリコシド結合されていてもよい。イヌリンの場合、残基は一般に -2,1グリコシド結合によって連結されている。程度は低いが -2,6結合も生じることがあり、特に5%未満、好ましくは3%未満、より好ましくは1.5%未満、最も好ましくは0.5%未満で生じる。フルクトシルポリマーはその末端に、グルコースのC-1水酸基およびフルクトシル残基のC-2水酸基を介して連結されるグルコース残基を有していてもよい。この場合、ショ糖分子もフルクトシルポリマーに含まれる。

40

## 【0014】

驚くことに、本発明の核酸分子が形質転換植物において発現される際に、多量の高分子イヌリンが生成される。植物中で生成されたイヌリンは明らかにDP = 20よりも高い平均重合度を示す。キクイモ由来の類似の酵素がトランスジェニック植物における平均重合度DP =

50

20未満のイヌリン合成に関与している (PCT/NL96/00012) ため、このことは予期しないことであった。

【0015】

本発明の核酸分子は、DNA分子であってもRNA分子であってもよい。対応するDNA分子は、例えばゲノムまたはcDNA分子である。本発明の核酸分子は、天然原料、好ましくはチョウセンアザミから単離することができ、または公知の方法により合成することもできる。

【0016】

従来の分子生物学的方法(例えば、Sambrook et al., 1989, 「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」, 第二版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと)により、様々な突然変異体を本発明の核酸分子に導入することが可能であり、それによりおそらく改変された生物特性を有するタンパク質が合成される。これに関して一方では、コーディングDNA配列の5'または3'末端における進行性の欠失によって核酸分子が產生される、欠失変異体を产生することができる。これらの核酸分子はそれに対応して短縮された蛋白質の合成を引き起こす。核酸配列の5'末端におけるこのような欠失によって、例えば酵素の液胞中への転流の原因となるアミノ酸配列(移行ペプチド)を同定することができる。これにより、対応する配列が除去されたためにもはや液胞内ではなく、細胞質ゾル内に配置されるか、または他のシグナル配列が付加されたために他の区画内に配置される、酵素の標的を定めた产生が可能となる。

【0017】

他方では、アミノ酸配列の改変が、例えば酵素活性または酵素の制御に影響をおよぼす位置で、点変異を誘発することも考えられる。この様式で、例えば改変されたK<sub>m</sub>値を示す、またはアロステリック制御もしくは共有結合修飾などの細胞内で起こる制御メカニズムの対象となることがもはやない変異体を产生することができる。

【0018】

さらに、基質または生成物特異性が改変された変異体を产生することができる。さらに、活性-温度特性が改変された変異体を产生することができる。

【0019】

原核細胞における組換えDNAの操作において、本発明の核酸分子またはこれらの分子の部分を、DNA配列の組換えによって突然変異誘発または配列改変を生じうるプラスミドに挿入することができる。

【0020】

標準的方法(Sambrookら、1989、分子クローニング：実験の手引き(Molecular Cloning: A laboratory manual)、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY、USA参照)を用いて、塩基置換を実施することもでき、または天然もしくは合成による配列を付加することもできる。DNA断片を互いに連結するために、アダプターまたはリンカーを断片に結合してもよい。さらに、適当な制限酵素切断部位を提供する、または余分のDNAもしくは制限酵素切断部位を除去する操作を用いることもできる。挿入、欠失または置換を利用することができる場合は、インピトロ突然変異誘発、プライマー修復、制限またはライゲーションを用いてもよい。解析方法として通常は、配列解析、制限解析またはさらなる生化学-分子-生物学的方法を利用する。

【0021】

本発明の文脈において、「ハイブリダイゼーション」という用語は、例えばSambrookら、分子クローニング：実験の手引き(Molecular Cloning: A laboratory manual)、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、に記載されているとおり、通常の条件下、好ましくはストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションを意味する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例は、50%ホルムアミド、5xSSC、5xデンハーツ(Denhardt)溶液、40mMリン酸ナトリウムpH6.8、0.5% (w/v) BSA、1% (w/v) SDS、0.1mg/mlニシン精子DNA中、42°でのハイブリダイゼーションである。通常の非ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の一例は、前述の条

10

20

30

40

50

件下であるが、50%の代わりに30%ホルムアミドを用いる条件下でのハイブリダイゼーションである。ストリンジエントな条件の場合の洗浄条件は、好ましくは60℃で0.5xSSC/0.5%SDSであり、非ストリンジエント条件の場合は、好ましくは56℃で2xSSC/0.5%SDSである。

#### 【0022】

本発明の分子にハイブリダイズする核酸分子は、例えばチョウセンアザミなどの対応する生物から作製されたゲノムまたはcDNAライブラリーから単離することができる。

#### 【0023】

このような核酸分子は、本発明の分子もしくはこれらの分子の部分、または場合によりこれらの分子の逆相補体を用いることによって、例えば標準的方法（例えば、Sambrookら、1989、分子クローニング：実験の手引き（Molecular Cloning: A laboratory manual）、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY参照）にしたがってのハイブリダイゼーションによって同定および単離することができる。ハイブリダイゼーションプローブとして、例えば配列番号：1もしくは配列番号：3に示される核酸配列またはその部分を正確にまたは基本的に提示する核酸分子を用いることができる。ハイブリダイゼーションプローブとして用いる断片は、通常の合成法を用いて產生され、その配列が本発明の核酸分子の配列と基本的に類似の合成断片でもよい。

10

#### 【0024】

本発明の核酸分子にハイブリダイズする分子は、本発明の蛋白質をコードする前述の核酸分子の断片、誘導体および対立変異型も含む。「断片」とは、本発明の蛋白質をコードするのに十分な長さを有する核酸分子の一部分であると考えられる。この文脈において、「誘導体」という用語は、これらの分子の配列が前述の核酸分子の配列と一つまたは複数の位置で異なることを意味する。しかし、誘導体はこれらの配列に対して高度の相同性を示す。相同性とは、少なくとも40%の配列同一性、特に少なくとも60%、好ましくは80%よりも高く、最も好ましくは90%よりも高い同一性を意味する。これらの核酸分子によってコードされる蛋白質は、配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは85%、特に好ましくは90%よりも高く、より好ましくは95%よりも高く、さらにより好ましくは97%よりも高く、最も好ましくは99%よりも高い配列同一性を示す。前述の核酸分子からの逸脱は、例えば、欠失、置換、挿入および／または組換えにより生じうる。

20

#### 【0025】

前述の分子と相同で、これらの分子の誘導体である核酸分子は通常、これらの分子の変種で、同じ生物学機能を有する改変体を意味する。これらは天然の変種、例えば他の生物由来の配列、または突然変異でもよく、これらの突然変異は天然に生じるものでもよく、または標的突然変異誘発によって誘導されたものでもよい。さらに、これらの変種は合成により生成された配列でもよい。対立変異型は、天然の変異型または合成もしくは組換えにより生成された変異型のいずれでもよい。

30

#### 【0026】

本発明の核酸分子の様々な変異型によってコードされる蛋白質は、酵素活性、分子量、免疫学的反応性もしくは配座またはゲル電気泳動における可動性、クロマトグラフィ的特性、沈降係数、溶解性、分光学的性質、安定性、至適pH、至適温度などの物理的特性といった一定の共通する特徴を示す。

40

#### 【0027】

一つの好ましい態様において、本発明の核酸配列はチョウセンアザミ (*Cynara scolymus*) のものである。

#### 【0028】

本発明はさらに、本発明の核酸分子を含むベクターに関する。これらは好ましくはプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージおよび遺伝子技術において一般的な他のベクターである。

#### 【0029】

本発明のベクター中で、本発明の核酸分子は好ましくは、原核および／または真核細胞中の翻訳可能RNAの転写および合成を確実にする調節エレメントに機能的に連結されている

50

。

### 【 0 0 3 0 】

本発明の発現ベクターによれば、様々な宿主生物、特に細菌、真菌、藻類、動物細胞ならびに好ましくは植物細胞および植物などの原核または真核細胞中での長鎖イヌリンの産生が可能になる。好ましい宿主生物は、特に例えばサッカロミセス・セレビジエ (*S. cerevisiae*) などの酵母、およびストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ブルガリア菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、乳連鎖球菌 (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・クレモリス (*S. cremoris*)、アシドフィルス菌 (*Lactobacillus acidophilus*) およびリウコノストック・クレモリス (*Leuconostoc cremoris*) などの乳酸菌である。コードされる酵素はおそらく、長鎖イヌリン産生のために宿主生物外でも用いることができる。植物細胞が特に好ましい。  
10

### 【 0 0 3 1 】

様々な発現システムに関する調査が、例えばMethods in Enzymology 153 (1987)、385 ~ 516、Bitterら (Methods in Enzymology 153 (1987)、516 ~ 544)、Sawersら、Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996)、1 ~ 9、Billmann-Jacobe、Current Opinion in Biotechnology 7 (1996)、500 ~ 504、Hockney、Trends in Biotechnology 12 (1994)、456 ~ 463、およびGriffithsら、Methods in Molecular Biology 75 (1997)、427 ~ 440に見いだされる。酵母の発現システムは、Hensingら、Antonie van Leuwenhoek 67 (1995)、261 ~ 279、Bussineauら、Developments in Biological Standardization 83 (1994)、13 ~ 19、Gellissenら、Antonie van Leuwenhoek 62 (1992)、79 ~ 93、Fleer、Current Opinion in Biotechnology 3 (1992)、486 ~ 496、Vedvick、Current Opinion in Biotechnology 2 (1991)、742 ~ 745、およびBuckholz、Bio/Technology 9 (1991)、1067 ~ 1072に記載されている。発現ベクターは先行技術において多数記載されている。選択された宿主において確実に複製するための選択マーカー遺伝子および複製開始点とは別に、これらは転写のために通常は細菌またはウイルスプロモーターと、ほとんどの場合、終止コドンを含む。プロモーターと終止コドンとの間には、少なくとも一つの制限酵素切断部位または一つのポリリンカーがあり、これによりコーディングDNA配列を挿入することができる。選択された宿主生物中で作用する場合、対応する遺伝子の転写を自然に制御するDNA配列をプロモーター配列として用いることができる。この配列は他のプロモーター配列と交換することもできる。遺伝子の構成的発現を引き起こすプロモーター、ならびに下流遺伝子発現の標的を定めた調節を可能にする誘導プロモーターも利用することができる。これらの性質を備えた細菌およびウイルスプロモーター配列が、先行技術において広く記載されている。微生物 (大腸菌、サッカロミセス・セレビジエなど) における発現の調節配列が、先行技術において十分に記載されている。下流遺伝子の特に強い発現を可能にするプロモーターは、例えば、T7プロモーター (Studierら、Methods in Enzymology 185 (1990)、60 ~ 89)、lacUV5、trp、trp-lacUV5 (DeBoerら、RodriguezおよびChamberlin編、プロモーター、構造と機能 (Promotors, Structure and Function) ; Praeger、ニューヨーク (1982)、462 ~ 481; DeBoerら、Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1983)、21 ~ 25)、p1、rac (Borosら、Gene 42 (1986)、97 ~ 100) である。通常、蛋白質の量は微生物の増殖周期において対数期の中程から終わりにかけて最高となる。このため、蛋白質の合成には好ましくは誘導プロモーターを用いる。これらを用いることにより構成プロモーターに比べてより高収量の蛋白質が得られることが多い。強度の構成プロモーターを用いると、クローニングした遺伝子の永続的転写および翻訳を介して、他の本質的な細胞機能のためのエネルギー損失がしばしば起こり、細胞の増殖速度を低下させる (Bernard R. Glick、Jack J. Pasternak、Molekulare Biotechnologie (1995)、Spektrum Akademische Verlag GmbH、Heidelberg Berlin Oxford、p.342)。したがって、最適量の蛋白質を得るために、二段階の方法がよく用いられる。最初に、宿主細胞を至適条件下で相対的に高い細胞密度に達するまで培養する。第二段階では、用いたプロモーターの種類に応じて転写を誘導する。この状況において、ラクトースまたはIPTG (=イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド) によって誘導されるtacプロモーターが特に適している (deBoerら、P  
20  
30  
40  
50

roc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983)、21~25)。転写の終止コドンも先行技術において記載されている。

【0032】

対応する蛋白質をコードするDNAによる宿主細胞の形質転換は一般に、Sambrookら(分子クローニング: 実験の手引き(Molecular Cloning: A Laboratory Course Manual)、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク)などに記載の標準的方法を用いて実施することができる。宿主細胞の培養は、特にpH値、温度、塩濃度、エアリング、抗生物質、ビタミン、微量成分などを考慮して、用いた宿主細胞それぞれの要求に対応する栄養培地中で行う。

【0033】

宿主細胞によって產生された酵素の精製は、沈降、イオン交換クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、ゲル濾過、HPLC逆相クロマトグラフィなどの通常の精製法を用いて実施することができる。

【0034】

宿主細胞中に発現されたDNAを改変することによって、一定の性質により培地から容易に単離することができるポリペプチドを宿主細胞中に产生することができる。したがって、さらなるポリペプチド配列との融合蛋白質として発現される蛋白質を発現する可能性があり、その特有の結合特性によってアフィニティクロマトグラフィによる融合蛋白質の単離が可能となる(例えば、Hoppら、Bio/Technology 6 (1988)、1204~1210; Sassenfeld、Trends Biotechnol. 8 (1990)、88~93)。

【0035】

植物細胞における発現のためには、パタチンB33プロモーターの調節エレメントが好ましい。他の好ましいプロモーターは、35S CaMVプロモーターおよびサッカロミセス・セレビジエ由来アルコール脱水素酵素のプロモーターである。

【0036】

本発明のベクターは、宿主生物中でベクターを安定化させるさらなる機能ユニット、例えばサッカロミセス・セレビジエにおける安定化のための細菌複製開始点または2-ミクロン-DNAを有していてもよい。さらに、ベクターはアグロバクテリアT-DNAの左右の末端配列を含んでいてもよく、これによって植物ゲノム中への安定な組込みが可能となる。

【0037】

本発明のベクターは、アグロバクテリア由来オクトピンシンターゼ遺伝子のターミネーターなどの、機能的ターミネーターをさらに含みうる。

【0038】

もう一つの態様において、本発明の核酸分子は本発明のベクター内の核酸分子と連結されており、該核酸分子は酵素を様々な細胞区画に誘導するための機能的シグナル配列をコードする。この改変は例えば、高等植物のアボプラストに分泌するためのN-末端シグナル配列の付加でもよい。しかし、コードされたFFTへのシグナル配列の融合を引き起こすいかなる他の改変も、本発明の対象である。本発明のベクターに含まれる核酸分子は、分泌を引き起こすアミノ酸配列をコードする配列を特に含んでいてもよい。この状況において、好ましくはクレブシエラ・オキシトカ由来 -CGTアーゼのシグナルペプチドM5A1(Fiedlerら、J. Mol. Biol. 256 (1996)、279~291)または遺伝子バンクアクセッション番号X86014の配列のヌクレオチド11529~11618によってコードされるシグナルペプチドを利用する。

【0039】

特に好ましい態様において、本発明はプラスミドp35-csFFTおよびp33-csFFTに関し、その構築を実施例に記載する(図2および4)。

【0040】

さらなる態様において、本発明は、本発明の、または宿主細胞から誘導された核酸分子またはベクターを一時的または持続的に含む宿主細胞に関する。この状況において、宿主細胞はインビトロで組換えDNAを取り込むことができ、また該当する場合には本発明の核酸

10

20

30

40

50

分子によってコードされる蛋白質を合成することができる生物である。宿主細胞は原核細胞でもよく、また真核細胞でもよい。これらは特に微生物でもよい。本発明の状況において、これらは例えばSchlegel「Allgemeine Mikrobiologie」(George Thieme Verlag (1985)、1~2)に定義されているすべての細菌および原生生物である。原核宿主生物に関して、ビフィドバクテリアなどの一定のヒト腸管微生物の増殖に対し、イヌリンのプラスの影響が首尾よく示されていることに留意されたい。ビフィドバクテリアは健康的効果があるとされている(例えば、Gibsonら、Int. Sugar J. 96 (1994)、381~386; Roberfroidら、J. of Nutrition 128 (1998)、11~19参照)。腫瘍抑制作用も議論されている(例えば、Reddyら、Carcinogenesis 18 (1997)、1371~1374; Singhら、Carcinogenesis 18 (1997)、833~841参照)。このため、食品加工業における使用には酵母(パン)または乳酸菌(ヨーグルト、バターミルクなど)などの本発明の宿主細胞が適している。  
10

#### 【0041】

特に好ましい態様において、本発明の宿主細胞はショ糖依存的ショ糖-フルクトシルトランスフェラーゼ(SST)をコードする遺伝子をさらに含む。このような配列は、例えば、チョウセンアザミ(ドイツ特許出願DE-A119708774)、キクニガナ(Cichorium intibus)(de Halleuxら、Plant Physiol. 113 (1997)、1003~1013)、キクイモ(国際公開公報第96/21023号)およびタマネギ(Vijnら、Plant Physiol. 117 (1998)、1507~1513)から単離された。

#### 【0042】

本発明は特に、本発明の核酸分子によって形質転換された、あるいは本発明のベクターシステムもしくは誘導体またはその部分を含むトランスジェニック植物に関する。これらは本発明のベクターシステム、誘導体またはベクターシステムの部分の導入によって、長鎖イヌリン産生のための酵素を合成することができる。本発明の細胞は好ましくは、導入された本発明の核酸分子が形質転換細胞に関して異種である、すなわちこれらの細胞中で天然には発生しないか、またはゲノム内のそれぞれ天然に発生する配列とは異なる位置に配置されていることを特徴とする。さらに、このような本発明のトランスジェニック植物細胞は好ましくはSSTをコードするDNA配列を含む。  
20

#### 【0043】

本発明はさらに、本発明の核酸分子によってコードされる蛋白質、ならびにそれらを製造する方法であって、本発明の宿主が該蛋白質の合成を可能にする条件下で培養される方法に関する。続いて蛋白質を、培養された細胞および/または培地から単離する。本発明はさらに、本発明の宿主細胞から、または本発明の方法によって得られるFFTに関する。  
30

#### 【0044】

本発明はさらに、本発明の核酸分子、それに相補的な分子、またはこのような分子の部分に特にハイブリダイズする核酸分子に関する。これらは好ましくはスクレオチドが少なくとも10個、特に少なくとも15個、特に好ましくは少なくとも50個の長さのオリゴスクレオチドである。本発明のオリゴスクレオチドは、例えば、PCR反応のプライマーとして用いることができる。これらはまた、アンチセンス構築物またはリボザイムをコードするDNA分子の成分でもありうる。

#### 【0045】

本発明はまた、本発明の核酸分子またはベクターの植物細胞、植物組織および植物への導入を含む、トランスジェニック植物細胞、植物組織および植物の製造法にも関する。  
40

#### 【0046】

これまで通常の方法、例えば育種法では不可能であったが、本発明の核酸分子を提供することにより、組換えDNA法を用いて様々な生物、特に植物中で長鎖イヌリンを産生することが可能である。本発明のFFTの活性を上げることにより、例えば本発明の核酸分子を過剰発現させることにより、または細胞特異的調節メカニズムの影響をもはや受けず、且つ/もしくはその活性に関して明らかな温度依存性を示す突然変異体を提供することにより、組換えDNA法を用い、それに対応して改変された植物の収量を上げることが可能である。  
50

## 【0047】

したがって、対応するFFTの活性を増強するために、または通常はこの酵素を発現しない細胞中にこれを導入するために、本発明の核酸分子を植物細胞中で発現させることが可能である。さらに、細胞特異的調節メカニズムの影響をもはや受けないか、または改変された温度依存性、基質または生成物特異性を示す本発明のFFTを得るために、当業者には公知の方法にしたがって本発明の核酸分子を改変することが可能である。

## 【0048】

この目的のために、当業者は様々な植物形質転換システムを利用することができる。したがって、植物細胞を形質転換するためのT-DNAの使用が熱心に調査され、EP-A-120516 ; Holkema : The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985)、第V章、Fraley、Crit. Rev. Plant. Sci.、4、1~46およびAn、EMBO J. 4 (1985)、277~287に記載されている。10

## 【0049】

DNAを植物細胞に移入するため、植物外植片をアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) またはアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) と適当に共培養することができる。感染植物材料(例えば、葉、茎分節、根の断片であるが、プロトプラストまたは浮遊培養した植物細胞も)から、形質転換細胞の選別のために抗生物質またはバイオザイド (biozide) を含みうる適当な培地中で完全な植物を次いで再生することができる。次いで、このようにして得られた植物を、導入したDNAが存在するか否かについて調べることができる。バイオリストイック法を用いることにより、またはプロトプラストを形質転換することにより外来DNAを導入するための他の可能性は、当業者には公知である(例えば、Willmitzer, L.、1993 Transgenic Plants. Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler, P. Stadler編)、第2巻、627~659、VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge参照)20

。

## 【0050】

単子葉植物の形質転換のための別のシステムは、バイオリストイック法を用いた形質転換、電気的または化学的に誘導したDNAのプロトプラストへの取り込み、部分的に透過性にされた細胞の電気穿孔法、DNAの花序へのマクロ注入、膨脹を用いたDNAの小胞子および前胚へのミクロ注入である。(例えば、Lusardi、Plant J. 5 (1994)、571~582；Paszkowski、Biotechnology 24 (1992)、387~392参照)。30

## 【0051】

アグロバクテリウム・ツメファシエンスを用いたTi-プラスミド-ベクターシステムによる双子葉植物の形質転換は十分に確立された方法ではあるが、より最近の研究により、アグロバクテリウムに基づくベクターによる形質転換が単子葉植物の場合にも使用できることが明らかにされている(Chanら、Plant Mol. Biol. 22 (1993)、491~506；Hieiら、Plant J. 6 (1994)、271~282；Bytebierら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987)、5345~5349；Raineriら、Bio/Technology 8 (1990)、33~38；Gouldら、Plant Physiol. 95 (1991)、426~434；Mooneyら、Plant, Cell Tiss. & Org. Cult. 25 (1991)、209~218；Liら、Plant Mol. Biol. 20 (1992)、1037~1048)。40

## 【0052】

前述の形質転換システムの三つ、すなわち植物組織の電気穿孔法、プロトプラストの形質転換および再生可能な組織および細胞への粒子射撃法によるDNA移入は、過去に様々なタイプの穀類について確立されている(総説:Jahneら、Euphytica 85 (1995)、35~44)。対応する文献において、コムギの形質転換が様々な様式で記載されている(総説:Maeshwariら、Critical Reviews in Plant Science 14 (2) (1995)、149~178)。

## 【0053】

本発明の核酸分子を植物中で発現させると、合成された蛋白質を植物細胞のいかなる所望の区画にも配置させることは原理的には可能である。特定の区画への配置を達成するために、液胞内への配置を確実にする配列を欠失させなければならず、残りのコード領域を50

任意に、それぞれの区画内の配置を確実にするDNA配列に連結しなければならない。このような配列は当技術分野において公知である（例えば、Braun、EMBO J. 11 (1992)、3219~3227；Wolter、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988)、846~850；Sonnewald、Plant J. 1 (1991)、95~106；Rocha-Sosa、EMBO J. 8 (1989)、23~29参照）。

#### 【0054】

本発明はまた、本発明の核酸分子の一つまたは数個を用いて形質転換されたトランスジェニック植物細胞、植物組織または植物、ならびにこのようにして形質転換された細胞から誘導されたトランスジェニック植物細胞にも関する。このような細胞は、本発明の核酸分子の一つまたは数個を含み、それにより、これ／これらは好ましくは植物細胞中の転写を確実にする調節DNAエレメント、特にプロモーターに連結されている。このような細胞は、細胞中で天然には生じない本発明の核酸分子を少なくとも一つ含むという点で、またはこのような分子が細胞のゲノム内の天然には生じない部位、すなわちもう一つのゲノム環境で組み込まれるという点で、天然の植物細胞と異なっている。1-ケストースはFFTの天然の基質で、それ自体ショ糖依存的ショ糖フルクトシルトランスフェラーゼ（SST）のショ糖との反応中に生成するため、本発明の核酸分子、ベクターまたはFFTとは別にSSTを提供することは特に有利で、おそらく必須である。したがって、好ましい態様において、本発明はショ糖依存的ショ糖フルクトシルトランスフェラーゼ（SST）をコードする遺伝子をさらに含むトランスジェニック植物細胞、植物組織または植物に関する。これらは例えば、キクニガナ、キクイモ、もしくはダリアなどのすでに天然にSSTを発現する植物もしくは植物細胞、または組換えDNA法を用いてSSTをコードするDNA配列が導入された植物であってもよい。前記配列は、独立して、または本発明の核酸分子もしくはベクターと同時に導入されたものでもよい。

10

20

30

#### 【0055】

トランスジェニック植物細胞および植物組織は、当業者には公知の方法を用いて、完全な植物に再生させることができる。本発明のトランスジェニック植物細胞を再生させることによって得られる植物も、本発明の対象である。本発明のさらなる対象は、前述のトランスジェニック植物細胞を含む植物である。トランスジェニック植物細胞は、原理的にはいかなる所望の植物種、すなわち单子葉植物ならびに双子葉植物であってもよい。これらは好ましくは有用植物、特にコメ、トウモロコシ、テンサイ、サトウキビもしくはジャガイモなどのショ糖含有植物、野菜（例えば、トマト、ニンジン、ニラネギ、キクニガナ等）、牧草、サツマイモ、コムギ、オオムギ、セイヨウアブラナまたはダイズである。

30

#### 【0056】

本発明はまた、実、種、塊茎、根茎、実生、挿し木、カルス、細胞培養物などの本発明の植物の繁殖材料および収穫産物にも関する。

#### 【0057】

本発明のさらなる対象は、本発明の宿主細胞、特にトランスジェニック植物細胞、植物組織、植物、ならびに繁殖材料および収穫産物から得られる長鎖イヌリンである。

#### 【0058】

もう一つの態様において、本発明は下記の段階を含む長鎖イヌリンを製造するための方法に関する：

40

(a) 宿主細胞、特に本発明の植物細胞、植物組織または植物を、FFTの產生と、選択的には外部から供給された、1-ケストースまたは等価な基質の長鎖イヌリンへの変換とを可能にする条件下で培養する段階と、

(b) このようにして產生されたイヌリンを培養した宿主細胞、特に植物細胞、組織もしくは植物から、または培地から回収する段階。

#### 【0059】

さらなる態様において、本発明は下記の段階を含む長鎖イヌリンを製造するための方法に関する：

(a) 1-ケストースまたは等価な基質を本発明のFFTと、長鎖イヌリンへの変換を可能にする条件下で接触させる段階と、

50

(b) このようにして產生されたイヌリンを回収する段階。

【0060】

様々な原料、特に植物細胞からのイヌリンの回収は、例えばGibsonら、Int. Sugar J. 96 (1994)、381~486; Baxa、Czech J. Food Sci. 16 (1998)、72~76; EP-A-787745; De Leenheer、Carbohydr. Org. Raw Mater. III、Workshop (1996)、Meeting Date 1994、67~92、Verlag VCH Weinheim、Germanyおよびロシア特許RU2001621C1に記載されている。  
。

【0061】

本発明はさらに、基質であるショ糖と本発明のSSTおよびFFTからの酵素の組み合わせを用いることによって、長鎖イヌリンを製造するためのインピトロでの方法に関する。さらなる態様において、本発明はフルクトシルオリゴマーおよび本発明のFFTを含む混合物を用いることによって、イヌリンを製造するためのインピトロでの方法に関する。この状況において、フルクトシルオリゴマーは、DPが約2~7のフルクトースユニットを含み、グルコース残基をその末端に示しうるオリゴマーである。本発明の方法を実施するとき、好ましくは組換えによって製造された蛋白質を用いる。本発明の状況において、これらはそれぞれの蛋白質をコードするDNA配列を宿主細胞に導入し、そこで発現させることによって產生された蛋白質である。この蛋白質は続いて宿主細胞および/または培地から回収することができる。宿主細胞は、好ましくは上で定義した本発明の宿主細胞である。本発明の方法の好ましい態様において、分泌された蛋白質は上清から得られるため、細胞を破壊する、または蛋白質をさらに精製する必要がないように、組換えによって產生され、宿主細胞によって培地中に分泌された酵素を用いる。培地の残渣を除去するために、透析、逆浸透、クロマトグラフィ法などの通常の処理法を用いることができる。培地中に分泌された蛋白質の濃縮にも同じ事があてはまる。微生物による蛋白質の分泌は、通常はN末端シグナルペプチド(シグナル配列、リーダーペプチド)によって仲介される。このシグナル配列を有する蛋白質は微生物の細胞膜を透過しうる。蛋白質の分泌は、このシグナル配列をコードするDNA配列を対応する酵素をコードする領域に連結することによって達成できる。好ましくは、クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca)由来の-CGTアーゼのシグナルペプチドM5A1(Fiedlerら、J. Mol. Biol. 256 (1996)、279~291)、または遺伝子バンクにアクセッション番号X86014で登録された配列のヌクレオチド11529~11618によってコードされるシグナルペプチドを利用する。

【0062】

本発明の方法で用いる酵素は別法として、微生物を用いるのではなく、蛋白質の発現を誘導するインピトロでの転写および翻訳システムを用いて产生することができる。特に好ましい本発明の態様において、FFTは植物の葉組織のプロトプラストから產生される。

【0063】

本発明はさらに、宿主細胞、特に本発明の植物細胞、植物組織もしくは植物から、または本発明の植物および植物細胞の繁殖材料もしくは収穫産物から生成することができるイヌリン、あるいは本発明の前述の方法の一つによって得ることができるイヌリンに関する。好ましくはこのイヌリンを、水系の粘度を増大させるための界面活性剤を產生するため、洗剤として、懸濁化剤として、沈降速度を高めるため、水を複合または結合するために用いることができる。

【0064】

これらまたはその他の態様が開示されており、当業者には明白である。これらは本発明の説明および実施例に含まれる。前述の方法、手段または使用の一つに関し、本発明の趣旨において適用可能なさらなる文献を先行技術から、例えば公共の図書館から、または電子的手段を利用することにより、入手することができる。例えばインターネットを介して、例えば<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>のアドレスから接続できる「Medline」などの公共のデータベースがこの目的に有用である。さらなるデータベースおよびアドレスは当業者には公知で、インターネット、例えば<http://www.lycos.com>のアドレスから利用することができる。生物工学の特許または特許出願に関する資源および情報の

10

20

30

40

50

調査が、Berks、TIBTECH 12 (1994)、352~364に記載されている。

**【0065】**

実施例により本発明を例示する。

**【0066】**

実施例1：チョウセンアザミ (*Cynara scolymus*) 由来フルクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAの同定、単離および特徴分析

全RNAをチョウセンアザミの花托から単離した (Sambrookら、1989、分子クローニング：実験の手引き (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、USA)。ポリ(A)+mRNAをmRNA単離システムのPolyATract (Promega Corporation、米国ウィスコンシン州マディソン) を用いて単離した。相補的DNA (cDNA) をこのRNA5 μgから、Stratagene (ハイデルベルグ) のZAP-cDNA合成キットを製造業者の指示どおりに用いて產生し、 $2 \times 10^6$ の独立の組換えファージクローンを得た。増幅したcDNAライブラリーを、チョウセンアザミ由来SSTのcDNAに対応する<sup>32</sup>P標識したDNA断片 (DE19708774.4に記載のプラスミドpCy21のNot I断片) を用いて、ストリンジエンシーが低い条件下で標準的方法によりスクリーニングした。チョウセンアザミ由来SSTの配列がDE19708774.4に記載されている。陽性クローンを高ストリンジエンシー下でSSTプローブを用いてスクリーニングした。このスクリーニング中に陽性反応を示したクローンは明らかにSST cDNAであるため、破棄した。残りのクローンから、標準的ルーチン法で単離したプラスミドDNAを制限酵素Not Iを用いて切断することにより、cDNAインサートを単離し、ベクターpA7中にクローニングした。Not I断片の粘着性末端をT4ポリメラーゼを用いて埋めた。続いて、この断片をpA7のSmaI切断部位にライゲートした。ベクターpA7は、ポリリンカーのEcoRIとSacI部位との間にカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターのインサート (Gardner、Nucleic Acids Res. 9 (1981)、2871~2888によりヌクレオチド7146~7464) を含むpUC18 (Yanish-Perron、Gene 33 (1985)、103~119) の誘導体である。35Sプロモーターとは別に、pA7は、プラスミドpAGV 40 (Herrera-Estrella、Nature 303 (1983)、209~213) からPvu II-Hind III断片として単離され、Pvu II部位にSph Iリンクマーを付加した後ポリリンマーのSph IとHind III部位との間にクローニングされた、TiプラスミドpTi ACH 5 (Gielen、EMBO J. 3 (1984)、835~846) のT-DNAの第3遺伝子のポリアデニル化シグナル、ヌクレオチド11749~11939を含む。

**【0067】**

チョウセンアザミ由来cDNAを含むpA7誘導体を用いて、タバコプロトプラストをNegrutiu (Plant Mol. Biol. 8、(1987)、363~373) の方法にしたがって形質転換した。形質転換したプロトプラストをK3培地 (NagyおよびMaliga、Z. Pflanzenphysiologie 78 (1976)、453~455) 中、25℃で2日間、暗所で培養した。続いて、細胞抽出物を凍結と解凍を繰り返すことにより得た。抽出物をオリゴフルクタン (1-ケストース67.5%、ナイストース28.4%、フルクトシルナイストース3.6%、ショ糖0.5%) と共に28℃で12時間インキュベートし、続いてHPLCで解析した。HPLC解析は、CarboPac PA 100アニオン交換カラムをDionex DX-300勾配溶出クロマトグラフィシステム (Dionex、米国カリフォルニア州サンベール) に接続して実施した。糖モノマー、オリゴマーおよびポリマーをパルス電流測定法によって検出した。このための検出器調製は次のとおりであった： $T_1 = 0.48$ 秒； $T_2 = 0.12$ 秒； $T_3 = 0.12$ 秒； $E_1 = 0.05V$ ； $E_2 = 0.65V$ ； $E_3 = -0.95V$ ；感度 =  $0.1 \mu C$ ；積算 =  $0.28 \sim 0.48$ 秒；溶出液A = 0.15MNaOH；溶出液B = 1M NaAc/0.15M NaOH；勾配：100%Aを10分；0%Bから100%Bまでの直線的増加を2分；100%Bを2分；0%Aから100%Aまでの直線的増加を2分；Aを5分。試料を脱塩し、濾過 (microcon 10、amicon、米国ベバリー) した後に用いた。流速は1ml/分であった。少数の抽出物中に高分子イヌリンが認められた (図1参照)。

**【0068】**

実施例2：プラスミドpCy3のcDNAインサートの配列解析

プロトプラスト解析で、高分子イヌリンの合成を仲介したpA7誘導体 (pCy3) からのcDNAインサートを、ジデオキシヌクレオチド法 (Sanger、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977)、5463~5467) を用いて配列決定した。クローンpCy3のインサートは長さ2073bpのD

10

20

30

40

50

NAである。ヌクレオチド配列を配列番号：1に示している。対応するアミノ酸配列を配列番号：2に示している。配列番号：3は配列番号：1の変異型で、配列番号：1によってコードされるものと同じ蛋白質をコードする。

#### 【0069】

配列解析およびすでに報告されている配列との比較により、配列番号：1に示される配列は新規で、他の生物由来のFFTに対する相同性を示すコード領域を含むことが明らかにされた。

#### 【0070】

実施例3：プラスミドp35-csFFTの合成とジャガイモゲノムへのプラスミドの組込み  
プラスミドp35-csFFT（図2）はバイナリーベクターpBin19（Bevan、Nucl. Acids Res. 12 10  
(1984)、8711、Becker、Nucl. Acids Res. 18 (1990)、203にしたがって改変）内に三つの断片A、BおよびCを含む。

#### 【0071】

断片Aは、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターを含む。これはpBin 19-HygのポリリンカーのEcoRIとSacI部位との間のインサートとしてヌクレオチド7146～7 464（Gardner、Nucleic Acids res. 9 (1981)、2871～2888）を含む。

#### 【0072】

断片Bは配列番号：1の配列のヌクレオチド1～2073を含む。断片Bは、ベクターpBK-CMVの中のEcoRI部位にEcoRI/Not Iリンカー配列を介して挿入されており、このベクターからNot I断片として得られた。断片Cは、プラスミドpAGV 40（Herrera-Estrella、Nature 303 20  
(1983)、209～213）からPvu II-Hind III断片として単離され、Pvu II部位にSph Iリンカーペンタシスティムを付加した後ポリリンカーのSphIとHind III部位との間にクローニングされた、TiプラスミドpTi ACH 5（Gielen、EMBO J. 3 (1984)、835～846）のT-DNAの第3遺伝子のポリアデニル化シグナル、ヌクレオチド11749～11939を含む。

#### 【0073】

プラスミドp35-csSSTをアグロバクテリアに導入し（HofgenおよびWillmitzer、Nucleic Acids Res. 16 (1988)、9877）、続いて前述の標準的方法にしたがい、アグロバクテリウムが仲介する遺伝子移入によりジャガイモ（植物）中に導入した。前記ジャガイモ（植物）をチョウセンアザミ由来SST（ドイツ特許出願DE-A119708774参照）をコードするDNA配列で形質転換し、ジャガイモは35Sプロモーターの制御下でこれらの配列を発現する。完全な植物が形質転換細胞から再生された。再生された植物の葉から抽出物を得、フルクトシルポリマーの有無に関して調べた。解析を実施例1に記載のとおりに実施した。このベクターシステムで形質転換した一連の植物の葉を解析することにより、高分子イヌリンの発生が明らかに証明され、これはp35-csFFTに含まれるチョウセンアザミ由来FFT遺伝子の発現によるものであった（図3参照）。

#### 【0074】

#### 【表I】

チョウセンアザミSSTおよびFFT遺伝子を発現するトランスジェニックジャガイモ塊茎のイヌリン含有量解析

植物番号	フルクタン含有量 フルクトース(μmol)/鮮重量(g)	平均重合度 (フルクトース/グルコース比)
35-SST/FFT 22/26	30.81	21 (20/1)
35-SST/FFT 36/17	27.34	20 (19/1)

#### 【0075】

実施例4：プラスミドp33-csFFTの产生とジャガイモゲノムへのプラスミドの組込み  
プラスミドp33-csFFT（図4）は、断片AがCaMVの35Sプロモーターの代わりにジャガイモ由来パタチン遺伝子b33のB33プロモーターを含む以外は、プラスミドp35-csFFTと全く同じである。これは、pBin19-HygのポリリンカーのEcoRIとSacI部位の間に挿入された、パタ 40  
50

チン遺伝子b33のDraI断片（-1512位から+14位）（Rocha-Sosa、EMBO J. 8 (1989)、23~29）を含む。プラスミドp33-csFFTのサイズはおよそ14kbである。プラスミドp33-csSSTを、実施例3に記載のとおり、アグロバクテリウムが仲介する遺伝子移入によってジャガイモ（植物）中に導入した。前記ジャガイモ（植物）をチョウセンアザミ由来SST（ドイツ特許出願DE-A119708774参照）をコードするDNA配列で形質転換し、ジャガイモは35Sプロモーターの制御下でこれらの配列を発現した。完全な植物が形質転換細胞から再生された。このベクターシステムで形質転換した一連の植物の葉を解析することにより、高分子イヌリンの発生が明らかに証明され、これはp33-csFFTに含まれるチョウセンアザミ由来FFT遺伝子の発現によるものであった（図5参照）。

## 【図面の簡単な説明】

10

【図1】全プロトプラスト抽出物のHPLC解析を示す図である。プロトプラストを様々なベクターで形質転換した：A : CaMV 35Sプロモーターと融合したコード領域を含まないベクターpA7を用いて形質転換を実施した。B : CaMV 35Sプロモーターと融合したチョウセンアザミ由来フルクタン：フルクタン-フルクトシルトランスフェラーゼのコード領域を含むベクターpA7-csFFTを用いて形質転換を起こした。C : CaMV 35Sプロモーターとの融合体としてのキクイモ由来フルクタン：フルクタン-フルクトシルトランスフェラーゼのコード領域を含むベクターpA7-htFFTを用いて形質転換を実施した。解析前に、全プロトプラスト抽出物をフルクトシルオリゴマー混合物中でそれぞれ12時間インキュベートした。解析を実施例1に記載のとおりに実施した。

## 【図2】プラスミドp35-csFFTの構造を示す図である。

20

【図3】構築物p35-csFFTにより形質転換されたトランジェニック植物のHPLC解析を示す図である。解析により、チョウセンアザミ由来のSSTならびにFFTを発現するトランジェニック植物（35S-SST/FFT 22/19）において長鎖イヌリン分子が生成されたことが示されている。

## 【図4】プラスミドp33-csFFTの構造を示す図である。

【図5】構築物p33-csFFTにより形質転換されたトランジェニック植物のHPLC解析を示す図である。解析により、チョウセンアザミ由来のSSTならびにFFTを発現するトランジェニック植物（B33-SST/FFT 47）において長鎖イヌリン分子が生成されたことが示されている。

## 【配列表】

30

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION:

## (i) APPLICANT:

- (A) NAME: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, e.V.
- (B) STREET: none
- (C) CITY: Berlin
- (D) STATE: none
- (E) COUNTRY: Germany
- (F) POSTAL CODE: none

(ii) TITLE OF THE INVENTION: Nucleic acid molecules which encode proteins having fructosyl transferase activity and methods for producing long-chain inulin

10

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

## (iv) COMPUTER-READABLE VERSION:

- (A) DATA CARRIER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2073 base pairs
- (B) TYPE: nucleotide
- (C) STRANDEDNESS: single stranded
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) POSITION: 21..1872

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

30

TTACCTCATT TCCATCAACC ATG AGA ACG ACT GAA CCC CAA ACT GAC CTT  
 Met Arg Thr Thr Glu Pro Gln Thr Asp Leu  
 1 5 10

50

GAG CAT GCA CCC AAC CAC ACT CCA CTA CTG GAC CAC CCC GAA CCA CCA  
 Glu His Ala Pro Asn His Thr Pro Leu Leu Asp His Pro Glu Pro Pro  
 15 20 25

98

CCG GCC GCC GTG AGA AAC CGG TTG TTG ATT AGG GTT TCG TCC AGT ATC Pro Ala Ala Val Arg Asn Arg Leu Leu Ile Arg Val Ser Ser Ser Ile 30 35 40	146
ACA TTG GTC TCT CTG TTT TTT GTT TCA GCA TTC CTA CTC ATT CTC CTG Thr Leu Val Ser Leu Phe Phe Val Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu Leu 45 50 55	194
TAC CAA CAC GAT TCC ACT TAC ACC GAT GAT AAT TCA GCA CCG TCG GAA Tyr Gln His Asp Ser Thr Tyr Thr Asp Asp Asn Ser Ala Pro Ser Glu 60 65 70	242
AGT TCT TCC CAG CAG CCC TCC GCT GCC GAT CGC CTG AGA TGG GAG AGA Ser Ser Ser Gln Gln Pro Ser Ala Ala Asp Arg Leu Arg Trp Glu Arg 75 80 85 90	290
ACA GCT TTT CAT TTC CAG CCC GCC AAA AAT TTC ATT TAT GAT CCC AAC Thr Ala Phe His Gln Pro Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Asp Pro Asn 95 100 105	338
GGT CCA TTG TTC CAT ATG GGT TGG TAC CAT CTT TTC TAC CAA TAC AAC Gly Pro Leu Phe His Met Gly Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn 110 115 120	386
CCG TAC GCA CCG TTT TGG GGC AAC ATG ACA TGG GGT CAC GCC GTG TCC Pro Tyr Ala Pro Phe Trp Gly Asn Met Thr Trp Gly His Ala Val Ser 125 130 135	434
AAA GAC ATG ATC AAC TGG TTC GAG CTT CCG ATC GCC TTG GCC CCA ACC Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe Glu Leu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Thr 140 145 150	482
GAA TGG TAC GAT ATC GAG GGT GTT TTA TCA GGC TCA ACC ACG ATC CTC Glu Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ile Leu 155 160 165 170	530
CCT GAT GGT CGA ATC TTT GCT CTC TAT ACC GGA AAC ACA AAC GAT CTC Pro Asp Gly Arg Ile Phe Ala Leu Tyr Thr Gly Asn Thr Asn Asp Leu 175 180 185	578
GAG CAA CTT CAA TGC AAA GCC GTG CCA GTT AAT GCA TCC GAC CCA CTT Glu Gln Leu Gln Cys Lys Ala Val Pro Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu 190 195 200	626
CTT GTT GAA TGG GTC AGG TAC GAT GCT AAC CCG ATC CTG TAT GCT CCA Leu Val Glu Trp Val Arg Tyr Asp Ala Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Pro 205 210 215	674
TCA GGG ATC GGG TTA ACA GAT TAC CGG GAC CCG TCA ACA GTT TGG ACG Ser Gly Ile Gly Leu Thr Asp Tyr Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr 220 225 230	722
GGT CCC GAT GGA AAA CAT CGG ATG ATC ATA GGG ACT AAA CGA AAT ACT Gly Pro Asp Gly Lys His Arg Met Ile Ile Gly Thr Lys Arg Asn Thr 235 240 245 250	770

10

20

30

ACA GGA CTC GTA CTT GTA TAC CAT ACC ACC GAT TTC ACA AAC TAC GTA Thr Gly Leu Val Leu Val Tyr His Thr Thr Asp Phe Thr Asn Tyr Val 255 260 265	818
ATG TTG GAC GAG CCG TTG CAC TCG GTC CCC AAC ACT GAT ATG TGG GAA Met Leu Asp Glu Pro Leu His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu 270 275 280	866
TGT GTC GAC CTT TAC CCT GTG TCA ACG ACC AAC GAT AGT GCA CTT GAT Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp 285 290 295	914
GTT GCG GCC TAT GGT CCG GGT ATC AAG CAT GTG CTT AAA GAA AGT TGG Val Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp 300 305 310	962
GAG GGA CAC GCG ATG GAC TTT TAC TCG ATC GGG ACA TAC GAT GCA TTT Glu Gly His Ala Met Asp Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe 315 320 325 330	1010
AAC GAT AAG TGG ACA CCC GAT AAT CCC GAA CTA GAC GTC GGT ATC GGG Asn Asp Lys Trp Thr Pro Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly 335 340 345	1058
TTG CGG TGC GAT TAC GGA AGG TTC TTT GCG TCG AAG AGC CTC TAC GAC Leu Arg Cys Asp Tyr Gly Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp 350 355 360	1106
CCG TTG AAG AAA CGA AGA GTC ACT TGG GGT TAT GTT GCG GAA TCC GAC Pro Leu Lys Lys Arg Arg Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp 365 370 375	1154
ACT TAC GAC CAA GAC GTC TCT AGA GGA TGG GCT ACT ATT TAT AAT GTT Ser Tyr Asp Gln Asp Val Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val 380 385 390	1202
GCA AGG ACC ATT GTA CTC GAT CCG AAG ACT GGA ACC CAT CTA CTT CAA Ala Arg Thr Ile Val Leu Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln 395 400 405 410	1250
TGG CCG GTG GAG GAA ATC GAG AGC TTG AGA TCC AAC GGT CAT GAA TTC Trp Pro Val Glu Glu Ile Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe 415 420 425	1298
AAA AAT ATA ACA CTT GAG CCG GGC TCG ATC ATT CCC CTC GAC GTA GGC Lys Asn Ile Thr Leu Glu Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly 430 435 440	1346
TCA GCT ACG CAG TTG GAC ATC GTT GCA ACA TTT GAG GTG GAT CAA GAG Ser Ala Thr Gln Leu Asp Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu 445 450 455	1394
GCG TTA AAA GCA ACA AGT GAC ACG AAC GAC GAA TAC GGT TGC ACC ACA Ala Leu Lys Ala Thr Ser Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr 460 465 470	1442

10

20

30

AGT TCG GGT GCA GCC AAA GGG GAA GTT TTG GAC CAT TCG GGG ATT GCA Ser Ser Gly Ala Ala Lys Gly Glu Val Leu Asp His Ser Gly Ile Ala 475 480 485 490	1490
GTT CTT GCC CAC GGA ACC CTT TCG GAG TTA ACT CCG GTG TAT TTC TAC Val Leu Ala His Gly Thr Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr 495 500 505	1538
ATT GCT AAA AAC ACC AAG GGA GGT GTG GAT ACA CAT TTT TGT ACG GAT Ile Ala Lys Asn Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr His Phe Cys Thr Asp 510 515 520	1586
AAA CTA AGG TCA TCA TAT GAT TAT GAT GGT GAG AAG GTG GTG TAT GGC Lys Leu Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly 525, 530 535	1634
AGC ACC GTC CCA GTG CTC GAC GGC GAA GAA TTC ACA ATG AGG ATA TTG Ser Thr Val Pro Val Leu Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu 540 545 550	1682
G TG GAT CAT TCG GTG GTG GAG GGG TTT GCA CAA GGG GGA AGG ACA GTA Val Asp His Ser Val Val Glu Gly Phe Ala Gln Gly Arg Thr Val 555 560 565 570	1730
ATA ACG TCA AGA GTG TAT CCC ACG AAA GCA ATA TAC GAA GCA GCC AAG Ile Thr Ser Arg Val Tyr Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys 575 580 585	1778
CTT TTC GTC TTC AAC AAT GCC ACT ACG ACC AGT GTG AAG GCG ACT CTC Leu Phe Val Phe Asn Asn Ala Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu 590 595 600	1826
AAG GTC TGG CAA ATG TCT CAA GCC TTT GTC AAG GCT TAT CCG TTT T Lys Val Trp Gln Met Ser Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe 605 610 615	1872
AGTTTTTTAT GCATTTTT AAGACATTGT TGTTCATAT GATTCAAGTT TTATCTGTGT	1932
GTTATGTTAA GACACCGCAGC TTAAAAATAGC CACATGTGAG ATCATTGCG TATGCCGTC	1992
AACTATTTTT TAATATGC A CTTCAAGTAAT GCTATTTACA GTATGTTTA AGGAAAAAAA	2052
AAAAAAAAA AAAAAAAA A	2073

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 617 amino acids
  - (B) TYPE: amino acid
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Thr Thr Glu Pro Gln Thr Asp Leu Glu His Ala Pro Asn His  
 1 5 10 15

Thr Pro Leu Leu Asp His Pro Glu Pro Pro Ala Ala Val Arg Asn  
 20 25 30

Arg Leu Leu Ile Arg Val Ser Ser Ser Ile Thr Leu Val Ser Leu Phe  
 35 40 45

Phe Val Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu Tyr Gln His Asp Ser Thr  
 50 55 60

Tyr Thr Asp Asp Asn Ser Ala Pro Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gln Pro  
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Asp Arg Leu Arg Trp Glu Arg Thr Ala Phe His Phe Gln  
 85 90 95

Pro Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Asp Pro Asn Gly Pro Leu Phe His Met  
 100 105 110

Gly Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Tyr Ala Pro Phe Trp  
 115 120 125

Gly Asn Met Thr Trp Gly His Ala Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp  
 130 135 140

Phe Glu Leu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Thr Glu Trp Tyr Asp Ile Glu  
 145 150 155 160

Gly Val Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ile Leu Pro Asp Gly Arg Ile Phe  
 165 170 175

Ala Leu Tyr Thr Gly Asn Thr Asn Asp Leu Glu Gln Leu Gln Cys Lys  
 180 185 190

Ala Val Pro Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Leu Val Glu Trp Val Arg  
 195 200 205

Tyr Asp Ala Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Pro Ser Gly Ile Gly Leu Thr  
 210 215 220

Asp Tyr Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr Gly Pro Asp Gly Lys His  
 225 230 235 240

Arg Met Ile Ile Gly Thr Lys Arg Asn Thr Thr Gly Leu Val Leu Val  
 245 250 255

Tyr His Thr Thr Asp Phe Thr Asn Tyr Val Met Leu Asp Glu Pro Leu  
 260 265 270

His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro  
 275 280 285

Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp Val Ala Ala Tyr Gly Pro  
 290 295 300

Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp Glu Gly His Ala Met Asp  
 305 310 315 320

Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe Asn Asp Lys Trp Thr Pro  
 325 330 335

Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Cys Asp Tyr Gly  
 340 345 350

Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp Pro Leu Lys Lys Arg Arg  
 355 360 365

Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp Ser Tyr Asp Gln Asp Val  
 370 375 380

Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val Ala Arg Thr Ile Val Leu  
 385 390 395 400

Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln Trp Pro Val Glu Ile  
 405 410 415

Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe Lys Asn Ile Thr Leu Glu  
 420 425 430

Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly Ser Ala Thr Gln Leu Asp  
 435 440 445

Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu Ala Leu Lys Ala Thr Ser  
 450 455 460

Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ala Ala Lys  
 465 470 475 480

Gly Glu Val Leu Asp His Ser Gly Ile Ala Val Leu Ala His Gly Thr  
 485 490 495

Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asn Thr Lys  
 500 505 510

Gly Gly Val Asp Thr His Phe Cys Thr Asp Lys Leu Arg Ser Ser Tyr  
 515 520 525

Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly Ser Thr Val Pro Val Leu  
 530 535 540

Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu Val Asp His Ser Val Val  
 545 550 555 560

Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val Ile Thr Ser Arg Val Tyr  
 565 570 575

Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys Leu Phe Val Phe Asn Asn  
 580 585 590

Ala Thr Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu Lys Val Trp Gln Met Ser  
 595 600 605

Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe  
610 615

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 2073 base pairs
  - (B) TYPE: nucleotide
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: genomic DNA

(iii) HYPOTHETICAL: YES

10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) POSITION: 21..1872

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

TTACCTCATT TCCATCAACC ATG AGA ACG ACT GAA CCC CAA ACT GAC CTT 50  
Met Arg Thr Thr Glu Pro Gln Thr Asp Leu  
620 625

GAG CAT GCA CCC AAC CAC ACT CCA CTA CTG GAC CAC CCC GAA CCA CCA 98  
Glu His Ala Pro Asn His Thr Pro Leu Leu Asp His Pro Glu Pro Pro  
630 635 640

20

CCG GCC GCC GTG AGA AAC CGG TTG TTG ATT AGG GTT TCG TCC AGT ATC 146  
Pro Ala Ala Val Arg Asn Arg Leu Leu Ile Arg Val Ser Ser Ser Ile  
645 650 655

ACA TTG GTC TCT CTG TTT GTT TCA GCA TTC CTA CTC ATT CTC CTG 194  
Thr Leu Val Ser Leu Phe Val Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu Leu  
660 665 670 675

TAC CAA CAC GAT TCC ACT TAC ACC GAT GAT AAT TCA GCA CCG TCG GAA 242  
Tyr Gln His Asp Ser Thr Tyr Thr Asp Asp Asn Ser Ala Pro Ser Glu  
680 685 690

AGT TCT TCC CAG CAG CCC TCC GCT GCC GAT CGC CTG AGA TGG GAG AGA 290  
Ser Ser Ser Gln Gln Pro Ser Ala Ala Asp Arg Leu Arg Trp Glu Arg  
695 700 705

30

ACA GCT TTT CAT TTC CAG CCC AAA AAT TTC ATT TAT GAT CCC AAC 338  
Thr Ala Phe His Phe Gln Pro Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Asp Pro Asn  
710 715 720

GGT CCA TTG TTC CAT ATG GGT TGG TAC CAT CTT TTC TAC CAA TAC AAC 386  
Gly Pro Leu Phe His Met Gly Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn  
725 730 735

CCG TAC GCT CCC TTT TGG GGA AAC ATG ACT TGG GGA CAT GCC GTC AGT Pro Tyr Ala Pro Phe Trp Gly Asn Met Thr Trp Gly His Ala Val Ser 740 745 750 755	434
AAG GAT ATG ATA AAT TGG TTT GAA TTA CCG ATA GCC TTA GCG CCA ACT Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe Glu Leu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Thr 760 765 770	482
GAG TGG TAC GAC ATA GAA GGT GTT CTG AGT GGC AGT ACT ACC ATT TTA Glu Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ile Leu 775 780 785	530
CCT GAC GGA AGA ATT TTC GCT CTC TAC ACC GGA AAT ACA AAC GAC CTC Pro Asp Gly Arg Ile Phe Ala Leu Tyr Thr Gly Asn Thr Asn Asp Leu 790, 795 800	578
GAG CAG CTC CAG TGT AAG GCC GTG CCA GTT AAT GCT AGT GAT CCA TTA Glu Gln Leu Gln Cys Lys Ala Val Pro Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu 805 810 815	626
TTG GTA GAA TGG GTT CGC TAC GAT CCC AAT CCG ATA TTA TAT GCC CCT Leu Val Glu Trp Val Arg Tyr Asp Ala Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Pro 820 825 830 835	674
AGT GGC ATC GGC CTC ACA GAT TAC AGA GAT CCT AGT ACT GTG TGG ACG Ser Gly Ile Gly Leu Thr Asp Tyr Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr 840 845 850	722
GGC CCT GAC GGT AAA CAC CGT ATG ATA ATC GGG ACG AAG AGG AAT ACG Gly Pro Asp Gly Lys His Arg Met Ile Ile Gly Thr Lys Arg Asn Thr 855 860 865	770
ACT GGA CTC GTC TTA GTA TAT CAC ACT ACC GAC TTT ACA AAT TAT GTA Thr Gly Leu Val Leu Val Tyr His Thr Thr Asp Phe Thr Asn Tyr Val 870 875 880	818
ATG TTG GAC GAG CCG TTG CAC TCG GTC CCC AAC ACT GAT ATG TGG GAA Met Leu Asp Glu Pro Leu His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu 885 890 895	866
TGT GTC GAC CTT TAC CCT GTG TCA ACG ACC AAC GAT AGT GCA CTT GAT Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp 900 905 910 915	914
GTT GCG GCC TAT GGT CCG GGT ATC AAG CAT GTG CTT AAA GAA ACT TGG Val Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp 920 925 930	962
GAG GGA CAC GCG ATG GAC TTT TAC TCG ATC GGG ACA TAC GAT GCA TTT Glu Gly His Ala Met Asp Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe 935 940 945	1010
AAC GAT AAG TGG ACA CCC GAT AAT CCC GAA CTA GAC GTC GGT ATC GGG Asn Asp Lys Trp Thr Pro Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly 950 955 960	1058

TTG CGG TGC GAT TAC GGA AGG TTC TTT GCG TCG AAG AGC CTC TAC GAC Leu Arg Cys Asp Tyr Gly Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp 965 970 975	1106
CCG TTG AAG AAA CGA AGA GTC ACT TGG GGT TAT GTT GCG GAA TCC GAC Pro Leu Lys Lys Arg Arg Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp 980 985 990 995	1154
AGT TAC GAC CAA GAC GTC TCT AGA GGA TGG GCT ACT ATT TAT AAT GTT Ser Tyr Asp Gln Asp Val Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val 1000 1005 1010	1202
GCA AGG ACC ATT GTA CTC GAT CGG AAG ACT GGA ACC CAT CTA CTT CAA Ala Arg Thr Ile Val Leu Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln 1015 1020 1025	1250
TGG CCG GTG GAG GAA ATC GAG AGC TTG AGA TCC AAC GGT CAT GAA TTC Trp Pro Val Glu Glu Ile Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe 1030 1035 1040	1298
AAA AAT ATA ACA CTT GAG CCG GGC TCG ATC ATT CCC CTC GAC GTA GGC Lys Asn Ile Thr Leu Glu Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly 1045 1050 1055	1346
TCA GCT ACG CAG TTG GAC ATC GTT GCA ACA TTT GAG GTG GAT CAA GAG Ser Ala Thr Gln Leu Asp Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu 1060 1065 1070 1075	1394
GCG TTA AAA GCA ACA AGT GAC ACG AAC GAC GAA TAC GGT TGC ACC ACA Ala Leu Lys Ala Thr Ser Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr 1080 1085 1090	1442
AGT TCG GGT GCA GCC AAA GGG GAA GTT TTG GAC CAT TCG GGG ATT GCA Ser Ser Gly Ala Ala Lys Gly Glu Val Leu Asp His Ser Gly Ile Ala 1095 1100 1105	1490
GTT CTT GCC CAC GGA ACC CTT TCG GAG TTA ACT CCG GTG TAT TTC TAC Val Leu Ala His Gly Thr Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr 1110 1115 1120	1538
ATT GCT AAA AAC ACC AAG GGA GGT GTG GAT ACA CAT TTT TGT ACG GAT Ile Ala Lys Asn Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr His Phe Cys Thr Asp 1125 1130 1135	1586
AAA CTA AGG TCA TCA TAT GAT TAT GAT GGT GAG AAG GTG GTG TAT GGC Lys Leu Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly 1140 1145 1150 1155	1634
AGC ACC GTC CCA GTG CTC GAC GGC GAA GAA TTC ACA ATG AGG ATA TTG Ser Thr Val Pro Val Leu Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu 1160 1165 1170	1682
GTG GAT CAT TCG GTG GTG GAG GGG TTT GCA CAA GGG GGA AGG ACA GTA Val Asp His Ser Val Val Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val 1175 1180 1185	1730

10

20

30

ATA ACG TCA AGA GTG TAT CCC ACG AAA GCA ATA TAC GAA GCA GCC AAG Ile Thr Ser Arg Val Tyr Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys 1190 1195 1200	1778
CTT TTC GTC TTC AAC AAT GCC ACT ACG ACC AGT GTG AAG GCG ACT CTC Leu Phe Val Phe Asn Asn Ala Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu 1205 1210 1215	1826
AAG GTC TGG CAA ATG TCT CAA GCC TTT GTC AAG GCT TAT CCG TTT T Lys Val Trp Gln Met Ser Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe 1220 1225 1230	1872
AGTTTTTTAT GCATCTTTT AAGACATTGT TGTTTCATAT GATTCAAGTT TTATCTGTGT	1932
GTTATGTTAA GACACGCAGC TTAAAATAGC CACATGTGAG ATCATTTGCG TATGGCCGTC	1992
AACTATTTTT TAATATGCAA CTTCAGTAAT GCTATTACA GTATGTTTA AGGAAAAAAA	2052
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	2073

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 617 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

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

10

20

30

Gly Asn Met Thr Trp Gly His Ala Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp  
 130                    135                    140

Phe Glu Leu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Thr Glu Trp Tyr Asp Ile Glu  
 145                    150                    155                    160

Gly Val Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ile Leu Pro Asp Gly Arg Ile Phe  
 165                    170                    175

Ala Leu Tyr Thr Gly Asn Thr Asn Asp Leu Glu Gln Leu Gln Cys Lys  
 180                    185                    190

Ala Val Pro Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Leu Val Glu Trp Val Arg  
 195                    200                    205

Tyr Asp Ala, Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Pro Ser Gly Ile Gly Leu Thr  
 210                    215                    220

Asp Tyr Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr Gly Pro Asp Gly Lys His  
 225                    230                    235                    240

Arg Met Ile Ile Gly Thr Lys Arg Asn Thr Thr Gly Leu Val Leu Val  
 245                    250                    255

Tyr His Thr Thr Asp Phe Thr Asn Tyr Val Met Leu Asp Glu Pro Leu  
 260                    265                    270

His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro  
 275                    280                    285

Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp Val Ala Ala Tyr Gly Pro  
 290                    295                    300

Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp Glu Gly His Ala Met Asp  
 305                    310                    315                    320

Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe Asn Asp Lys Trp Thr Pro  
 325                    330                    335

Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Cys Asp Tyr Gly  
 340                    345                    350

Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp Pro Leu Lys Lys Arg Arg  
 355                    360                    365

Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp Ser Tyr Asp Gln Asp Val  
 370                    375                    380

Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val Ala Arg Thr Ile Val Leu  
 385                    390                    395                    400

Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln Trp Pro Val Glu Glu Ile  
 405                    410                    415

Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe Lys Asn Ile Thr Leu Glu  
 420                    425                    430

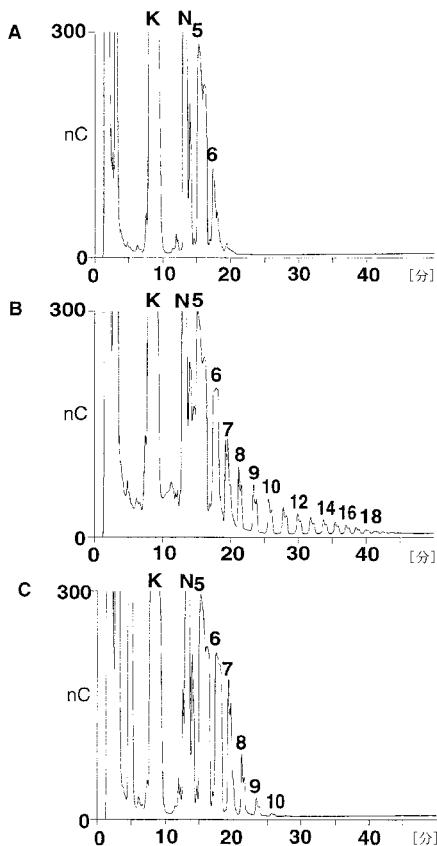
10

20

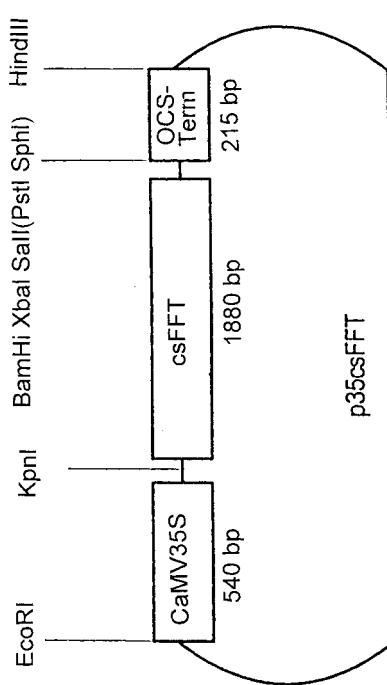
30

Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly Ser Ala Thr Gln Leu Asp  
 435 440 445  
 Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu Ala Leu Lys Ala Thr Ser  
 450 455 460  
 Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ala Ala Lys  
 465 470 475 480  
 Gly Glu Val Leu Asp His Ser Gly Ile Ala Val Leu Ala His Gly Thr  
 485 490 495  
 Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asn Thr Lys  
 500 505 510  
 Gly Gly Val, Asp Thr His Phe Cys Thr Asp Lys Leu Arg Ser Ser Tyr  
 515 520 525  
 Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly Ser Thr Val Pro Val Leu  
 530 535 540  
 Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu Val Asp His Ser Val Val  
 545 550 555 560  
 Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val Ile Thr Ser Arg Val Tyr  
 565 570 575  
 Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys Leu Phe Val Phe Asn Asn  
 580 585 590  
 Ala Thr Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu Lys Val Trp Gln Met Ser  
 595 600 605  
 Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe  
 610 615

【図1】



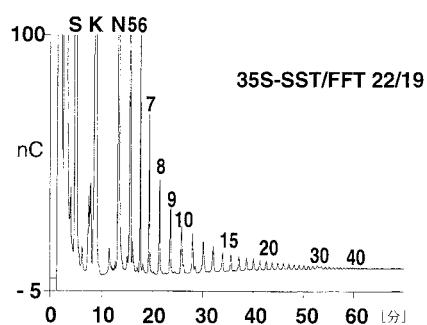
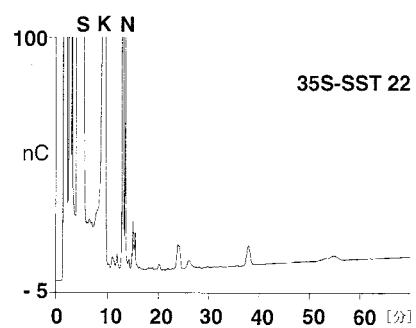
【図2】



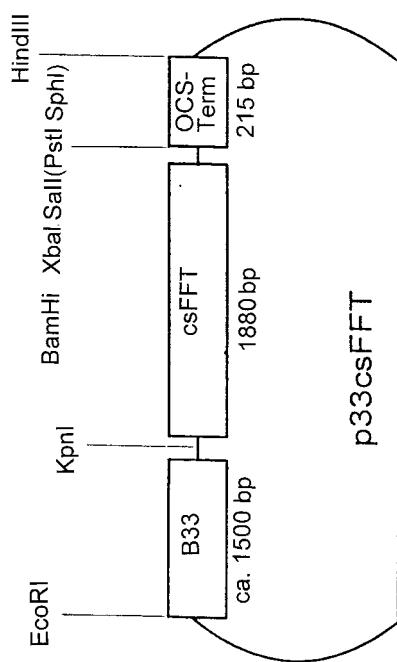
10

20

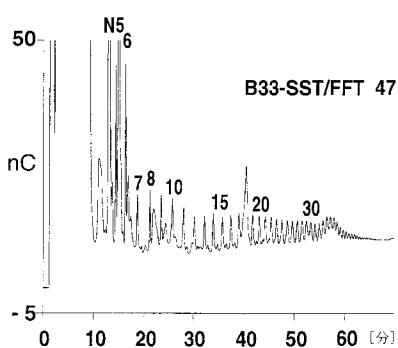
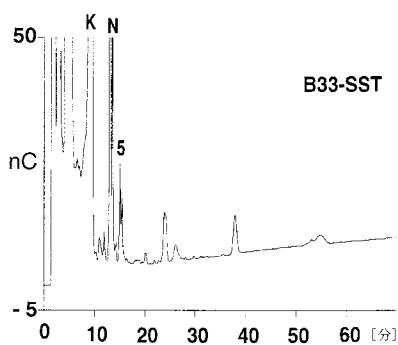
【図3】



【図4】



【図5】



---

フロントページの続き

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第96/021023(WO,A1)  
生化学事典, 1990年, 第2版、第2刷, 第136頁

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

A01H 5/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)