

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5405321号
(P5405321)

(45) 発行日 平成26年2月5日 (2014.2.5)

(24) 登録日 平成25年11月8日 (2013.11.8)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 3
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00 A

請求項の数 23 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-549415 (P2009-549415)	(73) 特許権者	507203353
(86) (22) 出願日	平成20年2月13日 (2008.2.13)		バイエル・クロップサイエンス・アーゲー
(65) 公表番号	特表2010-517588 (P2010-517588A)		BAYER CROPSCIENCE A
(43) 公表日	平成22年5月27日 (2010.5.27)		G
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/051760		ドイツ国、40789・モンハイム、アル
(87) 国際公開番号	W02008/098975		フレートーノベルーシュトラッセ・50
(87) 国際公開日	平成20年8月21日 (2008.8.21)	(74) 代理人	100078662
審査請求日	平成23年2月8日 (2011.2.8)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	07090022.0	(74) 代理人	100113653
(32) 優先日	平成19年2月14日 (2007.2.14)		弁理士 東田 幸四郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100116919
(31) 優先権主張番号	60/901,532		弁理士 齋藤 房幸
(32) 優先日	平成19年2月15日 (2007.2.15)	(72) 発明者	フローベルク, クラウス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ドイツ国、14532 クラインマッハナ ウ、ビルツヴァルト 17

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 切断型アルテルナンスクラーズをコードする核酸分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルテルナンスクラーズの酵素活性を有するタンパク質をコードする核酸分子であって、

- a) 配列番号 1 または配列番号 3 に示される核酸配列の 1 1 8 位のヌクレオチドから 4 1 4 0 位のヌクレオチドまでの配列から成る核酸分子、
- b) 配列番号 2 の 4 0 位のアミノ酸から 1 3 8 0 位のアミノ酸までの配列と、少なくとも 9 8 % 同一のアミノ酸配列から成るタンパク質をコードする核酸分子、
- c) 配列番号 1 または配列番号 3 に示される核酸配列の 1 1 8 位のヌクレオチドから 3 9 4 5 位のヌクレオチドまでの配列から成る核酸分子、
- d) 配列番号 2 の 4 0 位のアミノ酸から 1 3 1 5 位のアミノ酸を含むまでの配列と、少なくとも 9 8 % 同一のアミノ酸配列から成るタンパク質をコードする核酸分子、
- e) 配列番号 1 または配列番号 3 に示される核酸配列の 1 1 8 位のヌクレオチドから 4 5 1 8 位のヌクレオチドまでの配列から成る核酸分子、
- f) 配列番号 2 の 4 0 位のアミノ酸から 1 5 0 6 位のアミノ酸までの配列と、少なくとも 9 8 % 同一のアミノ酸配列から成るタンパク質をコードする核酸分子、
- g) a)、c) または e) の配列と、少なくとも 9 8 % 同一の配列から成る核酸分子であって、該配列が、a)、c) または e) の配列と同数のヌクレオチドを有する核酸分子、
- h) 核酸配列が、遺伝コードの縮重の結果として、a)、b)、c)、d)、e)、f) または g) の核酸分子の配列から逸脱した核酸分子、

i) 核酸配列が、a)、b)、c)、d)、e)、f)、g) または h) の核酸分子の一つの完全長配列に相補的な核酸分子であって、該相補的な配列が、a)、b)、c)、d)、e)、f)、g) または h) の核酸分子と同数のヌクレオチドを有する核酸分子より選択される核酸分子。

【請求項 2】

5' 末端に核酸トリプレット A T G を結合させ、3' 末端に T A A、T A G および T G A より選択される核酸トリプレットを結合させた、請求項 1 記載の核酸分子。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 4】

プラスミドである、請求項 3 記載のベクター。

【請求項 5】

請求項 1 もしくは 2 記載の核酸分子、請求項 3 記載のベクター、または請求項 4 記載のプラスミドでトランスフォーメーションされた宿主細胞。

【請求項 6】

微生物の細胞である、請求項 5 記載の宿主細胞。

【請求項 7】

E. coli 細胞である、請求項 6 記載の宿主細胞。

【請求項 8】

植物細胞である、請求項 5 記載の宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 8 記載の植物細胞を含む植物。

【請求項 10】

糖またはデンプン貯蔵植物である、請求項 9 記載の植物。

【請求項 11】

ジャガイモ、トウモロコシ、サトウダイコン、サトウモロコシまたはサトウキビである、請求項 9 または 10 記載の植物。

【請求項 12】

請求項 8 記載の植物細胞を含む、請求項 9～11 のいずれか記載の植物の繁殖材料。

【請求項 13】

請求項 8 記載の植物細胞を含む、請求項 9～11 のいずれか記載の植物から得られた回収可能な植物の部分。

【請求項 14】

以下の工程：

a) 請求項 1 もしくは 2 記載の核酸分子または請求項 3 もしくは 4 記載のベクターを、植物細胞に導入する工程、

b) 工程 a) で得られた植物細胞から植物を再生する工程、および

c) 適切であれば、工程 b) で得られた植物を採用して、さらなる植物を作製する工程を含む、請求項 9～11 のいずれか記載の植物を作製する方法。

【請求項 15】

アルテルナンスクラーゼの酵素活性を有するタンパク質であって、

a) 配列番号 2 の 1 位のアミノ酸から 350 位のアミノ酸までの領域で開始し、配列番号 2 の 1295 位のアミノ酸から 1345 位のアミノ酸までの領域で終結するアミノ酸配列から成るタンパク質、

b) 配列番号 2 の 1 位のアミノ酸から 350 位のアミノ酸までの領域で開始し、配列番号 2 の 1355 位のアミノ酸から 1420 位のアミノ酸までの領域で終結するアミノ酸配列から成るタンパク質、

c) 配列番号 2 の 1 位のアミノ酸から 350 位のアミノ酸までの領域で開始し、配列番号 2 の 1430 位のアミノ酸から 1520 位のアミノ酸までの領域で終結するアミノ酸配列から成るタンパク質、または

10

20

30

40

50

d) a)、b) もしくは c) からのアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列から成るタンパク質より選択されるタンパク質。

【請求項 16】

N末端にメチオニンを結合させた、請求項 15 記載のタンパク質。

【請求項 17】

1) a) 配列が、請求項 15 もしくは 16 記載のタンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸分子であって、配列番号 1 もしくは 3 に示される配列を有する核酸分子から得ることができる核酸分子、または

b) a) に記載された核酸分子を含むベクターもしくはプラスミドで宿主細胞をトランスフォーメーションし、

2) 該宿主細胞を培地中で培養し、そして

3) 培養された該細胞および／または該培地から該タンパク質を単離する、請求項 15 または 16 記載のアルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質を製造する方法。

【請求項 18】

1) a) 配列が、請求項 15 もしくは 16 記載のタンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸分子であって、配列番号 1 もしくは 3 に示される配列を有する核酸分子から得ることができる核酸分子、または

b) a) に記載された核酸分子を含むベクターもしくはプラスミドで植物細胞をトランスフォーメーションし、

2) 工程 1) で得られた該植物細胞から植物を再生し、

3) 該タンパク質が、該植物に発現され、続いて抽出および単離される、請求項 15 または 16 記載のアルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質を製造する方法。

【請求項 19】

アルテルナンを製造する方法であって、

1) スクロースを含む溶液を、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質と接触させ、そして

2) 該溶液からアルテルナンを単離し、

ここで、該タンパク質が、

a) 配列番号 2 の 1 位のアミノ酸から 350 位のアミノ酸までの領域で開始し、配列番号 2 の 1295 位のアミノ酸から 1520 位のアミノ酸までの領域で終結するアミノ酸配列から成るか、または

b) a) のアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一のアミノ酸配列から成る方法。

【請求項 20】

タンパク質が、その N末端に結合したメチオニンを有する、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

スクロースを含む溶液が、水の重量に基づき少なくとも 15% のスクロース濃度を有する水溶液である、請求項 19 または 20 のいずれか記載の方法。

【請求項 22】

方法の工程 1) が、35～45℃の温度で実施される、請求項 19～21 のいずれか記載の方法。

【請求項 23】

請求項 9～11 のいずれか記載の植物の、請求項 8 記載の植物細胞から、請求項 12 記載の繁殖材料から、または請求項 13 記載の回収可能な植物の部分から、アルテルナンを抽出および単離する工程を含む、アルテルナンを製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、切断型アルテルナンスクララーゼをコードする核酸分子に関する。本発明は、さらに、切断型アルテルナンスクララーゼ、ベクター、前記核酸分子でトランスフォーメーションされた宿主細胞および植物細胞、ならびにこれらの細胞を含む植物に関する。本発明は、そのうえ、好都合な性質を有する新規なアルテルナシオリマーおよびそれらの製造方法に関する。

【0002】

アルテルナンは、グルコースユニットから構成される多糖である。これらのグルコースユニットは、 α -1, 3および α -1, 6-グリコシド結合を経由して相互に連結しており、これら2種類の結合は主として交互である(Miasaki et al., Carbo. Res., 84:273-285 (1980))。その上、アルテルナンは、分岐を含むことがある(Seymour et al., Carbohydrate Research 74, (1979); 41-62)。ネイティブなアルテルナンは、 $10^6 \sim 10^7$ という平均分子量Mwが(国際公開公報第03/010177号)を有する。

10

【0003】

その物理化学的性質がもとで、製薬工業における、例えば医薬中の活性成分のための賦形剤としてだけでなく、繊維工業、化粧品工業および食品工業における添加剤としてのアルテルナシオリマーの可能性のある用途もまた論じられている(Lopez-Munguia et al., Enzyme Microb. Technol. 15, (1993), 77-85; Leathers et al., Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 18, (1997), 278-283)。別の潜在的用途は、アラビアゴム代用物としてである(Cote, Carbohydrate Polymers 19, (1992), 249-252)。

20

【0004】

アルテルナンは、アルテルナンスクララーゼの生物学的活性を有する酵素を用いて酵素的に製造することができる。アルテルナンスクララーゼは、スクロースから出発してグルカンおよびフルクトースの形成を触媒することができるグルコシルトランスフェラーゼの群に属す。天然の株は、通例、アルテルナンに加えてデキストランも生成するものである。天然の株からアルテルナンスクララーゼを製造することは不利である。それは、複雑な精製手順を行おうと試みても、この酵素を純粋な形態で得ることが可能ではなかったからである。それは、例えば、国際公開公報第00/4772号の緒言の概要を参照されたい。

【0005】

代替経路を経由して超高純度のアルテルナンスクララーゼを提供する多数の試みが過去になされた。

30

【0006】

国際公開公報第00/47727号は、アルテルナンスクララーゼをコードする核酸分子を記載している。さらに、国際公開公報第00/47727号は、ベクター、前記核酸分子でトランスフォーメーションされた宿主細胞および植物細胞、ならびにこれらの細胞を含む植物に関する。国際公開公報第00/47727号の核酸分子を採用して、リコンビナントのアルテルナンスクララーゼタンパク質を高純度および/または十分な量で生成する宿主細胞を作製すること、ならびにこれらの酵素の活性を有する遺伝的に改変された植物を作製することが可能であり、それによりアルテルナンが植物体内に形成される。

40

【0007】

特許出願US20060127328A1は、切断型または突然変異型アルテルナンスクララーゼの核酸配列およびベクターおよびトランスフォーメーションされた宿主細胞を記載している。アルテルナンスクララーゼの触媒活性を保持する超高純度の切断型アルテルナンスクララーゼが得られている。さらに、切断型アルテルナンスクララーゼがより良好に発現され、分解速度がより遅いことが主張されている。

【0008】

従来技術に照らして、いっそう良好な性質を有するアルテルナンスクララーゼを提供することが、本発明の目的である。

【0009】

50

特に、植物体内のアルテルナンスクララーゼの効率的な生成を達成するために、植物細胞に特に十分に発現された核酸分子を提供することが、本発明の目的であった。

【0010】

さらなる目的は、トランスジェニック植物に高収率でアルテルナンの生成を引き起こすアルテルナンスクララーゼを提供することであった。

【0011】

さらに、特に好都合な性質を有するアルテルナンを調製することができるアルテルナンスクララーゼを提供することが本発明の目的であった。

【0012】

これらの目的は、本特許請求の範囲に特徴づけられる使用形態を提供することによって達成される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、コムギ胚芽抽出物中のアルテルナンスクララーゼの活性および量を示す。

【図2】図2は、ジャガイモプロトプラスト中のpS13によりコードされるタンパク質（タンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～1315のN末端に一つのメチオニンが付加したものを含む）の活性が、pSM13にコードされるアルテルナンスクララーゼ（タンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～2057のN末端に一つのメチオニンが付加したものを含む）の活性の5～40倍であることを実証する図である。

【図3】図3は、10%マルトースを用いたアクセプター反応から生じる試料の溶出図（RIおよび光散乱（LS）シグナル）を示す（AlSu__truncated＝切断型アルテルナンスクララーゼ、AlSu__complete＝完全長アルテルナンスクララーゼ、AOS＝アルテルナンオリゴ糖）。

【図4】図4は、10%イソマルツロースを用いたアクセプター反応から生じる試料の溶出図（RIおよび光散乱（LS）シグナル）を示す（AlSu__truncated＝切断型アルテルナンスクララーゼ、AlSu__complete＝完全長アルテルナンスクララーゼ、AOS＝アルテルナンオリゴ糖）。

【0014】

したがって、本発明は、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質をコードする核酸分子に関し、ここで、この核酸分子は、

a) 配列番号1または配列番号3に示される核酸配列の118位のヌクレオチドから4140位のヌクレオチドを含むまでの配列を有する核酸分子、

b) アミノ酸配列が、配列番号2の40位のアミノ酸から1380位のアミノ酸を含むまでの配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するタンパク質をコードする核酸分子、

c) 配列番号1または配列番号3に示される核酸配列の118位のヌクレオチドから3945位のヌクレオチドを含むまでの配列を有する核酸分子、

d) アミノ酸配列が、配列番号2の40位のアミノ酸から1315位のアミノ酸を含むまでの配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するタンパク質をコードする核酸分子、

e) 配列番号1または配列番号3に示される核酸配列の118位のヌクレオチドから4518位のヌクレオチドを含むまでの配列を有する核酸分子、

f) アミノ酸配列が、配列番号2の40位のアミノ酸から1506位のアミノ酸を含むまでの配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するタンパク質をコードする核酸分子、

g) 配列が、a)、c)またはe)の配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そ

10

20

30

40

50

して最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有する核酸分子であって、該配列が、a)、c)またはe)の配列と同数のヌクレオチドを有する核酸分子、h)核酸配列が、遺伝コードの縮重の結果として、a)、b)、c)、d)、e)、f)またはg)の核酸分子の配列から逸脱した核酸分子、i)核酸配列が、a)、b)、c)、d)、e)、f)、g)またはh)の核酸分子の一つの完全長配列に相補的な核酸分子であって、この相補的な配列が、a)、b)、c)、d)、e)、f)、g)またはh)の核酸分子と同数のヌクレオチドを有する核酸分子より選択される。

【0015】

本発明は、特に以下の長所を有する：

本発明に記載の核酸分子を採用すると、完全長アルテルナンスクララーゼ（例えば野生型起源のもの）に比べて切断型のアミノ酸配列を有する、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質を調製することが可能である。

【0016】

本発明において、「完全長アルテルナンスクララーゼ」は、配列番号2のアミノ酸40～2057のアミノ酸配列を有するタンパク質を表す。前記定義の完全長アルテルナンスクララーゼは、配列番号2のアミノ酸1～39で示されるシグナルペプチドを欠如するという事実により、文献（例えばUS20060127328A1）に記載されたアルテルナンスクララーゼと異なる。

【0017】

アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質はまた、下記に「切断型アルテルナンスクララーゼ」または「切断型酵素」と呼ばれる。「切断型」という用語は、完全長アルテルナンスクララーゼのアミノ酸配列のNおよび／もしくはC末端、または問題の核酸配列の5'もしくは3'末端での切断を意味する。切断は、制限酵素、タンパク質の場合はタンパク質分解酵素を用いて完全合成により（例えばメリフィールド）、または好ましくは本発明の実施例に記載されているように実施することができる。例えば、請求項1およびその好ましい態様によりコードされる核酸分子は、本発明に記載の切断型アルテルナンスクララーゼを含む。

【0018】

本発明に記載の核酸分子は、好ましくは単離された核酸分子の形態をとる。

【0019】

本発明の切断型アルテルナンスクララーゼは、植物細胞において完全長酵素よりも高い活性を有する。

【0020】

そのうえ、本発明の切断型アルテルナンスクララーゼは、非常に良好に発現される。

【0021】

切断型アルテルナンスクララーゼは、ネイティブな完全長酵素よりも容易に植物の液胞または他の植物細胞区画、例えば色素体もしくはアポプラストなどに導入することができる。このことは、植物体内でのアルテルナン生成に好都合である。それは、植物種に応じて、出発物質のスクロースが液胞に濃縮されているからである。サイトソル以外の区画にポリマー合成酵素を発現させることは、好都合であることが多い。

【0022】

本発明は、さらに、好都合な性質を有するアルテルナンが、上記核酸分子によりコードされる切断型アルテルナンスクララーゼを採用することで得ることができると実証した。

【0023】

切断型アルテルナンスクララーゼ酵素が、アルテルナンオリゴ糖生成における副生成物として、生成するアルテルナンポリマーは、完全長アルテルナンスクララーゼよりも少量であることもまた示すことができる。アルテルナンオリゴ糖は、アルテルナンスクララーゼ酵素が触媒する、スクロースと様々なアクセプター糖の反応により生成され、腸管細菌性病原体を防除するためのプレバイオティクスとして記載されている。アルテルナンオリゴ糖の生

10

20

30

40

50

成に切断型アルテルナンスクララーゼ酵素を使用することによって、高収率の所望のオリゴ糖生成物が得られる。さらに、オリゴ糖の膜精製が容易になるが、それは、ポリマー性アルテルナンが膜の詰まりを誘導するおそれがあるからである。

【0024】

最後に、本発明はまた、アルテルナンスクララーゼの触媒活性を保持する切断型アルテルナンスクララーゼを高純度で提供する。本発明に記載の核酸分子を採用して、高純度および／または比較的多量のリコンビナント切断型アルテルナンスクララーゼを生成するウマ細胞を作製すること、ならびにこれらの酵素の活性を有する遺伝的に改変された植物を作製することが可能であり、ここで、植物体内でのアルテルナンの形成が生じるが、本発明の文脈で、「高純度」という用語は、本発明に記載のタンパク質が、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、そしてなおさらに好ましくは少なくとも95%の純度を有することを意味する。

10

【0025】

好ましくは、本発明から除かれるのは、公開された特許出願US20060127328A1に記載されている核酸分子および切断型核酸分子である。

【0026】

好ましくは、本発明から除かれるのは、US20060127328A1の段落[0062]、[0065]および[0094]に記載されている核酸分子である。配列番号1の番号付けによると、これらは以下の核酸分子である：

1. 配列番号1の1位のヌクレオチドから4275位のヌクレオチドを含むまで(=US20060127328A1の番号付けによると核酸195~4469)、
2. 配列番号1の1位のヌクレオチドから4047位のヌクレオチドを含むまで(=US20060127328A1の番号付けによると核酸195~4241)、
3. 配列番号1の1024位のヌクレオチドから4275位のヌクレオチドを含むまで(=US20060127328A1の番号付けによると核酸1218~4469)、
4. 配列番号1の1位のヌクレオチドから3870位のヌクレオチドを含むまで(=US20060127328A1の番号付けによると核酸195~4064)、
5. 配列番号1の1024位のヌクレオチドから3870位のヌクレオチドを含むまで(=US20060127328A1の番号付けによると核酸1218~4064)。

20

【0027】

好ましくは、同様に本発明から除かれるのは、国際公開公報第00/47727号明細書に言及された、アルテルナンスクララーゼをコードする核酸分子である。

30

【0028】

対照的に、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質をコードする、本発明のさらなる好都合な核酸分子は、

1. 配列番号1または配列番号3に示される核酸配列の502位のヌクレオチドから3945位のヌクレオチドを含むまでの配列を有する核酸分子、
2. アミノ酸配列が、配列番号2の168位のアミノ酸から1315位のアミノ酸を含むまでの配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するタンパク質をコードする核酸分子、
3. 配列番号1または配列番号3に示される核酸配列の1024位のヌクレオチドから4047位のヌクレオチドを含むまでの配列を有する核酸分子、
4. アミノ酸配列が、配列番号2の342位のアミノ酸から1349位のアミノ酸を含むまでの配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するタンパク質をコードする核酸分子、
5. 配列番号1または配列番号3に示される核酸配列の1024位のヌクレオチドから3945位のヌクレオチドを含むまでの配列を有する核酸分子、および
6. アミノ酸配列が、配列番号2の342位のアミノ酸から1315位のアミノ酸を含む

40

50

までの配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するタンパク質をコードする核酸分子である。

【0029】

同様に本発明により包含されるのは、それぞれの場合で、遺伝コードの縮重により、核酸配列が上に特定された核酸分子の一つの配列から逸脱した核酸分子である。同様に含まれるのは、配列が、上に特定された配列の一つと少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有する核酸分子である。「同一性」という用語は、本開示の他の箇所に定義され、同一性を確認する方法が詳述されている。さらに、本発明により含まれるのは、核酸配列が、上に言及された核酸分子の一つの完全長配列に相補的な核酸分子であり、ここで、この相補的な配列は、好ましくは上に言及した核酸分子と同数のヌクレオチドを有する。

【0030】

ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の位置に関して、改変が達成されようとも、コードされるタンパク質またはそのアミノ酸配列を有するタンパク質がアルテルナンスクララーゼの酵素活性を依然として保持するような位置に関する示唆は、当業者により文献中に見出すことができる。G. Joucla et al., FEBS Letters 580 (2006) 763-768およびUS2006/0127328A1は、アルテルナンスクララーゼ酵素の様々なドメインを記載しており、例えばJouclaらの図2およびUS2006/0127328A1の図3Aおよび3Bを参照されたい。まず第一に、この参照は、そのタンパク質のアミノ酸40~341の範囲のN末端可変領域を開示し、その領域は、適切なコード配列のヌクレオチド118~1023、例えば本発明の配列番号1または3のヌクレオチド118~1023などに対応する。N末端可変領域には、例えば配列番号1または3と対応するコード配列のヌクレオチド1024~3870に対応する、そのタンパク質のアミノ酸342~1290からの高度に保存された触媒ドメインが続く(G. Joucla et al, p. 763、左欄)。この開示から離れて、当業者であれば、可変領域におけるヌクレオチド/アミノ酸の改変が、高度に保存された触媒ドメインにおける改変よりもアルテルナンスクララーゼの酵素活性を保持すると予想するであろう。したがって、当業者であれば、配列が、請求項1のa)、c)またはe)記載の配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有する核酸分子であって、アルテルナンスクララーゼ活性を有するタンパク質を依然としてコードする核酸分子を作製するために、アルテルナンスクララーゼタンパク質の可変領域をコードする核酸分子の区分(配列番号1または3のヌクレオチド118~1023)に最初に改変を行うであろう。請求項1のb)、d)またはf)記載の核酸分子を得るためのアミノ酸配列の改変に同じことがあてはまり、当業者であれば、その改変を好ましくは配列番号2のアミノ酸40~341の領域に行うであろう。

【0031】

さらに、G. Joucla et al., FEBS Letters 580 (2006) 763-768およびUS2006/0127328A1は、709個のアミノ酸から成るゆえに、アルテルナンスクララーゼ酵素のアミノ酸1348~2057を含むC末端ドメイン(グルカン結合ドメイン、GBD)を詳述している。このC末端ドメインは、CWリピートおよびAPYリピートとして知られているものを有する。G. Jouclaらは、APYリピート(アミノ酸1507~2057)を欠損したアルテルナンスクララーゼにより合成されるアルテルナンが、ネイティブなアルテルナンスクララーゼを用いて得られるアルテルナンと同一であることを説明している。したがって、APYモチーフは、この酵素のポリメラーゼ活性に関与しない(Joucla et al., p. 767、左欄)。さらに、Jouclaらによって研究された切断型アルテルナンスクララーゼ(「ASRC-APY-del」と呼ばれる)は、本来の7個のCWリピートのうち4個しか有さない(Joucla et al. p. 765、左欄)が、このことは、この酵素のポリメラーゼ活性に影

響しない。したがって、Jouclaらの結果により確認されたように、C Wユニット5～7におよそ対応する1426～1481位のアミノ酸の除去（Jouclaら、図1参照）は、アルテルナンスクララーゼの活性もまた損なわない。したがって、当業者であれば、請求項1e）記載の核酸分子から出発して、配列が、請求項1e）の配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有する核酸分子を作製するために、好ましくは、配列番号2に記載のアルテルナンスクララーゼのアミノ酸1426～1506をコードする、配列番号1または3のヌクレオチド4276～4518からの区分に改変を実施するであろう。請求項1f）に記載の核酸分子を得るためのアミノ酸配列の改変に同じことがあてはまり、当業者であれば、この改変を好ましくは配列番号2のアミノ酸1426～1506の領域に行うであろう。

10

【0032】

しかし、上に述べた事柄は、アルテルナンスクララーゼの酵素活性がまだ保持されている状態で、本発明に記載の核酸／アミノ酸配列の他の領域を改変することを全く除外していない。したがって、上に示したものの以外の区分における改変が、本発明の範囲に明白に含まれる。

【0033】

G. Jouclaらの従来技術において、C末端ドメイン全体の除去は、タンパク質の発現に不都合であると主張されており（p. 763、右欄）、ここで、Jouclaによると、C末端ドメインは、709個のアミノ酸から成ることから、アルテルナンスクララーゼのアミノ酸1348～2057を含む（Joucla, p. 763、右欄）。しかし、驚くことに、配列番号2のアミノ酸40～1315を含む切断型アルテルナンスクララーゼが発現され、触媒活性をもつことが、本発明において実証されたが、このことは、Jouclaらの教示に照らして予想外であった。

20

【0034】

さらなる局面では、本発明は、

- a) 配列番号3に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子、
 - b) 配列が、配列番号3に示される配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有する核酸分子、
 - c) 核酸配列が、遺伝コードの縮重により、a) またはb) の核酸分子の配列から逸脱した核酸分子、
 - d) 核酸配列が、a)、b)、c) の核酸分子またはその部分の一つの配列と相補的な核酸分子、
 - e) a)、b)、c) またはd) に言及された核酸分子のフラグメント、アレル変異体および／または誘導体である核酸分子
- からなる群より選択される、アルテルナンスクララーゼ活性を有するタンパク質をコードする核酸分子に関する。

30

【0035】

それらのコドン最適化配列の結果として、配列番号3に基づき、上記段落に示された核酸分子は、植物細胞において配列番号1の核酸分子よりも向上した発現を示す。ゲノムに組み込まれているか、または組み込まれるであろう植物細胞または植物のコドン使用頻度に適合させるという意味で、コドンは改変されている。配列番号3のコドン使用は、トウモロコシおよびサトウキビのために特に最適化された。

40

【0036】

遺伝コードの縮重により、アミノ酸は、一つまたは複数のコドンによりコードされうる。種々の生物は、それぞれがアミノ酸をコードするコドンを異なる頻度で使用する。発現させる予定の配列をゲノムに組み込むことになっている植物細胞または植物でのコドン使用頻度に、核酸コード配列のコドンを適合させることは、問題の植物細胞または植物でのタンパク質の翻訳量の増加および／またはそれぞれのmRNAの安定性に貢献しうる。当

50

業者であれば、あるアミノ酸をコードするためにあるコドンが使用される頻度について、問題の生物の可能な最大数の核酸コード配列を検討することによって、問題の植物細胞または植物でのコドン使用頻度を決定することができる。ある生物のコドン使用頻度は、当業者に公知であり、コンピュータプログラムを採用して簡単かつ迅速に実施することができる。適切なコンピュータプログラムは、公的に利用でき、とりわけインターネットから無料公開されている（例えば<http://gcua.schoedl.de/>；<http://www.kazusa.or.jp/codon/>；<http://www.entelechon.com/eng/cutanalysis.html>）。

【0037】

核酸コード配列のコドンを、発現させる予定の配列をゲノムに組み込むことになっている植物細胞または植物でのコドン使用頻度に適合させることは、*in vitro*突然変異誘発、または好ましくは遺伝子配列の*de novo*合成により果たすことができる。核酸配列の*de novo*合成のための方法は、当業者に公知である。*de novo*合成は、例えば最初に個別の核酸オリゴヌクレオチドを合成し、それらがDNA二本鎖を形成するようにそれらを相補的オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションし、次いで所望の核酸配列が得られるように個別の二本鎖オリゴヌクレオチドを相互にライゲーションすることによって果たすことができる。特異的ターゲット生物にコドン使用頻度を適合させることを含む、核酸配列の*de novo*合成はまた、そのようなサービスを提供する会社に依頼してもよい（例えば Entelechon GmbH, Regensburg, Germany）。

【0038】

コドン最適化された配列を有する、以前に記載された核酸分子の間で、好ましくは本発明から予想されるのはまた、明細書国際公開公報第00/47727号に記載されている核酸分子である。

【0039】

本発明の文脈において、「誘導体」という用語は、これらの分子の配列が、一つまたは複数の位置で上記核酸分子の配列と異なること、およびそれらがこれらの配列と高度の同一性を有することを意味する。上記核酸分子からの逸脱は、例えば欠失、付加、置換、挿入または組換えの結果として始まることがある。アレル変異体は、天然変異体、またはその他の合成的に作製された変異体もしくはリコンビナントDNA技法により作製された変異体の形態をとりうる。

【0040】

核酸トリプレットATGが配列の5'末端にすでに存在するのでなければ、好ましくは、そのようなトリプレットを本明細書上記および下記の本発明に記載の核酸分子の5'末端上流に結合させる。したがって、この好ましい態様では、ATGは、この配列の新しい5'末端を形成する。ATGは、核酸の翻訳における開始コドンとして働く。ATGトリプレットは、当業者に公知の方法により本発明に記載の核酸分子の5'末端に結合させることができる。広く使用されている方法は、添付の実施例に記載されるように、特異的に適合されたプライマーを使用したPCRである。

【0041】

TAA、TAGまたはTGAより選択される核酸トリプレットが配列の3'末端にすでに存在するのでなければ、好ましくは、そのようなトリプレットを本明細書上記および下記の本発明に記載の核酸分子の3'末端下流に結合させる。したがって、この好ましい態様では、TAA、TAGまたはTGAは、この配列の新しい3'末端を形成する。言及されたトリプレットは、核酸分子の転写／翻訳における停止コドンとして働く。TAA、TAGまたはTGAトリプレットは、当業者に公知の方法により、本発明に記載の核酸分子の3'末端に結合させることができる。広く使用されている方法は、添付の実施例に記載されるように、特異的に適合されたプライマーを使用したPCRである。

【0042】

本発明に記載の核酸分子によりコードされるタンパク質は、植物細胞および細菌発現系に非常に良好に発現される。

【0043】

本発明に記載の核酸分子は、DNA分子、特にゲノム分子の形態をとりうる。本発明に記載の核酸分子は、さらにRNA分子でありうる。

【0044】

切断型アルテルナンスクラーズをコードする、本発明に記載の核酸分子は、合成的にまたはリコンビナント技法により調製されたものであってもよい。このために、例えばすでに上に述べたように、完全長アルテルナンスクラーズをコードする、配列番号3に記載のコドン最適化された配列を有する核酸分子を合成的に調製することが可能である。次に、配列番号3の配列を有する核酸分子は、好ましくは適切に適合されたプライマーを使用したPCR技法により、切断型アルテルナンスクラーズをコードする本発明に記載の核酸分子を調製するために使用される。PCR法および適切なプライマーは、実施例および添付の配列リストに列挙する。

10

【0045】

完全長アルテルナンスクラーズをコードする核酸分子はまた、天然起源に、好ましくは微生物に、さらに好ましくは細菌に、なおさらに好ましくはグラム陽性細菌に、そして最も好ましくはLeuconostoc種、特にLeuconostoc mesenteroidesという細菌に由来しうる。Leuconostoc mesenteroides由来の完全長アルテルナンスクラーズをコードし、配列番号1に示される配列を有する核酸分子は、国際公開公報第00/47727号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み入れられる。したがって、当業者は、配列番号1に示される核酸分子を得るために国際公開公報第00/47727号の開示を考慮に入れることができる。同様に、切断型アルテルナンスクラーズをコードする、本発明に記載の核酸分子を調製するために、配列番号1を有する核酸分子を使用することができる。配列番号1に示される配列を有する核酸分子からの、本発明に記載の核酸分子の調製は、PCR技法により好ましくは果たされる。本発明に記載の核酸分子はまた、実施例に記載されるように、配列番号1を有する核酸分子からの本発明に記載の核酸分子の調製と同様に、配列番号3を有する核酸分子からPCRにより調製することができる。適切に適合されたプライマーの調製は、当業者の能力の範囲内である。

20

【0046】

アルテルナンスクラーズ(E. C. 2. 4. 1. 140)の酵素活性または生物学的活性を有するタンパク質または酵素は、スクロースからアルテルナンおよびフルクトースへの変換を触媒する酵素を意味すると理解される。この変換は、外部アクセプター(例えば、マルトース、イソマルトース、イソマルトトリオースなど)の存在下、またはそうでなければ不在下のどちらで実施してもよい。外部アクセプターの不在下では、アルテルナンスクラーズは、スクロースから出発して、フルクトースおよび高分子量アルテルナンの遊離を触媒するものであり、高分子量アルテルナンは、 α -1, 3-および α -1, 6-グリコシド結合により相互に、好ましくは交互に連結したグルコースユニットから主鎖が成る、グルコースユニットから構成される多糖であるが、この構造は分岐もまた有しうる。例えば、マルトース、イソマルトース、イソマルトトリオースおよびメチル- α -D-グルカンなどの外部アクセプターの存在下で、アルテルナンスクラーズは、それらの多糖アクセプターで、グルコース残基が主として交互に α -1, 6-および α -1, 3-グリコシド結合した α -D-グルカン鎖ならびにフルクトースの合成を触媒しうる。採用されるアクセプターに応じて、得られる生成物は異なる構造を有する。アルテルナンスクラーズの酵素活性は、例えばLopez-Munguia (Annals New York Academy of Sciences 613 (1990), 717-722)により、または本出願の実施例に記載されたように検出することができる。1活性単ユニット(1u)は、1分間に1 μ molのフルクトースの遊離を誘導する酵素の量と定義することができる。

30

40

【0047】

本発明の文脈において、「同一性」という用語は、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の、ヌクレオチド配列の全長にわたる配列同一性またはアミノ酸配列の全長にわたる配列同一性を意味する

50

。したがって、本発明はまた、上に言及された同一率を有する、本発明に記載の全ての核酸配列またはアミノ酸配列の、本明細書に記載されたそれら全ての改変を含む。

【0048】

本発明に関連して、「同一性」という用語は、他のタンパク質／核酸と一致するアミノ酸／ヌクレオチドの数（同一性）をパーセントで表したものと理解される。二つの関連するアミノ酸配列の間または二つの関連する核酸配列の間の同一性は、好ましくはコンピュータープログラムを採用して決定される。相互に比較される配列の長さが異なるとき、同一性は、短い方の配列が長い方の配列と共有するアミノ酸の数が同一率を決定するような方法で決定すべきである。好ましくは、同一性は、公知で公的に利用できるコンピュータープログラムClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) により決定される。公的に利用できる、プログラムClustalWにおける同一性の定義およびそれを決定する方法は、参照により明白に組み入れられる。ClustalWは、Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) およびToby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE) により公的に利用できるようにされている (European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany)。ClustalWはまた、様々なインターネットのページから、とりわけ I G B M C (Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) ならびに E B I (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) および E B I の全てのインターネットミラーページ (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK) からダウンロードすることができる。好ましくは、本発明の範囲内の記載されたタンパク質と他のタンパク質の間の同一性を決定するために、ClustalWコンピュータープログラム、バージョン1.8が使用される。これに関連して、以下のパラメーターを設定すべきである：K T U P L E = 1、T O P D I A G = 5、W I N D O W = 5、P A I R G A P = 3、G A P O P E N = 1 0、G A P E X T E N D = 0.05、G A P D I S T = 8、M A X D I V = 40、M A T R I X = G O N N E T、E N D G A P S (O F F)、N O P G A P、N O H G A P。好ましくは、例えば本発明の範囲内の記載された核酸分子のヌクレオチド配列と他の核酸分子のヌクレオチド配列の間の同一性を決定するために、コンピュータープログラムClustalWバージョン1.8が使用される。これに関連して、以下のパラメーターを設定すべきである：K T U P L E = 2、T O P D I A G S = 4、P A I R G A P = 5、D N A M A T R I X : I U B、G A P O P E N = 1 0、G A P E X T = 5、M A X D I V = 40、T R A N S I T I O N S : 重み付けなし。

【0049】

本発明において、比較用配列および改変された配列（すなわち比較される配列）は、好ましくは同数のヌクレオチドまたはアミノ酸を有する。なおさらに好ましくは、改変された核酸配列またはアミノ酸配列は、比較用配列のヌクレオチド交換またはアミノ酸交換により得られる。すなわち、改変された核酸配列またはアミノ酸配列は、比較用配列と同じ、配列番号1、2または3の区分に基づく。例えば、配列が、請求項1a)の配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有する、請求項1g)に記載の改変された核酸分子は、配列番号1または配列番号3に示される核酸配列（比較用配列）の118位のヌクレオチドから4140位のヌクレオチドを含むまでの配列を有する核酸分子に基づくが、118位のヌクレオチドから4140位のヌクレオチドを含むまでの配列を有する該核酸分子は、改変された配列を得るためにヌクレオチド交換により改変されたが、ヌクレオチドの数は維持されている。同じ原理は、好ましくは、比較用配列に対してある同一率であると定義される、本明細書に記載された全ての他の改変された核酸配列またはアミノ酸配列にあてはめることができる。

【0050】

同様に本発明により含まれるのは、核酸配列が上記核酸分子の一つの配列と、特に請求項1に詳述される核酸分子と、核酸配列内の一つまたは複数の点突然変異が異なるが、ア

10

20

30

40

50

ルテルナンスクラージェの酵素活性がコードされるタンパク質に保持されている核酸分子である。

【0051】

従来の分子生物学的技法により、この核酸分子に上述の突然変異を導入することが可能である（例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい）。

【0052】

実行可能な例は、アミノ酸配列の改変が例えば酵素活性または酵素の調節に効果を有するような位置への点突然変異の導入である。このようにして、例えば改変された立体選択性および位置選択性もしくは変化したKm値を有する突然変異体、または細胞に普通に存在し、アロステリックレギュレーションまたは共有結合的改変により作用するレギュレーションメカニズムに供されない突然変異体を作製することが可能である。本発明に記載の核酸分子にもまた導入することができるこのような突然変異は、例えば公開された特許出願US20060127328A1に記載されている。本発明から好ましくは除かれるのは、US20060127328A1の特に段落[0063]、[0064]、[0066]および[0067]に記載された核酸分子である。同様に、本発明から好ましくは除かれるのは、これらの核酸分子によりコードされ、特にUS20060127328A1の段落[0091]に記載された切断型長のアルテルナンスクラージェである。

【0053】

原核細胞をリコンビナント操作に供するために、本発明に記載の核酸分子またはこれらの分子の部分を、DNA配列の組換えにより突然変異または配列改変を許すプラスミドに導入してもよい。標準法を採用して、塩基交換を実施してもよいし、天然または合成配列を付加してもよい（Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA参照）。DNAフラグメントを相互に連結するために、アダプターまたはリンカーをそのフラグメントに付加してもよい。さらに、適切な制限切断部位を与えるか、または過剰なDNAもしくは制限切断部位を除去する操作を採用することが可能である。挿入、欠失または置換が適切な場合に、in vitro突然変異誘発、「プライマー修復」、制限；PCRまたはライゲーションを使用することができる（Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA参照）。一般に実施される分析法は、配列分析、制限分析およびさらなる生化学／分子生物学的方法である。

【0054】

本発明はまた、ストリンジェントな条件で、本発明に記載の上記核酸分子とハイブリダイゼーションする核酸分子に関するが、但し、コードされるタンパク質は、アルテルナンスクラージェの酵素活性を有する。

【0055】

本発明のために、「ハイブリダイゼーション」という用語は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載されているような、通常のハイブリダイゼーション条件、好ましくはストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーションを意味する。「ハイブリダイゼーション」は、特に好ましくは、ハイブリダイゼーションが以下の条件で起こることを意味する：ハイブリダイゼーション緩衝液：2×SSC；10×Denhardt溶液（Ficoll 400+PEG+BSA；比1：1：1）；0.1%SDS；5mMEDTA；50mMNa₂HPO₄；250μg/mlニシン精子DNA；50μg/mltRNA；または0.25Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）；1mMEDTA7%SDS；T=65～68℃、洗浄緩衝液：0.1×SSC；0.1%SDS、洗浄温度：T=65～68℃。

【0056】

本発明に記載の核酸分子とハイブリダイゼーションする核酸分子は、任意の所望の生物

に由来してもよく;したがって、それらは、細菌、真菌、動物、植物、またはウイルスに由来しうる。

【0057】

上記分子とハイブリダイゼーションする核酸分子は、例えばゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから単離することができる。このような核酸分子の同定および単離は、上述の核酸分子またはこれらの分子の部分もしくはこれらの分子の逆相補体を使用して、例えば標準法によるハイブリダイゼーションにより（例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY参照）、またはPCRによる増幅により果たすことができる。

10

【0058】

ハイブリダイゼーションプローブとして使用されるフラグメントはまた、慣例的な合成技法を採用して調製された合成フラグメントまたはオリゴヌクレオチドの形態をとることがあり、その配列は、本質的に、本発明の範囲内の記載された核酸分子の配列と一致する。

【0059】

本発明の範囲内の記載された核酸分子とハイブリダイゼーションする分子は、特に、上述の核酸分子のフラグメント、誘導体およびアレル変異体を含む。本発明の文脈において、「誘導体」という用語は、これらの分子の配列が、一つまたは複数の位置で上記核酸分子の配列と異なること、およびそれらがこれらの配列と高度の同一性を有することを意味する。上記核酸分子からの逸脱は、例えば、欠失、付加、置換、挿入または組換えに由来しうる。

20

【0060】

本発明はまた、本発明に記載の核酸分子と特異的にハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチドに関する。このようなオリゴヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも10、特に少なくとも15、そして特に好ましくは少なくとも50ヌクレオチド長を有する。これらは、これらが本発明に記載の核酸分子と特異的にハイブリダイゼーションすること、すなわち他のタンパク質、特に他のグルコシルトランスフェラーゼをコードする核酸配列とハイブリダイゼーションしないか、または、ほんのごく低度でハイブリダイゼーションすることを特徴とする。本発明に記載のオリゴヌクレオチドは、例えば、PCR反応などの増幅技法のためのプライマーまたは関連遺伝子の単離のためのハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。

30

【0061】

さらに好ましい態様では、本発明に記載の核酸分子は、原核細胞または真核細胞での翻訳可能なRNAの転写および合成を確実にするレギュレーションエレメントに連結される。そのようなレギュレーション配列は、微生物および植物の両方に関して、本開示の別の部分に詳述されている。

【0062】

本発明はさらに、ベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージおよび遺伝子工学に通常使用される他のベクターに関し、これらは、本発明上記の核酸分子を含む。本発明の好ましい態様では、本発明に記載のベクターは、微生物細胞のトランスフォーメーションに適する。このようなベクターは、好ましくは植物細胞のトランスフォーメーションに適する。さらに好ましい態様では、これらのベクターは、植物細胞のゲノムに本発明に記載の核酸分子を、適切であればフランキングレギュレーション領域と一緒に組み込むことを許す。例は、アグロバクテリウム介在性遺伝子導入に採用することができるバイナリーベクターであり、そのいくつかは、すでに市販されている。好都合に使用することのできる他のベクターは、直接の遺伝子送達により植物ゲノムに組み込まれる配列を含むベクターである。サトウキビでの直接遺伝子送達に関する参考文献の例は：Bower R, Elliot AR, Potier BAM and Birch RG (1996) High efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers.

40

50

Molecular Breeding 2: 239-249である。

【0063】

本発明の一局面では、ベクターは、US20060127328A1の段落 [0076] に記載されたプラスミドである。

【0064】

本発明の核酸の発現は、原核細胞または真核細胞で起こりうる。適切な細胞の例は、US 20060127328A1の段落 [0077] に詳述されている。

【0065】

さらに好ましいベクターは、添付の使用実施例に使用されるベクターである。

【0066】

特に好都合な発現は、例えばデキストランスクラーゼまたは他の多糖形成酵素もしくは分解酵素などの妨害酵素を有さない原核細胞または真核細胞における、本発明に記載の核酸分子の発現である。

【0067】

さらなる態様では、本発明は、本発明に記載の上記核酸分子または本発明に記載のベクターでトランスフォーメーションされた宿主細胞、特に原核細胞または真核細胞に、およびそのようなトランスフォーメーションされた細胞から得られ、本発明に記載の核酸分子または本発明に記載のベクターを含む細胞に関する。本発明に記載の細胞は、好ましくは単離された宿主細胞である。

【0068】

好ましい態様では、宿主細胞は、微生物細胞である。本発明の文脈において、「微生物」という用語は、Schlegel "Allgemeine Mikrobiologie" (Georg Thieme Verlag, 1985, 1-2)に定義されるように、細菌および全ての原生生物(例えば真菌、特に酵母、藻類)を含む。好ましい態様では、本発明は、藻類細胞およびAspergillus属、Bacillus属、特にBacillus subtilis、Saccharomyces属、Saccharomyces cerevisiaeなど、またはPichia属の宿主細胞に関する(Rodriguez, Journal of Biotechnology 33 (1994), 135-146, Romanos, Vaccine, Vol. 9 (1991), 901以下参照)。本発明に使用することのできるさらに適切な細胞は、Salmonella typhimurium、Pseudomonas属由来株、StreptomycesおよびStaphylococcus、アピコンプレクサ寄生虫などの寄生虫(Plasmodia、Toxoplasma、Cryptosporidia)、LeishmaniaまたはTrypanosomaである。特に好ましい態様では、本発明は、E. coli細胞に関する。

【0069】

切断型アルテルナンスクララーゼが宿主細胞から分泌されることが特に好ましい。切断型アルテルナンスクララーゼの生成のために、そのような宿主細胞を作製することは、当業者に公知の方法により果たすことができる。微生物によるタンパク質の分泌は、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、輸送ペプチド)により仲介される。このシグナル配列を有するタンパク質は、微生物の細胞膜を透過することができる。タンパク質の分泌は、対応するアルテルナンスクララーゼをコードする領域に、シグナルペプチドをコードするDNA配列を結合させることにより果たすことができる。分泌は、配列番号2の最初の39個のN末端アミノ酸残基を含むシグナル配列により確実になる。

【0070】

本発明の好ましい態様では、本発明に記載の宿主細胞は、例えば、多糖形成酵素および/または分解酵素などの妨害酵素活性を有さない。

【0071】

様々な発現系の概要は、例えば、Methods in Enzymology 153 (1987), 385-516に、Bitterら(Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544)に、そしてSawersら(Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9)、Billman-Jacobe(Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4)、Hockney(Trends in Biotechnology 12, (1994), 456-463)、Griffiths et al., Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440)に

見出される。酵母発現系の概要は、例えば、Hensingら (Antonie von Leuwenhoek 67(1995), 261-279)、Bussineauら (Developments in Biological Standardization 83 (1994), 13-19)、Gellissenら (Antonie von 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) に見出すことができる。

【0072】

発現ベクターは、文献に包括的に述べられている。これらは、選択マーカー遺伝子および選択された宿主における複製を確実にする複製起点に加えて、通常、細菌またはウイルスプロモーターおよび大部分の場合に転写終結シグナルを含む。プロモーターと終結シグナルの間に、少なくとも一つの制限切断部位またはポリリンカーが位置し、これらのエレメントは、DNAコード配列の挿入を可能にする。プロモーター配列として使用することのできるエレメントは、それが選択された宿主生物において活性である限り、問題の遺伝子の転写を自然にコントロールするDNA配列である。しかし、他のプロモーター配列もまた、この配列の代用となりうる。遺伝子の構成的発現をもたらすプロモーターだけでなく、下流の遺伝子の発現のターゲティングされたレギュレーションを許す誘導性プロモーターもまた使用することが可能である。これらの性質を有する細菌およびウイルスプロモーター配列は、文献に包括的に記載されている。微生物(例えば *E. coli*、*S. cerevisiae*)における発現用のレギュレーション配列は、文献に十分に記載されている。下流の遺伝子の特に強力な発現を許すプロモーターは、例えば、T7プロモーター (Studier et al., Methods in Enzymology 185 (1990), 60-89)、lacUV5、trp、trp-lacUV5 (DeBoer et al., in Rodriguez and Chamberlin (Eds), Promoters, Structure and Function; Praeger, New York, (1982), 462-481; DeBoer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 21-25)、lpl、rac (Boros et al., Gene 42 (1986), 97-100) である。通常、タンパク質の量は、微生物の成長サイクルの対数中期から後期にかけてその最大に達する。したがって、タンパク質の合成は、好ましくは誘導性プロモーターを使用して実施される。これらにより、しばしば構成的プロモーターよりも高いタンパク質の収率が誘導される。クローニングされた遺伝子の永続性転写および翻訳の結果として、強力な構成的プロモーターを使用すると、しばしば、他の必須の細胞機能のためのエネルギーが失われることによって細胞の成長が減速するという事実が誘導される (Bernard R. Glick/Jack J. Pasternak, Molekulare Biotechnologie (1995), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, p. 342.)。したがって、最適量のタンパク質を果たすために、しばしば2段階工程に依存する。まず、宿主細胞は、相対的に高い細胞密度に達するまで最適条件で培養される。次に、第二段階では、採用されたプロモーターの種類に応じて転写が誘導される。これに関連して特に適するプロモーターは、ラクトースーまたはIPTG (=イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) 誘導性tacプロモーター (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 21-25) である。同様に、転写終結シグナルも文献に記載されている (Young RA (1979) Transcription termination in the Escherichia coli ribosomal RNA operon rrnC, J Biol Chem. 254:12725-31; Lynn SP, Bauer CE, Chapman K, Gardner JF. (1985) Identification and characterization of mutants affecting transcription termination at the threonine operon attenuator. J Mol Biol. 183:529-41)。

【0073】

切断型アルテルナンスクラーゼをコードするDNAを有する微生物宿主細胞のトランスフォーメーションは、通常、標準法により、例えばSambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Course Manual, 3rd edition, (2001), Cold Spring Harbor Press, New York; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990) に記載されているものなどにより実施することができる。宿主細胞は、それぞれの場合に使用される特定の宿主細胞の必要を満たす栄養培地中で、特にpH、温度、塩濃度、通気、抗生物質、ビタミン、微量元素などを考慮して培養される

。

【0074】

本発明はさらに、上に定義された完全長アルテルナンスクララーゼに比べて、アミノ酸配列のN末端および／またはC末端が切断されており、対応する配列を有する本発明に記載の核酸分子によりコードされるアルテルナンスクララーゼ（本明細書下記に「切断型アルテルナンスクララーゼ」とも呼ばれる）の酵素活性を有するタンパク質に関する。

【0075】

本発明は、特に、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する以下のタンパク質に関する：

【0076】

アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質であって、
a) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして最も好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1295位のアミノ酸から1345位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するタンパク質、
b) a) のアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、比較されるアミノ酸配列が、好ましくは同数のアミノ酸を有するタンパク質、
c) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして最も好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1355位のアミノ酸から1420位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するタンパク質、
d) c) のアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、比較されるアミノ酸配列が、好ましくは同数のアミノ酸を有するタンパク質、
e) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして最も好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1430位のアミノ酸から1520位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するタンパク質、または
f) e) のアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、比較されるアミノ酸配列が、好ましくは同数のアミノ酸を有するタンパク質より選択されるタンパク質。

【0077】

なおさらに好ましくは、本発明は、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質に関し、このタンパク質は、

a) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして最も好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1305位のアミノ酸から1325位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するタンパク質、
b) a) のアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、比較

されるアミノ酸配列が、好ましくは同数のアミノ酸を有するタンパク質、

c) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして最も好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1370位のアミノ酸から1390位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するタンパク質、

d) c)のアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、比較されるアミノ酸配列が、好ましくは同数のアミノ酸を有するタンパク質、

e) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして最も好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1470位のアミノ酸から1520位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するタンパク質、または

f) a)のアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、比較されるアミノ酸配列が、好ましくは同数のアミノ酸を有するタンパク質より選択される。

【0078】

最も好ましいのは、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する以下のタンパク質である：

a) 配列番号2の40位のアミノ酸から1380位のアミノ酸を含むまでの配列を有するタンパク質、

b) 配列番号2の40位のアミノ酸から1315位のアミノ酸を含むまでの配列を有するタンパク質、

c) 配列番号2の40位のアミノ酸から1506位のアミノ酸を含むまでの配列を有するタンパク質。

【0079】

本発明により同様に含まれるのは、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する以下のタンパク質である：

d) 配列番号2の168位のアミノ酸から1315位のアミノ酸を含むまでの配列を有するタンパク質、

e) 配列番号2の342位のアミノ酸から1349位のアミノ酸を含むまでの配列を有するタンパク質、

f) 配列番号2の342位のアミノ酸から1315位のアミノ酸を含むまでの配列を有するタンパク質。

【0080】

さらに、本発明により含まれるのは、アミノ酸配列が、上に特定されたアミノ酸配列と、少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有する、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質であって、ここで、比較されるアミノ酸配列は、好ましくは同数のアミノ酸を有する。「同一性」という用語は、上記と同義であり、同一性を確認する方法は上に記載されている。

【0081】

本発明の一態様では、メチオニンは、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する、本明細書上記および下記のタンパク質（またはタンパク質配列）のN末端の上流に位置する。したがって、この好ましい態様では、メチオニンは、本発明に記載のアミノ酸配列のN末端を形成する。このようなメチオニンは、通常このタンパク質をコードするRNAの翻

10

20

30

40

50

訳に由来し、このRNAでメチオニンが核酸トリプレットATGによりコードされる。核酸配列にすでに存在しないかぎり、ATGトリプレットは、当業者に公知の方法により本発明に記載の核酸分子の5'末端に結合させることができる。確立された方法は、添付の実施例に記載されるように、特に適合されたプライマーを使用したPCRである。

【0082】

本発明から好ましくは除かれるのは、US20060127328A1に記載された、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質、特に、US20060127328A1の段落[0089]ならびに図3Aおよび3Bに記載されたタンパク質である。したがって、本発明から好ましくは除かれるのは、1～1425位、1～1349位、1～1290位、342～1425位、および342～1290位のアミノ酸のタンパク質であり、これらの位置は添付の配列番号2を参照して定義される。

10

【0083】

本発明はさらに、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する、本発明上記のタンパク質を製造する方法に関し、この方法では、

a) 配列が、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する、上記タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸分子であって、配列番号1もしくは3に示される配列を有する核酸分子から得ることができる核酸分子、または

b) a)に記載された核酸分子を含むベクターもしくはプラスミドで、
ホスト細胞をトランスフォーメーションし、

2) そのホスト細胞を培地中で培養し、そして

20

3) 培養された細胞および／または培地からタンパク質を単離する。

【0084】

アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質のアミノ酸配列は、上にさらに詳述され、配列番号2を参照して定義される。アミノ酸配列に基づき、当業者は、遺伝コードの縮重が原因で相互に異なりうる適切な核酸コード配列を決定することができる。例えば、完全長アルテルナンスクラゼのアミノ酸配列およびヌクレオチドコード配列を含む配列番号1から、本発明に記載のタンパク質（切断型アルテルナンスクラゼ）をコードするそれぞれの核酸配列を決定することが可能である。それぞれの場合で望ましい、本発明に記載のタンパク質についてのヌクレオチド配列の開始および終結を決定する、配列番号1と同じヌクレオチド位置に基づき、配列番号3に基づいてもまた、このタンパク質をコードする核酸配列を決定することが可能である。同様に、配列番号3に記載のヌクレオチド配列をアミノ酸配列に翻訳し、本発明に記載のタンパク質について詳述されたように、所望のアミノ酸配列の開始および終結を参照して、対応するヌクレオチドコード配列を決定することが可能である。

30

【0085】

配列が決定された後に、この配列を有する核酸分子を、配列番号1または配列番号3に記載の配列を有する核酸分子から作製することができる。配列が、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸分子の作製は、好ましくは、配列番号1または3に記載の配列を有する核酸分子から開始して、PCR技法により達成される。適切に適合されたプライマーの作製は、当業者の知識の範囲内である。

40

【0086】

アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質をコードし、完全長アルテルナンスクラゼに比べてアミノ酸配列のN末端および／またはC末端で切断されている、本発明上記の全ての核酸分子を上記工程に採用することも可能である。特に、請求項1に定義された核酸分子を採用することが可能である。

【0087】

上記工程に採用することのできるベクターおよびプラスミドに関して、問題の開示は別の箇所を参照される。さらに、上記工程に採用することができる微生物および植物ホスト細胞のトランスフォーメーションのためのホスト細胞および技法は、本明細書の別の箇所

50

で詳細に開示されている。植物ホスト細胞または微生物ホスト細胞、例えばEscherichia coli細胞が好ましい。

【0088】

ホスト細胞は、適切な栄養培地中で適切な培養条件で成長、すなわち培養および増殖される。通例の微生物および植物細胞のための栄養培地および培養条件は、当業者に公知であり、専門家の文献（例えば、Sambrook & Russell Molecular cloning: a laboratory manual (third edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA (2001)）に記載されている。

【0089】

最後に、タンパク質は、ホスト細胞および／または培地から単離される。このために、生成した細胞材料は、通常、適切な物理的、化学的および／または酵素的方法を採用して破壊される。アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質は、破壊された材料から単離することができる。

10

【0090】

タンパク質のさらなる精製は、当技術分野で公知の通常の方法を採用して果たすことができる。粗抽出物を得るために、破壊手順で得られた溶液を、例えば抽出法、遠心分離法および濾過法を採用して処理する。粗抽出物からのタンパク質の沈殿および限外濾過法は、相当量の液体からタンパク質を濃縮するための効率的な方法である。適切な沈殿剤は、とりわけ無機塩、例えば硫酸ナトリウムおよび硫酸アンモニウム、有機溶媒、例えばアルコール、ならびにポリマー、例えばポリエチレングリコールである。使用された沈殿剤を除去するために、続いて透析工程を実施することができる。さらなる第2の精製は、例えば水相系を使用したクロマトグラフィー法および分配法を採用して果たすことができる。これらの方法には、とりわけ、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。

20

【0091】

さらなる局面では、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質は、メリーフィールドタンパク質合成法により合成することができる。したがって、合成的に製造された切断型アルテルナンスクラゼは、本発明のさらなる局面である。

【0092】

さらなる局面では、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質はまた、無細胞in vitro発現／翻訳系を用いて調製することができる。in vitro翻訳は、例えばコムギ胚芽抽出物で可能である。しかし、in vitro法は、少しも限定されておらず、原則として当技術分野で公知の任意の方法を使用してもよい。

30

【0093】

本発明によると、スクロースの不在下で切断型アルテルナンスクラゼの生成を許すことにより、多糖から切断型アルテルナンスクラゼを追加的に分離することがもはや必要ないホスト細胞およびベクターを使用することが可能である。

【0094】

ホスト細胞により生成される切断型アルテルナンスクラゼの精製は、沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過、HPLC；逆相クロマトグラフィーなどの従来の精製法を採用して果たすことができる。

40

【0095】

ホスト細胞に発現され、切断型アルテルナンスクラゼをコードする、本発明に記載の核酸分子の改変の結果として、ある特徴の結果としてホスト細胞に生成させることができるポリペプチドを、培地からさらに容易に単離することができる。したがって、発現させる予定のタンパク質をさらなるポリペプチド配列（タグ）との融合タンパク質として発現させることが可能であり、そのポリペプチド配列の特異的結合性は、アフィニティークロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離を可能にする（例えば、Hopp et al., Bio/Technology 6 (1988), 1204-1210; Sassenfeld, Trends Biotechnol. 8 (1990), 88-93)。通常使用されるタグは、例えば、Strepタグ、Hisタグ、FLAGタグ、T7タ

50

グ、Sタグである。

【0096】

さらに、本発明の核酸配列は、5'または3'末端でタンパク質のNまたはC末端にタグをコードする配列により、例えばUS20060127328A1の段落[0071]に記載されている配列によってもまた改変することができる。

【0097】

本発明に記載の核酸分子を提供することにより、切断型アルテルナンスクラーズを発現する植物細胞を、リコンビナント法を採用して作製することが可能である。したがって、本発明はまた、本発明に記載の核酸分子でトランスフォーメーションされたトランスジェニック植物細胞、または本発明に記載の、もしくはそのような細胞から得られるベクターに関し、ここで、アルテルナンスクラーズの酵素活性を有するタンパク質をコードする核酸分子は、植物細胞において翻訳可能なmRNAの転写を開始するレギュレーションエレメント（プロモーター）のコントロール下にある。これらは、同種または異種プロモーターの形態を取りうる。これらのプロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、発生特異的プロモーターまたは外部要因（例えば、化学物質の適用後、熱および/または寒冷、乾燥、疾患の発生などの非生物要因の作用の結果として）によりレギュレーションされるその他のプロモーターの形態を取りうる。

【0098】

外来核酸分子の発現に適したプロモーターは、一般に、植物細胞において活性なプロモーターである。適切なプロモーターの例は、構成的発現のためのカリフラワーモザイクウイルスの35S RNAプロモーターまたはトウモロコシ由来のユビキチンプロモーターまたはCestrum YLCVプロモーター（黄化葉巻ウイルス；国際公開公報第0173087号；Stavolone et al., 2003, Plant Mol. Biol. 53, 703-713）、ジャガイモにおける塊茎特異性発現のためのパタチン遺伝子プロモーターB33（Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29）、またはトマトのための果実特異的プロモーター、例えば、トマトポリガラクトナーゼプロモーター（Montgomery et al., 1993, Plant Cell 5, 1049-1062）もしくはトマトE8プロモーター（Metha et al., 2002, Nature Biotechnol. 20(6), 613-618）またはモモACCオキシダーゼプロモーター（Moon and Callahan, 2004, J. Experimental Botany 55 (402), 1519-1528）、または光合成活性組織だけの発現を確実にするプロモーター、例えばSTLS1プロモーター（Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947；Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451）、または内乳特異的発現のためのコムギHMWGプロモーター、USPプロモーター、ファゼオリンプロモーター、トウモロコシからのゼイン遺伝子由来プロモーター（Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026；Quattroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93）、グルテリンプロモーター（Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50；Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366；Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218）、グロブリンプロモーター（Nakase et al., 1996, Gene 170(2), 223-226）、プロラミンプロモーター（Qu and Takaiwa, 2004, Plant Biotechnology Journal 2(2), 113-125）またはShrunken-1プロモーター（Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380）である。しかし、外部要因により決定される時点にだけ活性化されるプロモーターを使用することも可能である（例えば、国際公開公報第9307279号参照）。この文脈で特に興味深いのは、簡単な誘導を可能にする熱ショックタンパク質のプロモーターでありうる。例えば、Vicia faba由来のUSPプロモーターなどの種子特異的プロモーターを使用することがさらに可能であり、このプロモーターは、Vicia fabaおよび他の植物における種子特異的発現を確実にする（Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679；Baumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467）。

【0099】

藻類に感染するウイルスのゲノムに見出されるプロモーターの使用もまた、植物における核酸配列の発現に適する（Mitra et al., 1994, Biochem. Biophys Res Commun 204(1)

10

20

30

40

50

, 187-194; Mitra und Higgins, 1994, Plant Mol Biol 26(1), 85-93, Van Etten et al., 2002, Arch Virol 147, 1479-1516)。

【0100】

本発明の文脈において、「組織特異的」という用語は、侵襲 (infestation) (例えば転写開始) が主として特異的組織に限定されることを意味すると理解される。

【0101】

本発明の文脈において、「塊茎細胞、果実細胞または内乳細胞」という用語は、塊茎、果実または種子に存在する全ての細胞を意味すると理解すべきである。

【0102】

本発明の文脈において、「同種 (homologous) プロモーター」という用語は、本発明に記載の遺伝的に改変された植物細胞もしくは本発明に記載の遺伝的に改変された植物の作製のために使用された植物細胞もしくは植物に自然に存在するプロモーター (植物細胞もしくは植物に関して同種)、またはタンパク質をコードするそれぞれの外来核酸分子が単離された生物における遺伝子発現のレギュレーションをレギュレーションするプロモーター (発現させる予定の核酸分子に関して同種) を意味すると理解される。

10

【0103】

本発明の文脈において、「異種 (heterologous) プロモーター」という用語は、本発明に記載の遺伝的に改変された植物細胞もしくは本発明に記載の遺伝的に改変された植物の作製に使用された植物細胞もしくは植物に自然に存在しないプロモーター (植物細胞もしくは植物に関して同種)、またはタンパク質をコードするそれぞれの外来核酸分子が単離された生物における該外来核酸分子の発現を自然にはレギュレーションしないプロモーター (発現される核酸分子に関して異種) を意味すると理解される。

20

【0104】

転写物にポリA尾部を付加することに役立つ終結配列 (ポリアデニル化シグナル) が存在することもまた可能である。ポリA尾部は、転写物を安定化する機能を発揮すると考えられる。このようなエレメントは、文献に記載されており (Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29参照)、これらは所望により置換することができる。

【0105】

本開示はまた、国際公開公報第00/47727号の21/22ページに記載されたプロモーターおよび終結配列を明白に参照する。

30

【0106】

イントロン配列が、プロモーターと外来核酸分子のコード領域の間に存在することもまた可能である。このようなイントロン配列は、植物における発現安定および発現増加を招きうる (Callis et al., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier et al., 1997; Plant Journal 12(4), 895-899; Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569)。適切なイントロン配列は、例えば、トウモロコシ *sh1* 遺伝子の第1イントロン、トウモロコシポリキュビキチン遺伝子1の第1イントロン、イネ *EPS* 遺伝子の第1イントロン、または *Arabidopsis PAT1* 遺伝子の最初の2個のイントロンの一方である。

40

【0107】

本発明に記載のタンパク質の活性を導入することにより、例えば、適切な核酸分子を発現させることにより、適切に遺伝的に改変された植物細胞にアルテルナンを生成させることが可能である。これは、植物細胞に、本発明に記載の核酸分子を発現させることによって、野生型に存在しない、問題のアルテルナンスクララーゼの追加的な活性を導入することができる。さらに、例えば、改変された温度依存性または基質もしくは生成物特異性を有する、本発明に記載の切断型アルテルナンスクララーゼを得るために、当業者に公知の方法により本発明に記載の核酸分子を改変することが可能である。このような方法は、特許出願である国際公開公報第00/47727号にさらに詳細に記載されている。

50

【0108】

植物ホスト細胞に核酸分子を（安定）組み込みするために、本発明に記載の植物細胞、または本発明に記載の植物細胞を含む植物を作製するために、多数の技法を利用することができる。これらの技法は、トランスフォーメーション因子として *Agrobacterium tumefaciens* または *Agrobacterium rhizogenes*、プロトプラストの融合、注入、DNA のエレクトロポレーション、遺伝子銃アプローチによる DNA の導入、および他の可能性を使用して、植物細胞を T-DNA でトランスフォーメーションすることを含む ("Transgenic Plants", Leandro ed., Humana Press 2004, ISBN 1-59259-827-7 に総説)。

【0109】

植物細胞の *Agrobacterium* 介在性トランスフォーメーションの使用が集中的に研究され、EP120516 および Hoekema, The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 および An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 に十分に記載されている。ジャガイモのトランスフォーメーションについては、例えば、Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33、トマト植物のトランスフォーメーションについては、例えば米国特許第 5, 565, 347 号を参照されたい。

【0110】

Agrobacterium のトランスフォーメーションに基づく、ベクターによる単子葉植物のトランスフォーメーションについてもまた記載されている (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner and Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265)。単子葉植物のトランスフォーメーションのための代替系は、遺伝子銃アプローチによるトランスフォーメーションである (Wan and Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631)、プロトプラストのトランスフォーメーション、部分透過化細胞のエレクトロポレーション、ガラス繊維による DNA の導入である。トウモロコシのトランスフォーメーションは、特に、文献に繰り返し記載されている (例えば、国際公開公報第 95/06128 号、EP0513849、EP0465875、EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726 参照)。例えば、スイッチグラス (*Panicum virgatum*) などの他の草本のトランスフォーメーションも同様に記載されている (Richards et al., 2001, Plant Cell Reporter s 20, 48-54)。

【0111】

他の穀物種のトランスフォーメーションの成功もまた、例えばオオムギについて (Wan and Lemaux、上記参照; Ritala et al., 上記参照; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) およびコムギについて (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307) 記載されている。上記方法の全ては、本発明の目的に適する。

【0112】

外来核酸分子を有する遺伝的に改変された植物細胞および遺伝的に改変された植物は、とりわけ、それらが野生型植物細胞または野生型植物に自然に存在しない外来核酸分子を含むという事実により、該外来核酸分子を含まない野生型植物細胞または野生型植物と区別することができる。植物細胞または植物への外来核酸分子の組み込みは、例えばサザンブロット分析などの当業者に公知の方法により、または PCR により検出することができる。

【0113】

外来核酸分子は、好ましくは本発明に記載の植物細胞または本発明に記載の植物のゲノムに組み込まれ;外来核酸分子は、特に好ましくはゲノムに安定的に組み込まれる。本発明の文脈において、「安定的に組み込まれた核酸分子」という用語は、植物のゲノムへの核酸分子の組み込みを意味すると理解される。安定的に組み込まれた核酸分子は、問題の組み込み部位の複製時に、その組み込み部位に隣接する同種核酸配列と一緒に複製されることにより、複製された娘DNA鎖における組み込み部位が、複製のためのマトリックスとして作用する読み取り親鎖に存在するのと同じ核酸配列に囲まれているという事実により区別される。

【0114】

植物細胞または植物のゲノムへの核酸分子の組み込みは、遺伝的および／または分子生物学的方法により検出することができる。植物細胞のゲノムまたは植物のゲノムへの核酸分子の安定的な組み込みは、安定的に組み込みされた核酸分子が継代された子孫において、該核酸分子が親世代と同じゲノム環境に存在するという事実により区別される。植物細胞のゲノムまたは植物のゲノムへの核酸配列の安定的な組み込みの存在については、当業者に公知の方法により、とりわけサザンブロット分析、RFLP分析（制限フラグメント長多型）（Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750）、PCRに基づく方法、例えば、増幅フラグメント長多型の分析（AFLP）（Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160）を採用して、または制限エンドヌクレアーゼを用いて切断された増幅フラグメント（Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS）（Konieczny und Ausubel, 1993, The Plant Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753）を使用して検出することができる。

【0115】

本発明の文脈において、「ゲノム」という用語は、植物細胞に存在する遺伝物質の全てを意味すると理解される。当業者は、核だけではなく他の区画（例えば色素体、ミトコンドリア）もまた、遺伝物質を含むことを知っている。本発明に記載の核酸分子は、核ゲノムに、そして例えば色素体のような他の区画のゲノムにもまた組み込んでもよい。

【0116】

さらに、本発明に記載の植物細胞は、好ましくは以下の特徴の少なくとも一つにより天然の植物細胞と区別することができる:トランスジェニック植物細胞が、導入された本発明に記載の核酸分子の転写物を含むならば、これは、例えばノーザンブロット分析により検証することができる。好ましくは、本発明に記載の植物細胞は、導入された本発明に記載の核酸分子によりコードされる切断型アルテルナンスクラゼを含む。これは、例えば免疫学的方法により、特にウエスタンブロット分析により検出することができる。本発明に記載の植物細胞または植物が切断型アルテルナンスクラゼを含むならば、本発明に記載の植物細胞または植物はまた、それが、野生型細胞／野生型植物に比べてアルテルナンスクラゼ活性を含むという事実から好都合に識別することができる。アルテルナンスクラゼの酵素活性は、例えばLopez-Munguiaら（Annals New York Academy of Sciences 613, (1990), 717-722）に記載されたように、または本発明の実施例に詳記されたように測定することができる。

【0117】

さらに好ましい態様では、植物細胞は、ジャガイモ、サトウキビ、トウモロコシ、タバコ、サトウダイコン、サトウモロコシ、イネまたはコムギ由来の細胞である。

【0118】

トランスジェニック植物細胞は、インタクトな植物を得るために当業者に公知の技法により再生することができる。

【0119】

本発明に記載のトランスジェニック植物細胞の作製により得ることができる植物は、本

10

20

30

40

50

発明のさらなる主題である。

【0120】

大部分の植物において、光合成の間に植物内に糖の形態で形成した光合成産物は、問題のターゲット器官に、主にスクロースの形態で輸送される。スクロースは、本発明に記載の切断型アルテルナンスクララーゼの重合反応に関する基質であることから、切断型アルテルナンスクララーゼの発現に関して本発明に記載の核酸分子を採用して、通常、全ての植物、すなわち単子葉植物と双子葉植物の両方を改変することが可能である。

【0121】

本発明に記載の核酸分子の発現は、高いスクロース含量を有するか、またはスクロースを貯蔵するそれらの植物器官に特に好都合である。このような器官は、例えばサトウダイコンの根、サトウキビの茎、トウモロコシ植物の茎またはサトウモロコシの茎である。

10

【0122】

植物細胞におけるスクロースの生合成部位は、サイトソルである。対照的に、貯蔵部位は液胞である。サトウダイコンもしくはジャガイモの貯蔵組織に輸送されると、または種子の内乳に輸送されると、スクロースは、アポプラストを通過して移動しなければならない。したがって、三つの区画、すなわちサイトソル、液胞およびアポプラストの全てが、アルテルナンの合成のために本発明に記載の核酸分子を発現させるために適する。そのうえ、例えば細菌フルクトシルトランスフェラーゼのアミロプラスト発現により実証されたように、色素体もまた適する。これらのフルクトシルトランスフェラーゼは、その基質として同様にスクロースを必要とするが、アミロプラストにおける「アミロフルクタン」の形成を仲介することができた (Smeekens, Trends in Plant Science vol. 2, Nr. 8, (1997), 286-288)。国際公開公報第2006/072603号および国際公開公報第2006/063862号は、遺伝的改変が色素体にそれぞれムタンスクララーゼまたはデキストランスクラーゼの発現を誘導する、遺伝的に改変された植物細胞および植物に関する。

20

【0123】

デンプンの生合成およびデンプンの貯蔵が普通はアミロプラストで起こる、例えばジャガイモおよびトウモロコシなどのデンプン生成植物の場合に、アポプラスト、サイトソルまたは液胞における切断型アルテルナンスクララーゼの発現は、これらの区画におけるオリゴ糖および多糖の追加的な合成を誘導するであろうし、このことは、全体で収率が増加することを意味する。ここで利用されるのがADP-グルコースではなく、色素体性スクロースであることから、このことは色素体にもあてはまりうる。

30

【0124】

植物、特にジャガイモにおいて、アミロプラスト中で合成されたデンプンを、アポプラスト、サイトソルまたは液胞で合成されたアルテルナンと分離することが可能であることから、デンプンおよびアルテルナンを得るために、同じ植物を使用してもよい。

【0125】

さらに、アンチセンス構築物による酵素ADP-グルコースピロホスホリラーゼの阻害の結果として、塊茎または穀粒中のデンプン合成が完全に阻害されているトランスジェニックジャガイモおよびトウモロコシ植物が公知である。その代わりに、可溶性の糖、特にスクロースおよびグルコースは、例えばジャガイモの場合に塊茎に蓄積する (Muller-Rober et al., EMBO J. 11, (1992), 1229-1238)。基質としてスクロースを利用する切断型アルテルナンスクララーゼが発現する結果として、アルテルナンが、これらの植物のサイトソル、液胞またはアポプラストに生成する。

40

【0126】

本発明の別の態様では、これは、本発明に記載の植物細胞または植物が、野生型植物の対応する細胞に比べて低下したADP-グルコースピロホスホリラーゼ (AGPase) 活性を有する場合である。AGPaseをコードするDNA分子は、当業者に周知であり、例えば、Muller-Roberら (Mol. Gen. Genet. 224 (1) (1990), 136-146) に記載されている。AGPaseをコードするDNA分子の結果として、リコンビナントDNA技法 (例えば、アンチセンス、リボザイム、または共抑制アプローチ) を用いて、低下したAGPase活性を有する植物

50

を作製することが可能である。そのうえ、当業者は、低下したAGPase活性を有する、例えばトウモロコシ由来のAGPase突然変異体 (brittle-2およびshrunk-2) を知っている。

「低下したまたは減少した」という用語は、好ましくは対応する野生型細胞に比べて、少なくとも10%、さらに好ましくは少なくとも50%、そしてなおさらに好ましくは少なくとも80%のAGPase活性低下を意味する。

【0127】

本発明に記載の核酸分子を植物に発現させる場合、通常、アルテルナンスクラーゼの酵素活性を有する合成タンパク質を、植物細胞 (例えば、サイトソル、色素体、液胞、ミトコンドリア) または植物 (例えばアポプラスト) の任意の区画に位置させることが可能である。特異的区画における局在を達成するために、コード領域は、適切であれば、問題の区画における局在を確実にするDNA配列と連結していなければならない。このような配列は公知である (例えば、Braun, EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Sonnewald, Plant J. 1 (1991), 95-106; Rocha-Sosa, EMBO J. 8 (1989), 23-29, Neuhaus and Rodgers, 1998, Plant Molecular Biology 38: 127-144を参照されたい)。シグナル配列をタンパク質のコード領域と連結することは、融合されたシグナルペプチドの核酸配列およびそのタンパク質のコード配列が転写の間に一緒にオープンリーディングフレームを形成する (翻訳融合) ように果たされる。これは、融合された核酸配列の転写の結果であるRNAの翻訳後に、タンパク質のコード領域に加えてシグナルペプチドを含むタンパク質が形成されるからである。

【0128】

使用することのできる色素体シグナル配列は、通常、核にコードされるタンパク質の色素体への運び込みを確実にする任意のシグナル配列である。当業者は、色素体シグナル配列を得る方法を知っている。したがって、色素体シグナル配列が存在するかを調べるために、例えばコンピュータープログラムを採用して、タンパク質コード配列を調べることが可能である (1999, Emanuelsson et al., Protein Science 8, 978-984)。このような分析を行うコンピュータープログラムは、市販されているし、インターネット上で公的に利用することができる (例えば <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)。

【0129】

例えば、ハウレンソウ由来フェロドキシン:NADP+オキシドレダクターゼ (FNR) の色素体シグナル配列を使用することが可能である。この配列は、ハウレンソウ由来の色素タンパク質フェロドキシン:NADP+オキシドレダクターゼのcDNAの5'-非翻訳領域および隣接輸送ペプチド配列を含む (ヌクレオチド-171~+165; Jansen et al., Current Genetics 13 (1988), 517-522)。

【0130】

使用することのできる別の色素体シグナル配列は、例えばトウモロコシ由来waxyタンパク質の輸送ペプチド+成熟waxyタンパク質の最初のアミノ酸34個 (Klosgen et al., Mol Gen Genet. 217 (1989), 155-161)。さらに、成熟waxyタンパク質の最初のアミノ酸34個を有さない、トウモロコシ由来waxyタンパク質の輸送ペプチド (上記参照) を使用することもまた可能である。

【0131】

次の色素体シグナル配列の使用もまたありうる: リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ小サブユニットのシグナル配列 (Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Nawrath et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 12760-12764); NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼのシグナル配列 (Gallardo et al., Planta 197 (1995), 324-332); グルタチオンレダクターゼのシグナル配列 (Creissen et al., Plant J. 8 (1995), 167-175)、EPSPSシグナル配列 (米国特許第5, 188, 642号)。イネ由来dul遺伝子のシグナル配列を使用することが好ましい。

【0132】

リコンビナント核酸分子は、一つまたは複数、好ましくは二つのシグナル配列を含みうる。この文脈において、シグナル配列は、転写方向に順に隣接して存在してもよいし、さ

10

20

30

40

50

もなければ、それらは、それぞれの場合でスパーサーとして公知のものにより相互に分離されてもよい。二つのシグナル配列を含む色素体シグナル配列は、例えば、EP0508909およびEP0924299、米国特許第 5, 510, 471 号に記載されている。

【0133】

したがって、特に好ましい態様では、本発明に記載の核酸分子は、植物液胞への形成したタンパク質の輸送をもたらすために、液胞ターゲティング配列に連結され、そこで、アルテルナンの合成は、局所的に高いスクロース濃度が原因で特に高収率で起こりうる。液胞中の局在化を確実にするために、次の輸送タンパク質の一つを使用することが実行可能である：パタチンタンパク質のN末端配列（アミノ酸146個）（Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106)またはMatsuoka and Neuhaus, Journal of Experimental Botany 50 (1999), 165-174; Chrispeels and Raikhel, Cell 68 (1992), 613-616; Matsuoka and Nakamura, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 834-838; Bednarek and Raikhel, Plant Cell 3 (1991), 1195-1206; Nakamura and Matsuoka; Plant Phys. 101 (1993), 1-5に記載されているシグナル配列。

10

【0134】

色素体、ミトコンドリアまたはアポプラストにおける局在化を確実にするために、国際公開公報第00/47727号の25/26ページおよび米国特許出願第5, 510, 471号（色素体をターゲティングするためのOTPSグナルペプチド）に記載されている輸送ペプチドの一つを使用することもまた可能である。

【0135】

20

トランスジェニック植物は、通常、任意の植物種の植物、すなわち、単子葉植物および双子葉植物の両方でありうる。これらは、好ましくは有用な植物、すなわち食品用、またはその他の技術目的、特に工業目的のために、ヒトにより栽培される植物である。これらは、好ましくはデンプン貯蔵植物、例えば、ライムギ、オオムギ、カラスムギ、コムギ、キビ／ソルガム、サゴ、イネなどの穀物種、エンドウマメ、マローファットピー（marrow fat pea）、キャッサバ、ジャガイモ、トマト、アブラナ、ダイズ、アサ、アマ、タバコ、ヒマワリ、ササゲまたはクズウコン（arrowroot）、例えば、アマ、アサ、ワタなどの繊維形成植物、例えば、アブラナ、ヒマワリ、ダイズなどの油貯蔵植物、および例えば、マメ科植物、穀物、ダイズなどのタンパク質貯蔵植物である。本発明はまた、果樹およびヤシに関する。本発明はさらに、例えば、飼料草（fodder grass）およびイネ科牧草などの飼料植物（例えば、アルファルファ、クローバー、ライグラスなど）、およびトマト、レタス、チコリなどの野菜植物、ならびに例えば、チューリップおよびヒアシンスなどの観賞植物に関する。

30

【0136】

本発明に記載の植物は、最も好ましくはサトウキビ、サトウダイコン、サトウモロコシ、ジャガイモ植物、トウモロコシ、イネ、コムギまたはタバコである。

【0137】

本発明はまた、遺伝的に改変されていない野生型細胞／遺伝的に改変されていない野生型植物に比べてアルテルナンを合成する、遺伝的に改変された植物細胞および遺伝的に改変された植物を作製する方法に関する。

40

【0138】

本発明に記載の方法は、次の工程を含む：

- a) 切断型アルテルナンスクラゼをコードする核酸分子またはそのような核酸分子を含むベクターを植物細胞に導入すること、
- b) 段階a) で得られた植物細胞から植物を再生すること、および
- c) 適切であれば、段階b) で得られた植物を採用してさらなる植物を作製すること。

【0139】

切断型アルテルナンスクラゼをコードする核酸分子およびそのような核酸分子を含むベクターは、上に記載されている。

【0140】

50

遺伝的に改変された植物を作製する方法の工程 a) に記載の、植物細胞への外来核酸分子の導入に関して、これは、通常、植物細胞または植物に外来核酸分子を組み込むために適した核酸分子の任意の種類の導入の形態をとりうる。このような方法は、すでに上に記載されており、ここに同様に適用することができる。

【0141】

植物の再生は、本発明に記載の方法の工程 b) および／または c) の方法に依存して、当業者に公知の方法により果たすことができる（例えば、R.D. Hallによる"Plant Cell Culture Protocols", 1999, ed., Humana Press, ISBN 0-89603-549-2に記載されている）。

【0142】

さらなる植物の作製は、本発明に記載の方法の工程 c) または d) に記載の方法に依存して、例えば栄養繁殖（例えば挿し木、塊茎による、またはカルス培養およびインタクトな植物の再生による）または生殖的繁殖により果たすことができる。この文脈において、生殖的繁殖は、好ましくはコントロールされた条件で起こり、すなわち、特定の性質を有する選択された植物が、相互に交配され、繁殖される。選択は、好ましくは工程 b) または d) による方法に依存して、植物が工程 a) で導入された改変を含むように果たされる。

【0143】

本発明はまた、本発明に記載の植物細胞を含む、本発明に記載の植物の繁殖材料に関する。この文脈において、「繁殖材料」という用語は、栄養経路または生殖経路を経由して子孫を作製するために適した植物の構成要素を含む。栄養繁殖に適した材料は、例えば、挿し木、カルス培養、根茎または塊茎である。他の繁殖材料は、例えば、果実、種子、実生、細胞培養などを含む。繁殖材料は、好ましくはサトウキビ、サトウダイコン、サトウモロコシ、ジャガイモ植物、トウモロコシ、イネ、コムギまたはタバコ由来の繁殖材料である。

【0144】

さらなる局面では、本発明は、アルテルナンスクラージェの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質を製造する方法に関し、ここで、このタンパク質は、本発明に記載の植物に発現され、さらなる工程で抽出および単離される。このために、アルテルナンスクラージェの酵素活性を有するタンパク質が、タンパク質生合成の結果としてその細胞中に形成するまで、本発明に記載の核酸分子を含む本発明に記載の植物を適切な成長条件で成長および培養することができる。その後、本発明に記載のタンパク質は、アルテルナンスクラージェの酵素活性を有するタンパク質が存在する植物または植物の部分または植物の繁殖材料から、通例の方法により得ることができる。従来の方法の工程は、例えば植物材料を粉碎し、タンパク質を抽出および精製することを含む。

【0145】

好ましくは、アルテルナンスクラージェの酵素活性を有するタンパク質を製造する方法は、

- 1) a) 配列が、アルテルナンスクラージェの酵素活性を有する上記タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸分子であって、配列番号 1 もしくは 3 に示される配列を有する核酸分子から得ることができる核酸分子、または
- b) a) に記載の核酸分子を含むベクターもしくはプラスミドで植物細胞をトランスフォーメーションする工程、
- 2) 工程 1) で得られた植物細胞から植物を再生する工程、
- 3) タンパク質がその植物に発現され、続いて抽出および単離される工程を含む。

【0146】

アルテルナンスクラージェの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質のアミノ酸配列は、上にさらに示され、配列番号 2 を参照して定義されている。アミノ酸配列から開始して、当業者は、遺伝コードの縮重が原因で異なりうる、適切な核酸コード配列を決定す

ることができる。核酸コード配列を決定し、PCRによりそのような核酸配列を作製することは、培地中で成長しているトランスフォーメーションされた宿主細胞から、本発明に記載のタンパク質を製造する方法に、すでに上記されている。上記方法に採用されうるベクターおよびプラスミドに関して、問題の開示の参照は、他の箇所で行われている。さらに、上記方法に採用することができる宿主細胞および植物宿主細胞のトランスフォーメーションのための技法は、本明細書の他の箇所に広く開示されている。

【0147】

本発明はまた、回収されうる、本発明に記載の上記植物、例えば果実、種子、塊茎、葉または根茎または茎の植物部分にも関し、ここで、回収可能な植物部分は、本発明に記載の植物細胞を含む。

10

【0148】

さらなる局面では、本発明は、12000000～30000000g/molの範囲の、重量平均分子量Mwを有するアルテルナンに関する。

【0149】

本発明において、「アルテルナン」という用語は、グルコースユニットから構成される多糖を表す。グルコースユニットは、 $\alpha-1, 3$ および $\alpha-1, 6$ -グリコシド結合を経由して相互に連結し、ここで、これら2種類の結合は主として交互である。加えて、本発明に記載のアルテルナンは、分岐を含みうる。

【0150】

本発明に記載のアルテルナンは、好ましくは14000000～28000000g/mol、なおさらに好ましくは16000000～26000000g/mol、さらに好ましくは18000000～23000000g/mol、そして最も好ましくは19000000～23000000g/molの範囲の重量平均分子量Mwを有する。分子量は、応用実施例に極めて詳細に記載されているGPC-MALLS法により決定される。

20

【0151】

したがって、本発明に記載のアルテルナンは、ネイティブなアルテルナンについて記載されたよりも顕著に高い平均分子量を有し（ $Mw 10^6 \sim 10^7$ 、例えば国際公開公報第03/010177号）、また、国際公開公報第2004/023891号およびUS2006/0127328に記載されたよりも顕著に高い分子量もまた有する。

【0152】

本発明は、さらに、本発明に記載のアルテルナンの様々な製造方法に関する。

30

【0153】

最初に、本発明は、

1) スクロースを含む溶液を、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質と接触させ、そして

2) その溶液からアルテルナンを単離する、

本発明に記載のアルテルナンの製造方法を含み、

この方法において、このタンパク質は、

a) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして最も好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1295位のアミノ酸から1520位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するか、または

40

b) a) のアミノ酸配列と少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列（改変された配列）を有し、ここで、改変されたアミノ酸配列は、好ましくはa) の配列と同数のアミノ酸を有する。

【0154】

したがって、本発明は、無細胞性酵素調製物を採用したアルテルナンのin vitro製造方法に関する。無細胞でない系でのアルテルナンの合成に比較して、この方法は、反応条件

50

をよりよくコントロールでき、そして反応生成物がかなり純粋で、いともたやすく精製することができるという長所を有する。

【0155】

アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質は、例えば、上記の本発明に記載のベクターで宿主細胞をトランスフォーメーションし、適切な条件で宿主細胞を増殖させることにより得ることができる。次いで、発現されたタンパク質を宿主細胞から得ることができる。タンパク質抽出物は、例えばフレンチプレスを使用して宿主細胞を破壊することにより形成させてもよく、このタンパク質抽出物は、本発明に記載の方法に採用される。通常、宿主細胞からタンパク質を単離するための全ての公知の技法を使用することが可能である。E. coliは、宿主細胞として実に好ましい。

10

【0156】

アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質を得るためのさらなる変形において、そのようなタンパク質を分泌する微生物は、定常期に達するまでタンパク質の形成を許す無スクロース培地で培養される。遠心分離により細胞を培地から分離した後で、分泌された酵素は、上清から得ることができる。続いて、アルテルナンを合成するために、スクロースを含む溶液にこの酵素を添加することができる。

【0157】

上記方法に好ましくは使用されるタンパク質は、

a) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1300位のアミノ酸から1420位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するか、または

20

b) a) のアミノ酸配列と少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列（改変された配列）を有し、ここで、この改変された配列は、好ましくはa) の配列と同数のアミノ酸を有する、アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質である。

【0158】

なおさらに好ましくは、上記方法に使用されるタンパク質は、

30

a) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして最も好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1300位のアミノ酸から1340位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するか、または

b) a) のアミノ酸配列と少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列（改変された配列）を有し、ここでこの改変された配列は、好ましくはa) の配列と同数のアミノ酸を有する、

アルテルナンスクラゼの酵素活性を有するタンパク質である。

40

【0159】

さらに好都合な態様では、上記方法は、

a) 配列番号2の1位のアミノ酸から350位のアミノ酸までの領域に、好ましくはアミノ酸1～300の領域に、さらに好ましくはアミノ酸1～200の領域に、なおさらに好ましくはアミノ酸1～100の領域に、そして好ましくはアミノ酸1～40の領域に開始し、配列番号2の1310位のアミノ酸から1320位のアミノ酸までの領域に終結するアミノ酸配列を有するか、または

b) a) のアミノ酸配列と少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列（改変された配列）を有し、ここでこの改変

50

された配列は、好ましくはa)の配列と同数のアミノ酸を有する、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質を採用する。

【0160】

最も好ましくは、本発明に記載の方法に採用される、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質は、以下の配列の一つを有する：

- a) 配列番号2の40位のアミノ酸から1380位のアミノ酸を含むまでの配列、
- b) 配列番号2の40位のアミノ酸から1315位のアミノ酸を含むまでの配列、
- c) 配列番号2の40位のアミノ酸から1506位のアミノ酸を含むまでの配列、
- d) a)、b)またはc)の配列と少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、なおさらに好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%の同一性を有する配列（改変された配列）であって、この改変された配列が、好ましくはa)の配列と同数のアミノ酸を有する配列。

10

【0161】

さらに、上記方法はまた、上に定義された完全長アルテルナンスクララーゼに比べて、アミノ酸配列のN末端および／またはC末端が切断されており、対応する配列を有する本発明に記載の核酸分子によりコードされる、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する上記タンパク質（「切断型アルテルナンスクララーゼ」）の全てを採用してもよい。

【0162】

本発明の一態様では、本発明に記載の方法に採用される、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する本明細書上記および下記のタンパク質のN末端上流にメチオニンが位置する。この好ましい態様では、このように形成したメチオニンは、本発明に記載の方法に採用されるタンパク質の新しいN末端を形成する。このようなメチオニンは、通常はタンパク質をコードするRNAの翻訳に由来し、翻訳では核酸トリプレットATGによりコードされる。

20

【0163】

好ましくは、本発明に記載の方法から除外されるのは、US20060127328A1に記載されているアルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する切断型タンパク質、特にUS20060127328A1の段落[0089]ならびに図3Aおよび3Bに記載されているタンパク質である。したがって、好ましくは、本発明から除外されるのは、位置が添付の配列番号2を参照して定義されている、1～1425位、1～1349位、1～290位、342～1425位、および342～1290位のアミノ酸のタンパク質である。

30

【0164】

本発明に記載の方法の好ましい態様は、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する精製タンパク質を採用する。精製タンパク質は、そのタンパク質が合成される細胞の細胞構成要素を主として有さないタンパク質、ならびに／または多糖合成活性（例えばデキストランスクラーゼ）もしくは多糖分解活性を有するタンパク質、および／もしくは（多糖）アクセプターを含むタンパク質の混入を欠如したタンパク質を意味すると理解される。好ましくは、「アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する精製タンパク質」という用語は、少なくとも70%、好ましくは少なくとも85%、そして特に好ましくは少なくとも95%の純度を有するタンパク質を示す。

40

【0165】

アルテルナン製造のための精製タンパク質の使用は、多様な長所を有する。部分精製されたタンパク質抽出物を採用した方法に比べて、本発明に記載の方法の反応媒質は、タンパク質の遺伝的製造に使用される生成株（微生物）の残余を含まない。

【0166】

さらに、精製タンパク質の使用は、食品および製薬工業での使用に長所を伴う。反応媒質が確定された組成であり、その組成があらゆる不必要な構成要素を有さない結果として、その生成物もまた、その構成要素がより正確に確定されている。特に、これらのバイオテクノロジー生成物が痕跡量のトランスジェニック微生物を含まないはずであることから、このことにより、食品および製薬工業におけるこれらの生成物の承認手順が、かなり複

50

雑でなくなる。

【0167】

さらに、本発明に記載の方法を採用すると、例えば妨害性二次生成物を形成しうる他のホスト細胞酵素の妨害性二次活性による損失なしに、アルテルナンを高収率で製造することが可能である。

【0168】

本発明に記載の方法のさらなる好ましい態様では、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する、リコンビナント製造されたタンパク質が使用される。

【0169】

なおさらなる好ましい態様では、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質が支持体に固定化される。

【0170】

アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質の固定化は、合成反応の触媒である酵素を反応混合物から簡単な方法で回収することができ、再採用できるといふ長所を有する。酵素の精製は、通常、高価で時間がかかることから、酵素を固定化および回収すると、かなり節約となる。さらなる長所は、残留タンパク質を含まないという反応生成物の純度である。

【0171】

数々の支持体がタンパク質の固定化のために利用でき、支持体へのそれらの結合は、共有結合または非共有結合を介して可能である（概要についてはMethods in Enzymology 135, 136, 137を参照されたい）。広く使用されている支持体は、例えば、アガロース、アルギン酸塩、セルロース、ポリアクリルアミド、シリカまたはナイロンである。

【0172】

支持体は、例えば、不活性支持体、荷電した支持体、無機支持体または有機支持体でありうる。無機材料、例えば、多孔質ガラス、シリカゲル、アルミナ、ヒドロキシアパタイトもしくはは様々な金属酸化物、天然ポリマー、例えばセルロース、デンプン、アルギン酸塩、アガロースもしくはコラーゲン、または合成ポリマー、例えばポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、アクリル酸メチル、ナイロンもしくはオキシランが使用される適切な支持体である。固定化は、例えばファンデルワールス力、疎水性相互作用およびイオン結合などの物理的結合力により果たされる。アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質はまた、上述のように、共有結合により支持体に固定化してもよい。このために、支持体は、アミノ酸側鎖と等極結合を形成することのできる反応性基を示さねばならない。適切な基の例は、カルボキシル基、ヒドロキシル基およびスルフィド基である。例えば、多孔質ガラスの表面は、シランで処理し、続いてタンパク質と反応させることにより活性化させることができる。天然ポリマーのヒドロキシル基を臭化シアンで、そしてカルボキシル基を塩化チオニルで活性化し、続いて酵素と結合させてもよい。アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質を固定化する別の可能性は、それを三次元ネットワークに包含することである。一つの長所は、酵素が、ネットワークの中で遊離で未結合の形態で存在することである。周辺のマトリックスの小孔は、酵素を保持するように十分小さくしなければならない。

【0173】

本発明に記載の上記方法の好ましい態様では、スクロースを含む溶液は、スクロース濃度が、水の重量に基づき少なくとも12重量%、なおさらに好ましくは少なくとも15重量%の水溶液である。スクロース濃度は、水の重量に基づき、特に好ましくは15重量%～40重量%、さらに好ましくは15重量%～30重量%、そして最も好ましくは18重量%～25重量%である。

【0174】

スクロースを含む溶液を、アルテルナンスクララーゼの酵素活性を有するタンパク質と接触させる方法の工程1)は、好ましくは35～45℃、なおさらに好ましくは35～40℃の温度で行われる。

【0175】

本発明に記載の方法におけるpHは、好ましくは5～6、なおさらに好ましくは5.0～5.3である。

【0176】

この方法の工程1における反応時間は、好ましくは少なくとも12時間、さらに好ましくは少なくとも24時間、なおさらに好ましくは少なくとも36時間、特に好ましくは40～60時間に達する。

【0177】

さらなる好都合な変形では、この方法は攪拌せずに実施される。

【0178】

上記方法の一変形では、アクセプター分子は、方法の工程1)で添加される。本発明の文脈の中で、アクセプター分子は、切断型アルテルナンスクラゼが鎖伸長反応を触媒することができる分子を意味すると理解され、アルテルナン鎖がこのアクセプター分子上に形成する。反応開始時に反応混合物に添加することができるアクセプターは、好ましくは糖質または糖質誘導体である。糖質アクセプターは、好ましくはオリゴ糖または多糖、特に分岐多糖、例えば、デキストリン、グリコーゲンまたはアミロペクチン、好ましくは直鎖多糖、ならびに特に好ましくは、マルトース、イソマルトース、イソマルトトリオースおよびメチル- α -D-グルカンまたはゲントビオース (gentobiose) からなる群より選択される糖である。アルテルナン鎖の伸長がこれらのアクセプター上で起こるならば、これは、出発物質よりも高い分子量を有する生成物を生じる。マルトース、イソマルトース、イソマルトトリオースおよびメチル- α -D-グルカンを使用する場合に、外因性糖質アクセプターの不在で調製することのできるアルテルナンよりも低い分子量を有する生成物が得られ、その生成物は、本明細書においてオリゴアルテルナンと呼ばれる。調製されたオリゴアルテルナンの分子量サイズは、採用されるスクロース：アクセプター比に依存する。したがって、スクロース：アクセプター比が増加するにつれ、生成物の重合度は増加する。そのうえ、スクロース：アクセプター比は、オリゴアルテルナンの収率に影響する。したがって、イソマルトースアクセプターの場合に、スクロース：イソマルトース比が減少するにつれ、オリゴアルテルナンの収率は増加する。

【0179】

さらなる方法では、アルテルナンは、本発明に記載の宿主細胞または本発明に記載の植物もしくはその繁殖材料から、または回収された上記植物の部分からアルテルナンを抽出し、そして適切であればそれを単離することにより得られる。

【0180】

好都合な態様は、アルテルナンが、本発明に記載の植物から、特にそれらの液胞から単離され、精製されることを提供する。ジャガイモ、トウモロコシ、サトウダイコン、サトウモロコシまたはサトウキビ植物の貯蔵器官からアルテルナンを単離して得ることが特に好ましい。一態様では、この方法は、タービンミキサー、例えばワーリングブレンダーを採用して、より大量の植物細胞バイオマスを機械的に粉碎することを含み、ここで、粉碎は、好ましくは低温、例えば4℃で多量の水性媒質中で実施される。さらなる破壊は、物理的破壊法を採用して、例えば超音波、フレンチプレス装置により、ミルもしくはプレスを用いて、化学的破壊法を採用して、例えば凍結乾燥もしくは界面活性剤を使用してもしくは浸透圧の変化を使用して、または生物学的破壊法を採用して、例えば細胞壁を攻撃する酵素を使用して、もしくは酸/アルカリ処理により実施することができる。特に好ましい態様では、アルテルナンは、特に貯蔵器官の水性抽出物を製造し、続いてアルコールまたは低温、例えば4℃で沈殿させることにより得られる。

【0181】

本発明に記載の宿主細胞、本発明に記載の植物もしくはその繁殖材料、または回収可能な植物の部分から抽出/単離することによりアルテルナンを得る方法のさらなる変形は、当業者が、例えば、Loncin, Marcel Grundlagen der Verfahrenstechnik in der Lebensmittelindustrie [Basics of method engineering in the food industry]. Frankfurt/

10

20

30

40

50

Main: Verlag Sauerlander 1969 ; Tscheuschner, H.D. Grundzuge der Lebensmitteltechnik [Basics of food technology]. Hamburg: Behrs Verlag 2004 ; Kessler, H.G. Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik [Food and bioprocess technology]. Munich: Verlag A. Kessler 1996 ; Martin, A.M. Bioconversion of waste materials to industrial products. London, New York: Blackie Academic&Professional 1998などの公知の専門家の文献に見いだすことができる。

【0182】

本発明に記載の植物細胞／植物が、例えば、サトウダイコンもしくはサトウキビなどの糖貯蔵植物、またはその繁殖材料もしくは回収可能な植物の部分の形態をとるならば、例えば、Belitz & Grosch. Lehrbuch der Lebensmittelchemie [Textbook of food chemistry], Berlin Heidelberg, Springer-Verlag 1992, p.786に記載されたような、糖のための確立された抽出プロトコルを、当業者は利用することができる。

10

【0183】

本発明に記載の植物またはその繁殖材料からのアルテルナンの抽出および単離は、例えば、沈殿、抽出およびクロマトグラフィー法などの標準法により行うことができる。

【0184】

本発明に記載のホスト細胞、好ましくはE.coliにより製造された、本発明に記載のなおさらなる方法では、上記のようなアルテルナンスクラーゼの酵素活性を有する、本発明に記載のタンパク質（以下、アルテルナンスクラーゼ）は、スクロースを含む培地に分泌され、アルテルナンがその培地から単離される。

20

【0185】

このような方法は、国際公開公報第00／47727号に記載されている。好ましい態様を含むその開示の関連する部分、特に国際公開公報第00／47727号の28ページの3番目の段落から31ページの最初の段落を含むまでは、参照により明白に組み入れられ、その引用は、本発明の開示の一部である。

【0186】

本発明のアルテルナンは、溶液状態で透明から不透明の白色乾燥粉末である。添付の実施例に示すように、アルテルナンは、高い溶解度を示し、その溶液の粘度は低い。本発明のアルテルナンは、無臭で、すっきりした味（clean taste）である。さらに、本発明のアルテルナンは、微生物的に不活性で、非消化性で、低カロリーから無カロリーであり、非常に低いグリセミック指数および血糖応答を有する。

30

【0187】

一局面では、本発明は、本発明に記載のアルテルナンを食料または栄養補助食品の添加物として使用することに関する。本発明に記載の食料という用語には、ヒト用の食料および動物用食料または動物の餌が含まれる。さらに、食料という用語には、飲料が含まれる。栄養補助食品には、ヒト用および動物用の栄養補助食品が含まれる。

【0188】

食料および栄養補助食品において、本発明に記載のアルテルナンは、特に、乳化剤、アラビアゴム代用物、充填剤（filler）、膨張性薬剤（bulking agent）、脱コンパクト剤（decompacting agent）、増量剤、プレバイオティック剤および／または食物繊維として使用することができる。好ましい食料は、非限定的に炭酸飲料、ジュース、特に果汁飲料、スムージー、レモネード、アイスティー、ダイエット飲料、満腹飲料（satiety drink）、仕上がり済み飲料（finished drink）、スポーツ飲料、スタミナ飲料、栄養補助用の粉末飲料混合物などの飲料、パン、ケーキ、クッキー、ビスケット、クラッカー、クロワッサンなどのパン製品、麺類およびパスタ、栄養バー、エネルギーバー、朝食用バー、押し出しシリアル、朝食用シリアル、シリアルチップなどのスナック製品およびシリアル、乳幼児食、スープ、冷凍食品、すぐに食べられる食事（ready-to-serve meal）、ならびに代用食品である。

40

【0189】

好ましい態様では、本発明に記載のアルテルナンは、食物繊維として使用される。これ

50

に関連して、アルテルナンは、特に上述の食料における繊維を強化するために有用である。

【0190】

したがってさらなる局面では、本発明はまた、本発明に記載のアルテルナンを乳化剤、アラビアゴム代用物、充填剤、膨張性薬剤、脱コンパクト剤、増量剤、プレバイオティック剤および／または食物繊維として含む食料および栄養補助食品に関し、ここで、上述の例示的な食料が大いに好ましい。さらに好ましくは、本発明は、本発明に記載のアルテルナンを食物繊維として含む食料および栄養補助食品に関し、ここで、上述の例示的な食料が最も好ましい。

【0191】

なお別の局面では、本発明は、化粧品または医薬品への添加剤としての本発明に記載のアルテルナンの使用に関する。これらの製品において、アルテルナンは、乳化剤、充填剤、脱コンパクト剤、増量剤、および／または活性成分のための賦形剤として使用することができる。

【0192】

配列の説明

配列番号1：アルテルナンスクラージェの酵素活性を有するタンパク質をコードする、*Leuconostoc mesenteroides*由来核酸配列

配列番号2：*Leuconostoc mesenteroides*由来の、アルテルナンスクラージェの酵素活性を有するタンパク質のアミノ酸配列。示したアミノ酸配列は、配列番号1から得ることができる。

配列番号3：アルテルナンスクラージェの酵素活性を有するタンパク質をコードする合成核酸配列。示される配列のコドンの合成は、それが植物細胞におけるコドンの使用に適合するように実施された。示される核酸配列は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする。

配列番号4：合成プライマーGUS-ForwI

配列番号5：合成プライマーGUS-Rev

配列番号6：合成プライマーGUS-ForwII

配列番号7：合成リンカー配列Linker1

配列番号8：合成リンカー配列Linker2

配列番号9：合成プライマーNos-Forw

配列番号10：合成プライマーNos-Rev

配列番号11：合成オリゴヌクレオチド、配列番号3のヌクレオチド118の前の5'伸長

配列番号12：合成オリゴヌクレオチド、配列番号3の3'伸長

配列番号13：合成プライマーRLP3

配列番号14：合成プライマーRLP4

配列番号15：合成プライマーAlSuI-Forw

配列番号16：合成プライマーAlSuI-Rev

配列番号17：合成プライマーAlSuII-Forw

配列番号18：合成プライマーAlSuII-Rev

配列番号19：合成プライマーSIP6

配列番号20：合成プライマーSIP7

配列番号21：合成プライマーSIP1a

配列番号22：合成プライマーSIP2

配列番号23：合成プライマーSIP3

配列番号24：合成プライマーSIP4

配列番号25：合成プライマーSIP5

【0193】

応用例を参照して、本発明を本明細書の以下に説明するが、これは、添付の特許請求の

範囲に詳記されるような保護範囲を限定することを全く意図しない。

【0194】

1. 方法

1. 1 プラスミド構築物

全ての分子生物学的方法は、標準法により実施した (Sambrook & Russell Molecular cloning: a laboratory manual (third edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA (2001))。制限酵素は、New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USAから得た。

【0195】

pUbiGusNos

pML8 (国際公開公報第2006066969号) 由来のZea maysのユビキチンプロモーター (GenBankアクセッションナンバー94464, Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18, 1992, 675)) をPstIで切断し、プロモーターの5'末端がHindIII部位の側に来るような方向に、PstIで切断したpUC18 (GenBankアクセッションナンバーL09136) にライゲーションし、pUC18-Ubiをもたらした。E.coliのβ-グルクロニダーゼ (GUS) コード配列 (GenBankアクセッションナンバーS69414) をプライマーGUS-ForwI (配列番号4; GAAAGCTTG GCTGCAGGTCAGTCCCTTATGTTACGTCCTGTAG) およびGUS-Rev (配列番号5; CTGGTCCCGGGAATTCATTGTTTGCCTCCCTGCT) で、以下のPCR条件で増幅した。プラチナTaq DNAポリメラーゼハイフィデリティ (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) を使用して、各回94℃30秒、60℃30秒、72℃2分を5サイクル、および各回94℃30秒、73℃30秒、72℃2分を25サイクル、製造業者により記載された条件で続行。結果として生じたフラグメントをプライマーGUS-ForwII (配列番号6; TCGAGCTCGCGAAGCTTTGGCTGCAAGGT) およびGUS-Revを同条件で用いて再増幅し、XmaIで切断した。pUC18-UbiをBamHIで切断し、オーバーハングをT4 DNAポリメラーゼ (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) を用いて埋め、このフラグメントをXmaIで切断した。XmaIで切断されたGUS PCR生成物をこのベクターにライゲーションし、結果として生じたプラスミドをpUC18-Ubi-GUSと名付けた。pUC18-Ubi-GUSをXmaIで切断し、オーバーハングをリョクトウヌクレアーゼ (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) で除去し、このフラグメントをEcoRIで切断した。リン酸化されたオリゴヌクレオチドLinker1 (配列番号7; AACAACTCTCTCTGGCGCACCAATCGTCGGCTACAGCCTTCGGGAATTGCTGCAAGGTCGACGGATCCG) およびLinker2 (配列番号8; AATTCGGATCCGTCGACCTGCAAGCAATTCCTCGAGGCTGTAGCCGACGATGGTGCGCCAGGAGAGTTGTT) をアニーリングし、結果として生じたリンカーを、このXmaI/EcoRIで切断されたベクターフラグメントにライゲーションし、pUC18-Ubi-GUS-PLが生じた。プライマーNos-Forw (配列番号9; CGGATCGGATCCGTCGACCTGCAAGATCGTTCAAACAATTTGGCAAT) およびNos-Rev (配列番号10; CCACGGGAATTTCGATCTAGTAACAATAGATGACACCGCG) を使用して、Agrobacterium tumefaciens由来nosターミネーター (Depicker et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics 1, 561-573) をpML8から増幅した。PCR条件: 各回94℃30秒、58℃30秒、72℃3分を5サイクル、および各回94℃30秒、70℃30秒、72℃3分を25サイクル、プラチナTaq DNAポリメラーゼハイフィデリティ (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) を使用し、製造業者により記載された条件で続行。PCR生成物をBamHIおよびEcoRIで切断し、BamHI/EcoRIで切断されたpUC18-Ubi-GUS-PLにライゲーションし、それによりベクターpUbiGusNosが生じた。

【0196】

10

20

30

40

50

p S M 1 3

コドン最適化された配列をコードするアルテルナンスクラーゼは、Entelechon(Regensburg, Germany)で合成した。予測されたスプライシング部位およびポリ(A)シグナルを除去した。さらに、コドン最適化された配列には、それぞれ5または6ヌクレオチドよりも長いGC/A TストレッチおよびC A A T配列は存在しない。ある種の制限切断部位を除去または付加した。この合成配列は、5' 伸長G C G G C C G C G G C A G C C A T G [配列番号11]を有する、配列番号3由来のヌクレオチド118~6174を含むことにより、A T G翻訳開始コドン [下線部] は、配列番号3のヌクレオチド118上流に3' 伸長A C C G G A T A T C G C G G C C G C [配列番号12]と共に導入する。この合成配列は、E c o R I / H i n d I I Iを使用して、そして合成アルテルナンスクラーゼコード配列におけるH i n d I I I制限切断部位を使用して、p U C 1 9 (New England Biolabs; GenBankアクセションナンバーM77789)にクローニングし、これによりp R V L 1 1 0を得た。リン酸化プライマーR L P 3 (配列番号13; A G C T T G A A C C G G A T A T C G C G G C C G C)およびR L P 4 (配列番号14; A G C T G C G G C C G C G A T A T C C G G T T C A)をアニーリングし、結果として生じたリンカーを、アルテルナンスクラーゼコード配列下流のセンス方向になるようなリンカーの方向で、H i n d I I Iで切断したp R V L 1 1 0にライゲーションすることにより、停止コドン(R L P 3における下線部)を再導入した。結果として生じたプラスミドをp S M 1 2と名付けた。

【0197】

p S M 1 2由来アルテルナンスクラーゼの5'セグメントは、プライマーA l S u I - F o r w (配列番号15; C A A C T G A G C T C T G C A G A A T T C G G C T T G T T C G G G C A G C C A T G G A C A C C A A C T C C)およびA l S u I - R e v (配列番号16; G C C G G A G T T G T C G G T G C C G A A G C C C T T G C G)を用いて増幅した。PCR条件: 各回94℃30秒、65℃30秒、72℃3分を5サイクル、および各回94℃30秒、72℃30秒、72℃5分を25サイクル、製造業者により詳述された条件でプラチナTaq DNAポリメラーゼハイフィデリティ (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA)を使用。生成物をS a c Iで切断した。結果として生じたフラグメントは、アルテルナンスクラーゼの5'末端がユビキチンプロモーターの下流になるような方向で、S a c Iで開環したp U b i G u s N o sにクローニングし、これによりp U b i A l S u Iを得た。アルテルナンスクラーゼの3'末端は、p S M 1 2上でプライマーA l S u I I - F o r w (配列番号17; T C C T A C G A C A A G T C C T C C T T C G A G A A C G T G)およびA l S u I I - R e v (配列番号18; C T T A C G G A T C C A C T A G T A A C G G C C G C G A T A T C C G G T T C)を使用して増幅した。PCR条件: 各回94℃30秒、65℃30秒、72℃3分を5サイクル、および各回94℃30秒、72℃30秒、72℃5分を25サイクル、製造業者により詳述された条件でプラチナTaq DNAポリメラーゼハイフィデリティ (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA)を使用。結果として生じたフラグメントをK p n IおよびB a m H Iで切断し、K p n I / B a m H Iで消化されたp U b i A l S u Iにライゲーションし、これによりp S M 1 3を得た。

【0198】p S I 3

p S M 1 3のアルテルナンスクラーゼは、プライマーS I P 6 (配列番号19; G C C A T C G A G C A G C A G A T C T C C C T C A A G)およびS I P 7 (配列番号20; C A T A G G A T C C C T A C A C G C C G G A G G C G T C)を使用して増幅した。そうすることによって、T A G終結コドン(相補的な配列はS I P 7に下線)を配列番号3のヌクレオチド3945の後に導入した。PCR条件: 各回95℃10秒、71℃2分、68℃で1サイクルあたり3分+15秒の自己伸長、続いて72℃5分を30サイクル、プラチナTaq DNAポリメラーゼハイフィデリティ (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA)を使用し、製造業者により詳述されたように続行。PCR生成物をD r a I I I

およびBamHIで切断し、DraIII/BamHIベクターフラグメントpSM13にクローニングした。結果として生じたプラスミドをpSI3と名付けた。

【0199】

pSR16

pSM13をXbaIおよびSalIで切断し、アルテルナンスクラーズを有するフラグメントを、pAlsu-pET24a（国際公開公報第00/47727号）由来のXbaI-SalIベクターフラグメントにライゲーションすることによりpSR16を作製した。pSR16によりコードされるタンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～2057のN末端に一つのメチオニンを付加したものを含む。このタンパク質は、下記実施例では完全長アルテルナンスクラーズと呼ばれる。

10

【0200】

pSR17

pSI3をXbaIおよびSalIで切断し、アルテルナンスクラーズを含むフラグメントをpAlsu-pET24a（国際公開公報第00/47727号）のXbaI-SalIベクターフラグメントにライゲーションすることにより、pSR17をクローニングした。pSR17によりコードされるタンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～1315のN末端に一つのメチオニンを付加したものを含む。このタンパク質は、下記実施例では切断型アルテルナンスクラーズと呼ばれる。

【0201】

1. 2コムギ胚芽抽出物でのアルテルナンスクラーズの発現
in vitro転写

20

in vitro転写用のテンプレートは、PCRにより作製した。PCR条件は以下の通りであった：各回94℃10秒、71℃2分、68℃3分、続いて72℃5分を35サイクル。使用したポリメラーゼは、プラチナTaq DNAポリメラーゼハイフィデリティ（Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA）であり、製造業者により詳述されたように続行した。PCRは、pSM13で以下のプライマーを使用して実施した：SIP1a（配列番号21；TAAATACGACTCACTATAGGCAGAAATTCGGCTTGTTCGGGC）およびSIP2（配列番号22；AGTAACGGCCGCGATATCCGGTTTCAAGC）（生成物は、配列番号2のアミノ酸40～2057のN末端に一つのメチオニンが付加したものをコードする）；SIP1a-SIP3（配列番号23；CGAAGAGGCCGTCCTAGCGGAGGGAG）、ここで、TAG終結コドンは、配列番号3のヌクレオチド4518（相補的な配列はSIP3に下線）の後に組み込んだ（生成物は、配列番号2のアミノ酸40～1506のN末端に一つのメチオニンが付加したものをコードする）；SIP1a-SIP4（配列番号24；GGTGCCGGAAGCCCTAGCGGAGCTC）、ここで、TAG終結コドンは、配列番号3のヌクレオチド4140（相補的な配列はSIP4に下線）の後に組み込んだ（生成物は、配列番号2のアミノ酸40～1380のN末端に一つのメチオニンが付加したものをコードする）；SIP1a-SIP5（配列番号25；CCGGAGATGGAGTAGTACCTACACGCCGGA）、ここで、TAG終結コドンは、配列番号3のヌクレオチド3945（相補的な配列はSIP5に下線）の後に組み込んだ（生成物は、配列番号2のアミノ酸40～1315のN末端に一つのメチオニンが付加したものをコードする）。in vitro転写は、Ambion mMessage mMachine Kit（Ambion, Austin, TX, USA）を用いて、T7 RNAポリメラーゼを使用して製造業者により提供されたプロトコールに準拠して実施した。

30

40

【0202】

in vitro翻訳

製造業者により提供されたプロトコールに準拠して、Promega（Promega, Madison, WI, USA）からのコムギ胚芽抽出物で上記mRNAを翻訳した。

【0203】

アルテルナンスクラーズ量の測定

in vitro翻訳は、35Sラベルしたメチオニンの存在下で上記のように実施した。タン

50

パク質は、SDS／8％ポリアクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラフィーにより視覚化した。

【0204】

1. 3 ジャガイモプロトプラストにおけるアルテルナンスクラゼの発現

ジャガイモプロトプラストは、*in vitro*ジャガイモ植物の切断した葉材料を0.6 Mマンニトール中の0.5％セルラーゼおよび0.2％マセロザイム (Macerozyme) に入れて、暗条件の室温で一晩インキュベーションすることにより作製した。翌日に、125 μm および63 μmのストレーナで濾すことによりプロトプラストを採取した。プロトプラストを0.6 Mマンニトールで洗浄し、計数し、ペレットにし、MaMg培地 [MaMg₂ × 6H₂O、0.1％MES、pH 5.6] に1 mlあたりプロトプラスト2 × 10⁶個の濃度で懸濁した。プロトプラストを氷上で30分間インキュベーションした。トランスフォーメーションのために、典型的な体積40 μlのDNAをプロトプラスト10⁶個および1 mlの [40％PEG 6000、0.4 Mマンニトール、0.1 M Ca(NO₃) × 4H₂O、pH 7～9] と共に室温で20分間インキュベーションした。10 mlのB5 SMX培地 [Gamborg B5 塩類およびビタミン類 (Duchefa)、1％スクロース、0.4 Mマンニトール、1.25 g/lキシロース、0.1 mg/l 2,4-D、0.2 mg/l BAP、1.0 mg/l NAAを補充、pH 5.7] を段階的に添加した。プロトプラストを遠心分離により回収し、トランスフォーメーションされたプロトプラスト10⁶個あたり5 mlのB5 SMX培地に再懸濁し、23℃の暗条件で一晩インキュベーションした。遠心分離によりプロトプラストを回収した。アルテルナンスクラゼ活性を分析するために、ペレットを100 μl [100 mMクエン酸ナトリウム pH 6.5、1 mM EDTA、5 mM DTT] に再懸濁し、細胞を破壊するために液体窒素中で衝撃凍結 (shock-frozen) し、遠心分離した。さらなる分析のために上清を使用した。

【0205】

β-グルクロニダーゼ (GUS) 活性を分析するために、ペレットをGUS抽出緩衝液 [50 mM NaP緩衝液 pH 7、10 mM EDTA、0.1％SDS、0.1％トリトン X-100、10 mM β-メルカプトエタノール] 中でホモジナイズし、遠心分離した。さらなる分析のために上清を使用した。

【0206】

プロトプラストのトランスフォーメーション効率の測定

トランスフォーメーション効率は、合成されたGUSの量を定量することにより測定した。GUSの量は、終濃度1 mMの4-メチルウンベリフェリルグルクロニド (4-MUG) 中で100 μgのタンパク質抽出物をインキュベーションすることにより定量した。100 μlの反応溶液に900 μlの0.2 M Na₂CO₃を添加することにより、反応を停止した。様々な時点に試料を採取し、生成した4-メチルウンベリフェリル (MU) の量は、GUS活性の尺度として様々な時点での356 nmでの吸光および455 nmでの発光を用いて蛍光計で測定した。相対的なトランスフォーメーション効率は、100 μgのタンパク質抽出物あたり形成したMUの量の相対的な増加として表現した。

【0207】

1. 4 アルテルナンスクラゼ活性の測定

ポリマーを0.5％アルシアンブルー、3％HAc溶液で染色する以外は、アルテルナンスクラゼ活性は、国際公開公報第00／47727号に記載されているように測定した。

【0208】

1. 5 E.coliにおけるリコンビナント完全長および切断型アルテルナンスクラゼならびにアルテルナンの生成

プラスミド pSR16 (pSR16によりコードされるタンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～2057のN末端にメチオニンが付加したものを含む、完全長アルテルナンスクラゼ) および pSR17 (pSR17によりコードされるタンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～1315を含む、切断型アルテルナンスクラゼ) を、Sambrook & R

10

20

30

40

50

ussell, Molecular cloning: a laboratory manual (third edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA (2001)に記載されたような標準法に準拠して、E.coli BL 21 (DE3) (Stratagene) にトランスフォーメーションした。50mlのYT培地+50 µg/mlカナマイシンを、これらの細胞の前培養物1mlと共に接種し、OD₆₀₀が0.4になるまで37℃で成長させた。IPTGを終濃度5mMになるまで、グルコースを終濃度1%になるまで加え、培養物を室温で一晩成長させた。細胞を回収し(15分、4000rpm、4℃)、3mlの抽出緩衝液(100mMクエン酸ナトリウムpH5.2、1mMEDTA、10mMDTT)で再懸濁し、フレンチプレスを使用して2回破壊した。粗抽出物を13000rpmで10分間遠心分離し、上清を滅菌し(Sterivex GV 0.2 µM, Millipore)、次いでさらなる分析のために使用した。

10

【0209】

典型的には、エルレンマイヤー振盪フラスコからの切断型または完全長アルテルナンスクラゼのタンパク質抽出物5mlを、合計体積1リットル(100mM酢酸ナトリウムpH5.3、20%スクロース)で、37℃で48時間攪拌せずにインキュベーションした。終濃度50%までEtOHを添加し、4000rpmで10分間遠心分離し、アルテルナンのペレットを50%EtOHで3回洗浄し、そのペレットを37℃で乾燥することによりアルテルナンを得た。乾燥したアルテルナンを乳棒と乳鉢で摩砕した。

【0210】

1. 6 アルテルナンの分子量測定

アルテルナンをDMSOに濃度0.1%(w/v)で溶解させた。溶液を300rpmの振盪器(Eppendorf)上でRTで一晩インキュベーションし、次いで300rpmの加熱振盪器(Eppendorf)中で95℃で2時間加熱する。5 µm PTFE Whatman Puradisc(商標)13mmシリンジを通過させて試料を濾過した。以下の構成要素からなるDionexシステム(Dionex Corporation, Sunnyvale, USA)を使用してポリマーを分析した:P680 HPLCポンプ、AS50オートサンプラー、恒温カラムコンパートメントTCC-100。λ₀=690nmで、25.9~163.3°の角範囲の検出器15個を有するDAWN-EOS光散乱検出器(Wyatt Technology, Santa Barbara, USA)およびShodex RI-101 RI検出器(Shodex Denko K.K., Kanagawa, Japan)に結合したK5フローセルを使用して、検出を実施する。以下のカラムを経由してポリマーを分画する:WATERS Styragelガードカラム、Styragel 7、Styragel 6E、およびStyragel 2(Waters Corp, Milford, MA, USA)。溶液50 µlを注入する。分画は、DMSO中の90mM NaNO₃を溶出液として用いて、温度60°、流速0.5ml/minで実施する。試料の分子量分布は、質量計算プログラムBerry二次オーダー(Wyatt Technology, Santa Barbara, USA)を使用して、Astra V 5.1.7.3プログラムにより分析する。

20

30

【0211】

1. 7 粘度の測定

アルテルナン溶液の粘度は、一定の剪断速度39.6s⁻¹でBOHLIN製Gemini Advanced Rheometerを使用して、濃度の関数として23℃で測定した。試料は、23℃に予熱したプレート/コーン計測システムCP4°/40mmに移した。測定パラメーターは以下の通りである:剪断速度を設定した粘度計モード:先行剪断:101/s、60秒、設定持間10秒;一定の剪断速度39.6s⁻¹;10個のデータあたりの遅延時間および待ち時間:5秒、積分時間10秒;1ポイントあたりの時間20秒。同じ試料を2回測定する;過度に不安定な曲線の場合、多数のデータを得るために3回。一次曲線から明らかに逸脱したデータは、平均の計算については無視される。

40

【0212】

2. 実施例

実施例1:コムギ胚芽抽出物中のアルテルナンスクラゼのC末端欠失突然変異体の活性

コムギ胚芽抽出物中に発現させるためのアルテルナンスクラゼの欠失突然変異体を、方法に記載したように作製した。この活性およびコムギ胚芽抽出物中に生成したアルテルナンの量を測定した。

50

【0213】

図1は、コムギ胚芽抽出物中のアルテルナンスクララーゼの活性および量を示す。図1Aは、アルテルナンスクララーゼ活性、ならびにプライマーSIP1aおよびSIP5を使用して作製したアルテルナンスクララーゼ（すなわちこのタンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～1315のN末端に一つのメチオニンが付加したものを含む）がコムギ胚芽抽出物中で活性であることを示す。

【0214】

図1Bは、アルテルナンスクララーゼの量、ならびにコムギ胚芽抽出物中の生成効率が、タンパク質の分子量が減少につれて増加することを示す。対照は、RNA不在下のin vitro翻訳である。in vitro転写のためのテンプレートを作製するために使用されたプライマーを、線の上に示す。E. coliアルテルナンスクララーゼは、E. coliに発現された完全長アルテルナンスクララーゼである。マーカータンパク質の分子量は、図1Bの右側に示す。

【0215】

実施例2：ジャガイモプロトプラストにおけるアルテルナンスクララーゼのC末端欠失突然変異体の活性

ジャガイモプロトプラストに完全長アルテルナンスクララーゼを発現させるために、プロトプラスト10⁶個あたり30μgのpSM13を10μgのpUb i G u s N o sと共にトランスフォーメーションした。C末端切断型アルテルナンスクララーゼを発現させるために、プロトプラスト10⁶個あたり30μgのpSI3を10μgのpUb i G u s N o sと共にトランスフォーメーションした。対照として、プロトプラスト10⁶個あたり30μgのpBl u e s c r i p t I I K S (+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA; Gen BankアクセッションナンバーX52327)を10μgのpUb i G u s N o sまたは40μgのpBl u e s c r i p t I I K S (+)と共にトランスフォーメーションした。タンパク質の活性は、方法に記載したように測定した。分析されたタンパク質抽出物の量は、相対的なトランスフォーメーション効率により補正した。図2Aおよび2Bは、二つの異なる実験の結果を示す。pSI3にコードされるアルテルナンスクララーゼを異なる濃度でゲルに適用し、pSM13によりコードされるアルテルナンスクララーゼと比較した。pKS-GUSは、アルテルナンスクララーゼをコードしている配列でトランスフォーメーションされなかった陰性対照である。

【0216】

図2A/Bに示される実験は、ジャガイモプロトプラスト中のpSI3によりコードされるタンパク質（タンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～1315のN末端に一つのメチオニンが付加したものを含む）の活性が、pSM13にコードされるアルテルナンスクララーゼ（タンパク質は、配列番号2のアミノ酸40～2057のN末端に一つのメチオニンが付加したものを含む）の活性の5～40倍であることを実証している。

【0217】

実施例3：アルテルナンの分子量測定

1. 5に記載されたように、切断型アルテルナンスクララーゼおよび完全長アルテルナンスクララーゼ（比較実施例）を用いて、アルテルナンを生成させた。切断型アルテルナンスクララーゼを用いて生成したアルテルナンはまた、以下に「SR17」と略し、完全長アルテルナンスクララーゼを用いて生成したアルテルナンはまた、以下に「SR16」と略す。

【0218】

アルテルナンの分子量は、GPC MALLS（方法参照）により測定し、以下の表に示す。切断型アルテルナンスクララーゼを用いて生成したアルテルナンの重量平均分子量M_wは、21200000g/mol（SR17）であり、完全長アルテルナンスクララーゼ（SR16）を用いて生成したアルテルナンのM_wは、35300000g/mol（共に初濃度の1%）であった。

【0219】

【表 1】

試料	初濃度	Mw (g/mol) *10 ⁷	回収率 (%)
完全長アルテルナン スクラーゼから生成 したアルテルナン	1%	3.53	79.0%
SR16-15	15%	3.56	59.5%
SR16-13	13%	3.64	45.0%
SR16-12	12%	3.69	71.1%
SR16-11	11%	3.69	66.1%
SR16-10	10%	3.74	83.2%
SR16-9	9%	3.74	80.9%
SR16-8	8%	3.77	86.8%
SR16-7	7%	3.77	87.1%
切断型アルテルナン スクラーゼから生成 したアルテルナン (比較実施例)	1%	2.12	86.4%
SR17-15	15%	2.18	66.5%
SR17-13	13%	2.18	67.8%
SR17-12	12%	2.22	90.8%
SR17-11	11%	2.21	95.2%
SR17-10	10%	2.20	88.0%
SR17-9	9%	2.19	87.4%
SR17-8	8%	2.21	89.3%
SR17-7	7%	2.23	91.2%

【0220】

切断型アルテルナンスクラーゼから生成したアルテルナンは、¹³C NMR分光法を使用して測定した。このために、激しく攪拌しながら試料材料を重水素化DMSOに80℃で溶解させ、同じく80℃の温度でUnity INOVA 500分光計 (Varian Inc., USA) を使用して、測定周波数125.69MHzで定量測定条件 (逆ゲートデカップリング、緩和遅れ5秒) で測定した。測定時間は、約18時間であった。化学シフトはTMS (0ppm) に関係した。NMRスペクトルでの1, 3-および1, 6-結合のC1、C3およびC6炭素基の異なるシグナルの強度を使用して、このアルテルナンのα-1, 6-結合に対するα-1, 3-結合の平均比を0.41/0.59 (誤差0.02) と推定した。

【0221】

実施例4：アルテルナンの溶解度

1.5に記載したように、切断型アルテルナンスクラーゼおよび完全長アルテルナンスクラーゼ (比較実施例) を用いてアルテルナンを生成させた。切断型アルテルナンスクラーゼを用いて生成したアルテルナンはまた、以後「SR17」と略し、完全長アルテルナンスクラーゼを用いて生成したアルテルナンはまた、以後「SR16」と略す。

【0222】

アルテルナンを50℃で一晩7%~15% (w/v) の濃度に溶解させた。試料は5μm PTFE Whatman Puradisc (商標) 13mmフィルターシリンジを通過させて濾過し、溶解アルテルナン画分をGPC-MALLSにより分析した。異なる濃度の溶解アルテルナン画分を表1に示す。

【0223】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1. GPC-MALLS により測定された、異なる濃度の溶解アルテルナン画分

	切断型アルテルナンスクラージェ (SR17) から生成した アルテルナン	完全長アルテルナンスクラージェ (SR16) から生成した アルテルナン(比較実施例)
濃度 (w/v)	溶解率 (%)	溶解率 (%)
7%	91.2%	87.1%
8%	89.3%	86.8%
9%	87.4%	80.9%
10%	88.0%	83.2%
11%	95.2%	66.1%
12%	90.8%	71.1%
13%	67.8%	45.0%
15%	66.5%	59.5%

【0 2 2 4】

実施例 5：アルテルナンの粘度

1. 5 に記載したように、切断型アルテルナンスクラージェおよび完全長アルテルナンスクラージェ（比較実施例）を用いてアルテルナンを生成させた。切断型アルテルナンスクラージェを用いて生成したアルテルナンはまた、以後「SR17」と略し、完全長アルテルナンスクラージェを用いて生成したアルテルナンはまた、以後「SR16」と略す。

【0 2 2 5】

アルテルナンを 50℃で一晩 7%～15% (w/v) の濃度に溶解させた。試料は 5 μm PTFE Whatman Puradisc（商標）13mm フィルターシリンジを通過させて濾過した。方法に記載したように粘度を測定した。粘度を表 2 に示す。

【0 2 2 6】

【表 3】

表 2. 異なる濃度でのアルテルナンの粘度

	切断型アルテルナン スクラージェ (SR17) から生成した アルテルナン		完全長アルテルナン スクラージェ (SR16) から生成したアルテルナン (比較実施例)	
濃度 (w/v)	粘度 (mPa·S)	標準偏差	粘度 (mPa·S)	標準偏差
8%	9.4	1.9	17.7	1.8
9%	13.9	2.1	39.3	2.0
10%	29.9	3.2	120.6	3.8
11%	60.7	2.5	367.9	11.1
12%	240.3	9.3	927.2	7.4
13%	702.0	14.1	1722.8	25.5
15%	3605.7	94.5	6204.1	60.3

【0 2 2 7】

実施例 6：アルテルナンオリゴ糖に比したアルテルナンの発生に関するアクセプターの反応における差の証明

6. 1 材料と方法：

タンパク質の発現：

ベクター pA I - B - A l S u は、シグナルペプチドから N 末端のアミノ酸 39 個を欠如した、*Leuconostoc mesenteroides* N R R L B - 1 3 5 5 株由来アルテルナンスクラークの完全長コード配列（配列番号 2 のアミノ酸 40 ~ 2057 を含むタンパク質）が C 末端でオクタペプチド s t r e p タグに融合したものを有する。s t r e p タグをジペプチドリinker を経由してタンパク質に連結する。アルテルナンスクラークの発現は、t e t A プロモーター／オペレーターおよびリプレッサーの転写コントロール下にある。t e t A プロモーターは、同プラスミドにコードされる t e t リプレッサーにより厳密にレギュレーションされており、β-ラクタマーゼプロモーターから構造的に発現される。このように、アルテルナンスクラークの発現は、テトラサイクリンまたはアンヒドロテトラサイクリン A H T により効率的に化学誘導されるまで厳密に抑制される。

【0228】

発酵のために、ベクター pA I - B - A l S u を *E. coli* K 1 2 D H 5 α にトランスフォーメーションし、ベクターを内部にもつ細菌細胞を、アンピシリン（100 μg/ml）を補充した無機質培地中で O D 600 が 50 になるまで 37 °C で 28 時間選択的に成長させた（Horn et al., 1996）。アルテルナンスクラークの発現は、アンヒドロテトラサイクリン（0.2 mg/l）の添加により誘導し、O D 600 が 140 になるまで 25 °C で 22 時間さらに培養した。酵素を精製するために、細菌細胞を遠心分離（2000 rpm；20 分）により回収し、再懸濁緩衝液中に可溶化した（100 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.3）。

【0229】

高圧ホモジナイザーを用いて細胞を破壊した（2 サイクル、1200 bar）。細菌の核酸を D N a s e / R N a s e（3 mg/l）処理により分解し、不溶性細胞物質を回収するために、結果として生じた抽出物を遠心分離した（9400 g、4 °C 15 分）。0.22 μm Sterivex-GV（Millipore）を通過させて上清を濾過し、使用まで -20 °C で保存した。

【0230】

ベクター pA N 9 4 は、C 末端アミノ酸 742 個を欠如した C 末端切断版のアルテルナンスクラーク（配列番号 2 のアミノ酸 40 ~ 1315 を含むタンパク質）を有する。ベクター pA N 9 4 は、pA I - B ベクターから得られ、発現はまた、t e t A プロモーター／オペレーターおよびリプレッサーの転写コントロール下で起こる。発現のために、ベクター pA N 9 4 を *E. coli* K 1 2 D H 5 α にトランスフォーメーションし、ベクターを内部に有する細菌細胞を、アンピシリン（100 μg/ml）を補充した 400 ml の Y T 培地（Sambroock, Fritsch, Maniatis）中で O D 600 が 0.73 になるまで 37 °C で 4 時間選択的に成長させた。切断型アルテルナンスクラークの発現は、アンヒドロテトラサイクリン（0.2 mg/l）の添加により誘導した。5 mM I P T G および 1 % グルコースもまた添加した。さらなる培養は、O D 600 が 1.9 になるまで 22 °C で 25 時間行う。酵素の精製のために、遠心分離（4000 rpm；20 分）により細菌細胞を採取し、再懸濁緩衝液（50 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.3、2.5 mM D T T）中に可溶化した。フレンチプレスを使用して細胞を破壊した（3 サイクル）。不溶性細胞物質を回収するために結果として生じた抽出物を遠心分離した（33000 g、4 °C 15 分）。0.22 μm Sterivex-GV（Millipore）を通過させて上清を濾過し、使用まで -20 °C で保存した。

【0231】

活性のアッセイ：

フルクトースの放出を測定する、N A D P とカップリングした測光アッセイを使用して、活性をアッセイした。アルテルナンスクラーク変異体について、1 ユニットは、75 mM 酢酸ナトリウム pH 5.2 および 200 g/l スクロース中で 37 °C で 1 分間に 1 μmol のフルクトースの形成を触媒する酵素量と定義される。

【0232】

アクセプターの反応

アクセプターの反応を、75mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5.2および200g/lスクロース中に20℃で0.22ユニット/mlを有する合計体積20mlで行った。アクセプターとして、80、100、120g/lマルトースー水和物またはイソマルツロースをそれぞれ添加した。フルクトースの放出および残留スクロースを測定する、NADPとカップリングした測光アッセイを使用して、2.5時間、18.5時間、26時間、42.5時間、および48時間後にスクロースの変換をモニターし、反応を95℃で10分間インキュベーションすることにより停止した。

【0233】

グルカンの分析

スクロースの完全な枯渇（48時間）後に、アクセプターの反応を、WATERS Styragel カラム（Styragel 7、Styragel 6E、Styragel 2、およびStyragelガード）を用いたSEC-MALLS-RIにより分析する。溶出液として、ジメチルスルホキシド（DMSO）中の90mM硝酸ナトリウムを流速0.5ml/分で使用した。カラムを60℃に加熱した。試料は、以下のように調製した：10μlの試料を990μlのDMSOに添加した。希釈された試料を一晩回転させながら室温でインキュベーションした。その後、サーモミキサーで1400rpmで混合しながら、希釈された試料を95℃で2時間インキュベーションした。冷却後、試料を13000rpmで5分間遠心分離し、5μm PTFEシリンジフィルター（Whatman）を通過させて濾過した。濾過された試料50μlを注入した。可能であれば、アルテルナンおよびアクセプター生成物の屈折率（RI）のピーク面積を測定し、比較した。マルトースの場合、アルテルナンの量は低すぎ、したがって、ずっと感度の高い光散乱シグナルの比較だけが可能であった。

【0234】

6.2 結果

アルテルナンスクラーゼの完全長変異体により生成するアルテルナンの量は、切断型アルテルナンスクラーゼにより生成する量よりも高い。マルトースの場合のSEC-MALLS-RIの溶出図を図3に示す。図3は、10%マルトースを用いたアクセプター反応から生じる試料の溶出図（RIおよび光散乱（LS）シグナル）を示す（AlSu__truncated=切断型アルテルナンスクラーゼ、AlSu__complete=完全長アルテルナンスクラーゼ、AOS=アルテルナンオリゴ糖）。

【0235】

マルトースのアクセプター強度は高いことから、アルテルナンにより引き起こされるRIシグナルはない。光散乱シグナルの差は、異なる量のアルテルナンを示す。切断型アルテルナンスクラーゼを使用して、アクセプター反応において結果として生じる光散乱シグナルは、アルテルナンスクラーゼの完全長変異体の使用に比べてずっと低い。

【0236】

イソマルツロースの場合、溶出図とRIピーク面積の両方を、それぞれ図4および表3に示す。図4は、10%イソマルツロースを用いたアクセプター反応から生じる試料の溶出図（RIおよび光散乱（LS）シグナル）を示す（AlSu__truncated=切断型アルテルナンスクラーゼ、AlSu__complete=完全長アルテルナンスクラーゼ、AOS=アルテルナンオリゴ糖）。

【0237】

マルトースよりも低いアクセプター強度であることから、測定可能な量のアルテルナンを検出することができる。アクセプター反応において切断型アルテルナンスクラーゼを使用して、結果として生じたRIピーク面積および光散乱シグナルは、アルテルナンスクラーゼの完全長変異体の使用に比べてずっと低い。

【0238】

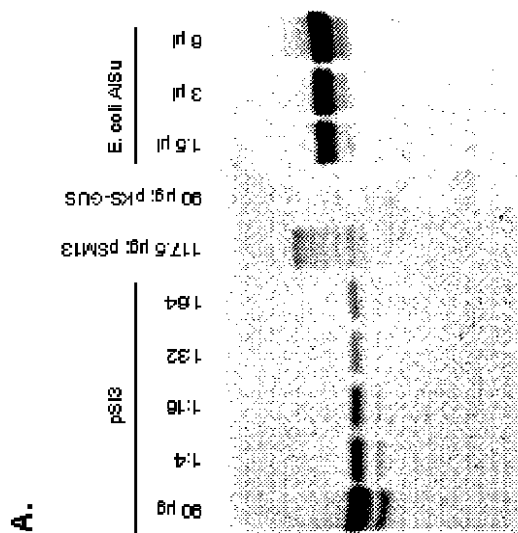
【表 4】

表 3: SEC-MALLS-RI 分析により測定された RI ピーク面積。アルテルナンの面積を総面積で割ることによって、アルテルナンの相対面積を計算した。

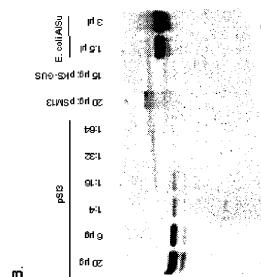
アルテルナン スクラーゼ 酵素	イソマルツロース の濃度	面積 μ RIU*分 アルテルナン	面積 μ RIU*分 オリゴ糖	面積 μ RIU*分 合計	相対面積 (%) アルテルナン
切断型	8%	0.10	31.93	32.03	0.30
切断型	10%	0.04	37.25	37.29	0.11
切断型	12%	0.03	43.59	43.61	0.06
完全長	8%	0.35	31.52	31.88	1.10
完全長	10%	0.22	33.37	33.60	0.67
完全長	12%	0.24	38.80	39.04	0.60

10

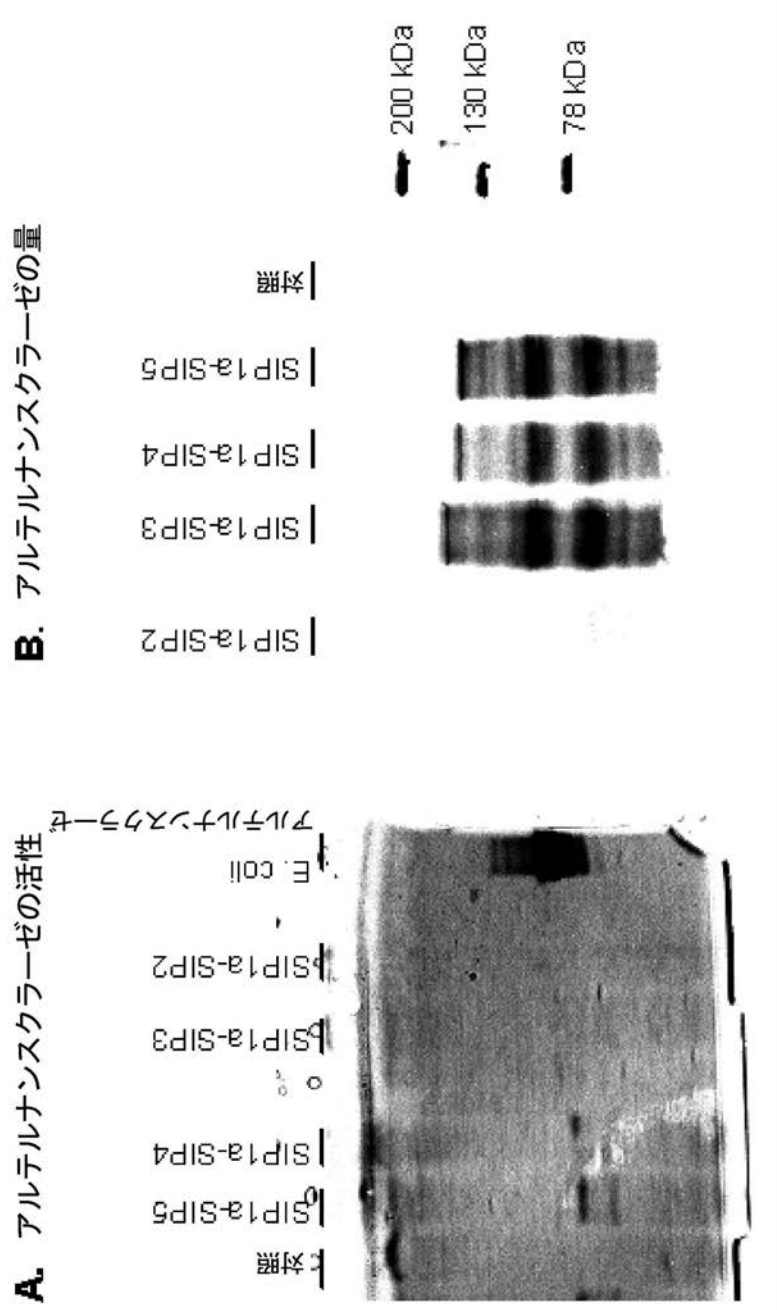
【図 2 A】



【図 2 B】

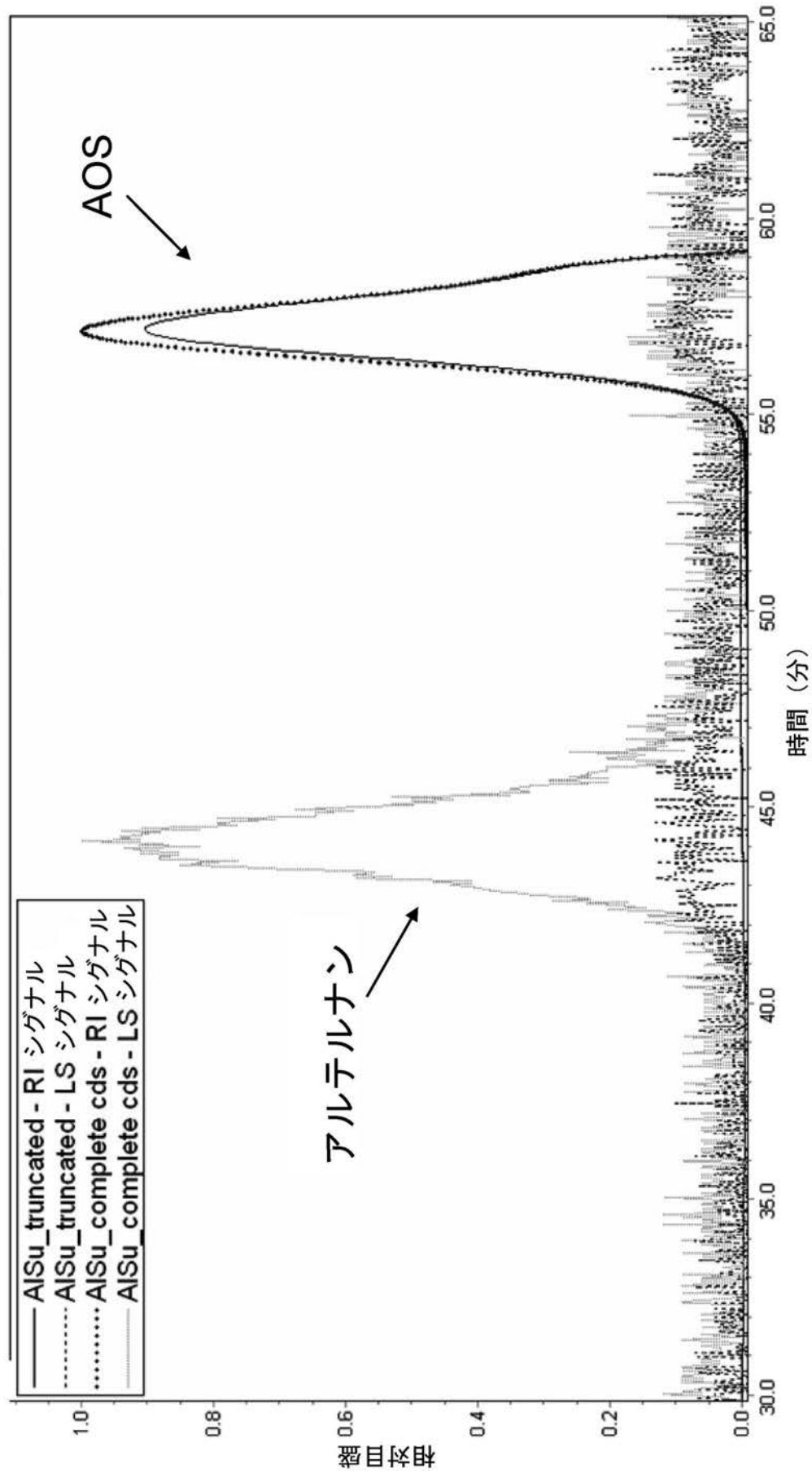


【図 1】

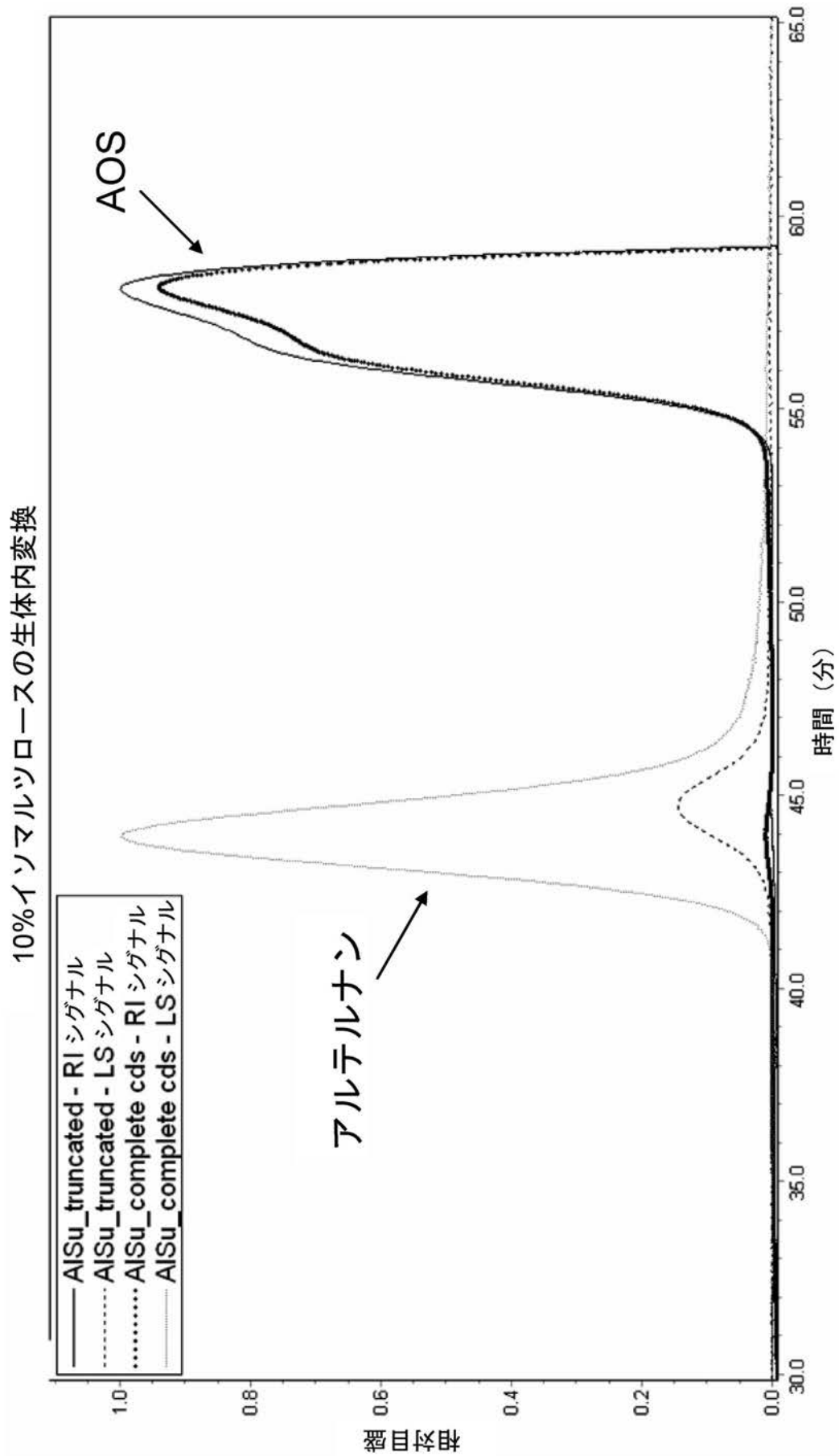


【図 3】

10%マルトースの生体内変換



【図 4】



【配列表】

[0005405321000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 19/04 (2006.01) C 1 2 P 19/04 Z

(72)発明者 ファン・ライプツィヒ, ロザリンド
ベルギー国、9 0 7 0 ヒュースデン、ヴェリングストラート 4 2

審査官 上條 肇

(56)参考文献 米国特許出願公開第2006/0127328 (US, A1)
特表2003-522520 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 5 4
C 1 2 N 9 / 1 0
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq