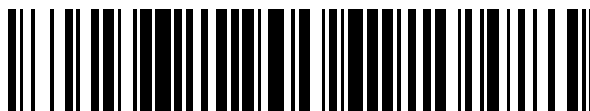


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 568**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12P 19/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05800037 .3**
96 Fecha de presentación: **28.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1811030**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **Método de estabilización, y azulado, de pigmento de antocianina usando un gen que codifica transferasa de acilo aromático a la posición 3' de la antocianina**

30 Prioridad:
29.10.2004 JP 2004315733

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2012

73 Titular/es:
Suntory Holdings Limited
1-40, Dojimahama 2-chome Kita-ku
Osaka-shi Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:
TANAKA, Yoshikazu;
KATSUMOTO, Yukihiisa;
MIZUTANI, Masako;
FUKUI, Yuko y
TOGAMI, Junichi

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

ES 2 385 568 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de estabilización, y azulado, de pigmento de antocianina usando un gen que codifica transferasa de acilo aromático a la posición 3' de la antocianina.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un método para alterar la antocianina hacia más azul y más estable usando una enzima que transfiere un grupo acilo aromático a las posiciones 3' y 5 de la antocianina o un gen que codifica dicha enzima, y puede aplicarse para la alteración y la estabilización de pigmentos de antocianina y a la alteración y la estabilización del color de las flores. Más específicamente, se refiere a un método para volver azul el color de las flores y estabilizarlo usando una acil(aromático)transferasa que transfiere un grupo acilo aromático a las posiciones 3' y 5 de antocianina derivada de plantas incluyendo *Gentiana triflora* var. *japonica* o un cDNA que codifica dicha enzima.

10 La presente invención se refiere a un método para alterar la antocianina hacia más azul y más estable usando una sola enzima que transfiere grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de la antocianina o un gen que codifica dicha enzima, y puede aplicarse para la alteración y la estabilización de pigmentos de antocianina y para la alteración y la estabilización del color de las flores.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La industria de las flores se esfuerza para desarrollar variedades de flores nuevas y diferentes. Un modo eficaz de crear tales nuevas variedades es la manipulación del color de las flores, en la que se han usado técnicas de reproducción clásicas para producir una amplia gama de colores para la mayoría de las variedades comerciales. Sin embargo, este enfoque se ha limitado por las restricciones de un acervo génico de una especie particular y por esta razón es raro que una especie individual tenga el espectro completo de variedades coloreadas.

20 El color de las flores se debe predominantemente a dos tipos de pigmentos: los flavonoides y los carotenoides. Los flavonoides contribuyen principalmente a una amplia gama de color del amarillo al rojo al azul, mientras que los carotenoides contribuyen principalmente a tonos cromáticos tales como naranja o amarillo. Los flavonoides que son una contribución principal al color de las flores son una clase de compuestos denominados antocianinas. El grupo cromóforo de las antocianinas es el de las antocianidinas, y, como antocianidinas principales, se conocen la pelargonidina, la cianidina y la delphinidina. Se sabe que las plantas tienen una amplia variedad de antocianinas, y su diversidad es una de las causas de la diversidad de colores de las flores. Ya se han determinado las estructuras de cientos de antocianinas, y el grupo hidroxilo en la posición 3 de la mayoría de las antocianinas se ha modificado con azúcares (Harbone, en *The Flavonoids*: 565, 1986).

25 La ruta biosintética para las antocianinas es común entre las plantas con flores hasta la biosíntesis de los 3-glucósidos (Holton et ál., *Plant Cell* 7: 1071, 1995), y subsiguientemente sufren diversas modificaciones tales como glicosilación, acilación y metilación en modos específicos para la especie y la variedad. Tales diferencias en los patrones de modificación en las variedades son una de las razones de las diversidades en la antocianinas, es decir las diversidades en los colores de las flores. Generalmente, cuantos más grupos acilo aromático modifiquen las antocianinas, las antocianinas se hacen más estabilizadas y más azules (Harbone, en *the Flavonoids*: 565, 1986; Norio Saito, *TANPAKUSITU KAKUSAN KOUSO* (Proteins, Nucleic Acids, Enzymes) 47: 202, 2002). Por otra parte, el color de las flores puede estar afectado por la formación de un complejo metálico de antocianinas, el efecto de copigmentación de compuestos flavonoides tales como flavonol y flavona y el pH de las vacuolas en las que se localizan las antocianinas (Forkmann, *Plant Breeding* 106: 1, 1991).

30 La biosíntesis de flavonoides incluyendo antocianidina se ha estudiado intensivamente. Todos los genes para enzimas implicadas en la biosíntesis de antocianinas se han clonado, y también se han obtenido genes para los factores de transcripción para las mismas. Por lo tanto, la modificación artificial de la expresión de estos genes puede alterar la estructura y la cantidad de flavonoides acumulados en las flores, y de ese modo puede cambiar el color de las flores. Existen algunos informes sobre la modificación de estructuras de antocianina y el color de las flores mediante una técnica de biología molecular y la transformación génica en plantas (Forkmann G. & Martens S. (2001), *Curr. Opin. Biotechnology*, 12: 155-160; Tanaka Y. & Mason J. (2003), En: Singh RP & Jaiwal PK (ed.) *Plant genetic engineering*, pp. 361-385, SCI tech publishing, Houston).

35 Un posible método para hacer azul el color de las flores es incrementar el número de grupos hidroxilo del anillo B de la antocianina. Una enzima que cataliza una reacción de hidroxilación de la posición 3' de la antocianina (flavonoide 3'-hidroxilasa: F3'H) y una enzima que cataliza una reacción de hidroxilación de la posición 3' y 5' de la antocianina (flavonoide 3',5'-hidroxilasa: F3'5'H) son importantes para alterar el color de las flores. En general, la pelargonidina (un grupo hidroxilo en el anillo B) está contenida en flores de color naranja a rojo, la cianidina (dos grupos hidroxilo en el anillo B) está contenida en flores de color rojo a magenta y la delphinidina (tres grupos hidroxilo en el anillo B) está contenida en flores de color púrpura a azul. En la mayoría de los casos, las especies de plantas que no tienen variedades de color púrpura a azul a menudo carecen de capacidad para producir delphinidina, y están representadas por las rosas, los crisantemos y los claveles.

- Para estas plantas, la creación de variedades de color púrpura a azul mediante biotecnología ha atraído atención desde hace mucho tiempo. De hecho, al expresar el gen de F3'5'H esencial para la producción de delphinidina, se producían claveles cuyo color era púrpura azulado (Tanaka Y. & Mason J. (2003), En: Singh RP & Jaiwal PK (ed.) Plant genetic engineering, pp. 361-385, SCI tech publishing, Houston), y se hacía posible producir delphinidina en los pétalos de las flores, pero sin embargo el color de las flores no ha sido totalmente azul. Así, a fin de hacer el color de las flores azul puro, no es suficiente la introducción del gen de F3'5'H solo, y pueden requerirse estrategias adicionales.
- Realmente, las antocianinas contenidas en las flores azules a menudo están modificadas con grupos acilo aromático a través de azúcares (Honda & Saito, Heterocycles 56: 633 (2002)). Por tanto, un posible método para hacer azul el color de las flores es modificar las antocianinas con grupos acilo aromático tales como grupos cafeoilo, grupos cumaroilo y grupos sinapoilo (Tanaka Y. & Mason J. (2003), En: Singh RP & Jaiwal PK (ed.) Plant genetic engineering, pp. 361-385, SCI tech publishing, Houston) .
- Generalmente, la antocianina se enrojece ligeramente mediante glicosilación, y la adición de grupos acilo aromático a través de azúcares hace azul el color de la antocianina (Forkmann, Plant Breeding 106: 1, 1991). Además, la antocianina es un compuesto inestable en soluciones neutras, y la estabilidad se mejora mediante la modificación con azúcares o grupos acilo (Forkmann, Plant Breeding 106: 1, 1991). Un experimento que usa antocianinas procedentes de dondiegos de día (*Pharbitis nil*) revelaba que las antocianinas aciladas a las que se unía un grupo acilo aromático tal como, por ejemplo, ácido cumárico o cafeico, mostraba un desplazamiento hipsocrómico (Dangle et ál., Phytochemistry 34: 1119, 1993).
- En cuanto a las antocianinas aciladas con grupos acilo aromático, se han presentado muchos ejemplos de aislamiento de la naturaleza, incluyendo awobanina (Goto y Kondo, Angew. Chern. Int. Ed. Engl. 30: 17, 1991) derivada de *Commelina communis* (Honda & Saito, Heterocycles 56: 633 (2002)). Por ejemplo, las antocianinas procedentes de flores azules tienen múltiples grupos acilo aromático según se representa por la cinerarina (derivada de cineraria), la gentiodelfina (derivada de *Gentiana triflora*), la antocianina azul cielo (derivada de *Pharbitis nil*), la ternatina (derivada de *Clitoria ternatea*) y la lobelinina (derivada de *Lobelia*) .
- La cinerarina (Goto et ál., Tetrahedron 25: 6021, 1984) derivada de cineraria (*Senecio cruentus*) tiene un grupo acilo alifático y tres grupos acilo aromático, y se presenta que estos grupos acilo aromático contribuyen a la estabilización de pigmentos en soluciones acuosas neutras (Goto et ál., Tetrahedron 25: 6021, 1984). La gentiodelfina (DEL 3G-5CafG-3' CafG), que es un pigmento principal de los pétalos de *Gentiana triflora*, tiene un 3-glicósido de delphinidina como la cadena principal básica y dos cadenas laterales que comprenden una molécula de glucosa y una molécula de ácido cafeico sobre los grupos hidroxilo en la posición 5 y la posición 3'. Se presenta que las cadenas laterales en la posición 5 y 3' comprendidas por un grupo acilo de azúcar contribuían a un tipo sándwich de apilamiento intramolecular, que da como resultado la estabilización de pigmentos en soluciones acuosas (Yoshida et ál., Tetrahedron 48: 4313, 1992). Por otra parte, se ha confirmado que entre las dos cadenas laterales de un grupo acilo de azúcar, el grupo glucosilacilo en la posición 3' en lugar de la posición 5 contribuye más fuertemente a la estabilización y el azulado de los pigmentos (Yoshida et ál., Phytochemistry 54: 20 85, 2000).
- La reacción de transferencia de acilo aromático se demostró en primer lugar en *Silene* (Kamsteeg et ál., Biochem. Physiol. Pflanzen 175: 403, 1980), una planta de la familia Caryophyllaceae, en 1980, y una actividad de acil(aromático)transferasa similar también se encontró en la fracción de enzima solubilizada de *Matthiola* (Teusch et ál., Phytochemistry 26: 991, 1986). Subsiguientemente, una antocianina 5-acil(aromático)transferasa (posteriormente en la presente memoria SAT) que transfiere grupos acilo aromático tales como ácido cafeico y ácido cumárico a azúcares en la posición 5 de antocianinas se aisló de *Gentiana triflora* (Fujiwara et ál., Eur. J. Biochem. 249, 45, 1997), y, basándose en las secuencias de aminoácidos internas de la enzima purificada, se aisló cDNA que codifica para SAT de *Gentiana triflora* (Fujiwara et ál., Plant J., 16, 421, 1998).
- Basándose en este gen, se aisló un homólogo de *Torenia* (WO 2005/017147) y, basándose por otra parte en la secuencia de aminoácidos conservada entre estas enzimas, se aisló un cDNA de *Perilla* para la enzima (3AT) que transfiere grupos acilo aromático al azúcar en la posición 3 de las antocianinas (Yonekura-Sakibara et ál., Plant Cell Physiol 41: 495, 2000). Usando el gen 3AT de *Perilla*, el gen 3AT se clonó de lavanda de la misma familia Labiatae (WO 1996/25500).
- Un gen de enzima que transfiere un grupo acilo a 3-rutinósido de antocianidina se ha obtenido de *petunia* (Publicación Nacional de la Versión Traducida (Kohyo) N° 2003-528603). Cuando el gen 3AT de *Perilla* o el gen 5AT de *torenia* se introducía en rosas, se formaba en los pétalos antocianina en la que se añadían grupos acilo aromático a la posición 3 o la posición 5, pero no alteraba significativamente el color de las flores hacia el azul, y los espectros de absorción máxima solo se desplazaban hacia la longitud de onda larga en aproximadamente 1-2 nm.
- Se cree que la razón de esto, según se presenta por Yoshida et ál. (Yoshida et ál., Tetrahedron 48: 4313, 1992), es que la acilación del anillo A o el anillo C, tal como la posición 3 o 5, no es completamente eficaz, y que la acilación en la posición 3' es necesaria para el azulado y la estabilización de una antocianina, y más preferiblemente es necesaria la acilación en múltiples posiciones incluyendo la posición 3'. Puesto que de hecho hay antocianinas que contienen un grupo acilo aromático ligado a un azúcar en la posición 3', puede postularse la presencia de una

enzima (3' AT) que cataliza una reacción de transferencia de un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3'. Sin embargo, no hay informes sobre una medida para la reacción de 3' AT y no se ha aislado hasta ahora enzima 3' AT o un gen que codifique para una 3' AT.

5 Todas las aciltransferasas presentadas hasta ahora actúan sobre la posición 3 o la posición 5 de la antocianina, y se ha presentado que la especificidad para el sitio de la reacción es alta (Fujiwara et ál., Plant J., 16, 421, 1998; Yonekura-Sakibara et ál., Plant Cell Physiol 41: 495, 2000). Por lo tanto, se creía que la acilación en la posición 3' usando una acil(aromático)transferasa conocida era imposible. No hay informes de una acil(aromático)transferasa que tenga una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a múltiples posiciones de las antocianinas. Por tanto, con el nivel de tecnología convencional, era imposible, por ejemplo, crear una planta recombinante y transferir grupos acilo aromático a azúcares en la posición 3' o múltiples posiciones incluyendo la posición 3' de la antocianina. Esto es, era imposible añadir grupos acilo aromático a azúcares en la posición 3' o múltiples posiciones incluyendo la posición 3' de una antocianina a fin de hacer más azul y más estable la antocianina, y para hacer más azul y más estable el color de las flores.

Documento de patente 1: WO 1996/25500

15 Documento de patente 2: WO 2005/017147

Documento de patente 3: Publicación Nacional de la Versión Traducida (Kohyo) N° 2003-528603

Documento no de patente 1: Harbone, en The Flavonoids: 565, 1986

Documento no de patente 2: Holton et ál., Plant Cell 7: 1071, 1995

Documento no de patente 3: Harbone, en The Flavonoids: 25 565, 1986

20 Documento no de patente 4: Norio Saito, TANPAKUSITU KAKUSAN KOUSO (Proteins, Nucleic Acids, Enzymes) 47: 202, 2002

Documento no de patente 5: Forkmann, Plant Breeding 106: 1, 1991

Documento no de patente 6: Forkmann G. & Martens S. (2001), Curr. Opin. Biotechnology, 12: 155-160

25 Documento no de patente 7: Tanaka Y. & Mason J. (2003), En: Singh RP & Jaiwal PK (ed.) Plant genetic engineering, pp. 361-385, SCI tech publishing, Houston '

Documento no de patente 8: Honda & Saito, Heterocycles 56: 633 (2002)

Documento no de patente 9: Forkmann, Plant Breeding 106: 1, 1991

Documento no de patente 10: Dangle et ál., Phytochemistry 34: 1119, 1993

Documento no de patente 11: Goto et ál., Tetrahedron 25: 6021, 1984

30 Documento no de patente 12: Yoshida et ál., Tetrahedron 48: 4313, 1992

Documento no de patente 13: Yoshida et ál., Phytochemistry 54: 85, 2000

Documento no de patente 14: Goto y Kondo, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30: 17, 1991

Documento no de patente 15: Kamsteeg et ál., Biochem. Physiol. Pflanzen 175: 403, 1980

Documento no de patente 16: Teusch et ál., Phytochemistry 26: 991, 1986

35 Documento no de patente 17: Fujiwara et ál., Eur. J. Biochem. 249, 45, 1997

Documento no de patente 18: Fujiwara et ál., Plant J., 16, 421, 1998

Documento no de patente 19: Yonekura-Sakakibara et ál., Plant Cell Physiol 41: 495, 2000

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

40 Según se describió en el informa anterior de Yoshida et ál., los grupos acilo aromático de la antocianina contribuyen a la estabilización y el azulado de la antocianina, y específicamente la cadena lateral del grupo acilo del azúcar en la posición 3' contribuye más fuertemente que la de la posición 5. Se cree que la cadena lateral del grupo acilo del azúcar en múltiples posiciones incluyendo la posición 3' hace a las antocianinas más azules y más estables. Por tanto, al usar una enzima que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina o múltiples posiciones incluyendo la posición 3', o un gen que codifica dicha enzima, parece ser posible modificar artificialmente las antocianinas y alterar las antocianinas hacia compuestos más estables, o incrementar el tono azulado de las

45

antocianinas.

5 Según se describió anteriormente, la transferencia de grupos acilo aromático a la posición 3' es muy eficaz para la estabilización y el azulado de antocianinas. Con ese propósito, es esencial una acil(aromático)transferasa que transfiera grupos acilo aromático a la posición 3' de una antocianina o un gen que codifica la enzima. Los presentes inventores han investigado con detalle las propiedades enzimáticas de la antocianina 5-acil(aromático)transferasa aislada de *Gentiana triflora*, y han demostrado que la 5-acil(aromático)transferasa de *Gentiana triflora* también tiene una actividad de transferencia de 3'-acilo. Por tanto, se aclara que, a pesar de una sola enzima, la enzima cataliza las reacciones de transferencia de acilo aromático a azúcares en las posiciones tanto 5 como 3' de las antocianinas.

10 Por tanto, la presente invención proporciona un método para hacer más azul y más estable una antocianina al añadir un grupo acilo aromático a posiciones 3' y 5 de la antocianina. También proporciona un método para hacer más azul y más estable el color de las flores al introducir y expresar un gen, que codifica una acil(aromático)transferasa, en plantas.

15 Por tanto, se divulga en la presente memoria (1) un método para acilar la posición 3' de antocianinas usando una enzima que transfiere un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3' de la antocianina o un gen que codifica la enzima.

(2) También se divulga en la presente memoria un método para estabilizar antocianinas al usar una enzima que transfiere un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3' de antocianina o un gen que codifica la enzima.

(3) También se divulga en la presente memoria un método para azular antocianinas al usar una enzima que transfiere un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3' de la antocianina o un gen que codifica la enzima.

20 (4) Además, se divulga en la presente memoria un método para acilar un pigmento de interés al expresar un gen que codifica una acil(aromático)transferasa que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina en plantas.

25 (5) Además, se divulga en la presente memoria un método para estabilizar un pigmento de interés al introducir un gen que codifica una acil(aromático)transferasa que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina, y acilar el pigmento de interés en plantas.

(6) También se divulga en la presente memoria un método para azular un pigmento de interés al introducir un gen que codifica una acil(aromático)transferasa que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina, y acilar el pigmento de interés en plantas.

30 (7) Además, se divulga en la presente memoria una planta obtenida mediante un método descrito en cualquiera de los anteriores (4) - (6), un producto de propagación vegetativa o una semilla de una planta, o una planta progenitora de una planta, un producto de propagación vegetativa o una semilla de una planta que tiene propiedades idénticas a las de una planta.

35 (8) También se divulga en la presente memoria un método para añadir grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina, que comprende usar una sola enzima que transfiere grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina o un gen que codifica la enzima.

(9) Además, se divulga en la presente memoria un método para estabilizar una antocianina, que comprende usar una sola enzima que transfiere grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina o un gen que codifica la enzima.

40 (10) Además, se divulga en la presente memoria un método para azular una antocianina, que comprende usar una sola enzima que transfiere grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina o un gen que codifica la enzima.

(11) Además, se divulga en la presente memoria un método de acuerdo con cualquiera de los anteriores (8) - (10) en el que una de las múltiples posiciones anteriores es la posición 3' de una antocianina.

45 (12) También se divulga en la presente memoria un método para acilar un pigmento de interés al expresar una sola enzima que tiene actividades de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina o un gen que codifica la enzima en plantas.

(13) También se divulga en la presente memoria un método para estabilizar un pigmento de interés al introducir una sola enzima que tiene actividades de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina o un gen que codifica la enzima, y acilar el pigmento de interés en plantas.

50 (14) También se divulga en la presente memoria un método para azular un pigmento de interés al introducir una sola enzima que tiene actividades de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina o un gen que codifica la enzima, y acilar el pigmento de interés en plantas.

- (15) Además, se divulga en la presente memoria un método de acuerdo con cualquiera de los anteriores (12) - (14) en el que una de las múltiples posiciones anteriores es un azúcar en la posición 3' de una antocianina.
- 5 (16) También se divulga en la presente memoria una planta obtenida mediante un método descrito en cualquiera de los anteriores (12) - (15), un producto de propagación vegetativa o una semilla de una planta, o una planta progenitora de una planta, un producto de propagación vegetativa o una semilla de una planta que tiene propiedades idénticas a las de la planta.
- 10 (17) También se divulga en la presente memoria un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como la indicada en el N° ID SEC: 4 o 6 y que tiene una actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3' de una antocianina, o un gen que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de 70% o más con una secuencia de aminoácidos y que tiene una actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3' de una antocianina, o un gen que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de 70% o más con la secuencia de nucleótidos que se indica en el N° ID SEC: 3 o 5 y que tiene una actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3' de una antocianina.
- 15 (18) También se divulga en la presente memoria un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como la indicada en el N° ID SEC: 4 o 6 y que tiene una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina, o un gen que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de 70% o más con una secuencia de aminoácidos y que tiene una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina, o un gen que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de 70% o más con la secuencia de nucleótidos que se indica en el N° ID SEC: 3 o 5 y que tiene una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en múltiples posiciones de una antocianina.
- 20 (19) También se divulga en la presente memoria el gen de acuerdo con el anterior (18) en el que una de las múltiples posiciones es un azúcar en la posición 3' de una antocianina.
- 25 (20) También se divulga en la presente memoria un vector que comprende el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19) .
- (21) También se divulga en la presente memoria un huésped transformado con el vector de acuerdo con el anterior (20).
- 30 (22) También se divulga en la presente memoria una proteína codificada por el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19) .
- (23) También se divulga en la presente memoria un método para producir una proteína que tiene una actividad de transferencia de un azúcar a la posición 3' de un flavonoide, método que comprende cultivar o hacer crecer el huésped de acuerdo con el anterior (21), y recoger la proteína del huésped.
- 35 (24) También se divulga en la presente memoria una planta en la que se ha introducido el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19), o una progenie que tiene propiedades idénticas a la misma, o un tejido de la misma.
- (25) También se divulga en la presente memoria una flor cortada de la planta de acuerdo con el anterior (24) o una flor cortada de una progenie que tiene actividades idénticas a la misma.
- 40 (26) También se divulga en la presente memoria un método para acilar la posición 3' de una antocianina, método que comprende usar el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19).
- (27) También se divulga en la presente memoria un método para estabilizar antocianina, método que comprende usar el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19).
- (28) También se divulga en la presente memoria un método para azular antocianina, método que comprende usar el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19).
- 45 (29) Además, se divulga en la presente memoria un método para expresar el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19) en una planta y acilar el pigmento de interés en la planta.
- (30) También se divulga en la presente memoria un método para estabilizar un pigmento de interés que comprende introducir el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19) en una planta y acilar el pigmento de interés en la planta.
- 50 (31) También se divulga en la presente memoria un método para azular un pigmento de interés que comprende introducir el gen de acuerdo con cualquiera de los anteriores (17) - (19) en una planta y acilar el pigmento de interés en la planta.

La presente invención proporciona un método para añadir grupos acilo aromático a azúcares en las posiciones 3' y 5 de una antocianina, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 Usar un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como la indicada en el N° ID SEC: 4 o 6, o un gen que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de 90% o más con la secuencia de aminoácidos que se indica en el N° ID SEC: 4 o 6 y que tiene una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en las posiciones tanto 3' como 5 de la antocianina.

BREVE EXPLICACIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra las fórmulas estructurales, los nombres y las abreviaturas de compuestos de antocianina relacionados con la presente invención.

- 10 La Fig. 2 muestra las fórmulas estructurales, los nombres y las abreviaturas de compuestos de antocianina relacionados con la presente invención.

- 15 La Fig. 3 es una gráfica que muestra cambios con el transcurso del tiempo de productos de reacción cuando se usaban 50 µM de DEL 3G-5G-3'G como el sustrato. En la figura, triG representa DEL 3G-5G-3'G, 5Caf representa DEL 3G-5CafG-3'G, 3'Caf representa DEL 3G-5G-3'CafG y 5,3'Caf representa gentiodelfina (DEL 3G-5CafG-3'CafG).

La Fig. 4 es una gráfica que muestra cambios con el transcurso del tiempo de productos de reacción cuando se usaban 100 µM de DEL 3G-5G-3'G como el sustrato. En la figura, triG representa DEL 3G-5G-3'G, 5Caf representa DEL 3G-5CafG-3'G, 3'Caf representa DEL 3G-5G-3'CafG y 5,3'Caf representa Gentiodelfina (DEL 3G-5CafG-3'CafG).

- 20 La Fig. 5 es una gráfica que muestra cambios con el transcurso del tiempo de productos de reacción cuando se usaban 200 µM de DEL 3G-5G-3'G como el sustrato. En la figura, triG representa DEL 3G-5G-3'G, 5Caf representa DEL 3G-5CafG-3'G, 3'Caf representa DEL 3G-5G-3'CafG y 5,3'Caf representa Gentiodelfina (DEL 3G-5CafG-3'CafG).

- 25 La Fig. 6 muestra el resultado de SDS-PAGE y transferencia Western de una proteína parcialmente purificada del pétalo de Gentiana triflora. La figura de la izquierda muestra el resultado de SDS-PAGE y la figura de la derecha muestra el resultado de transferencia Western frente al anticuerpo GAT4. En la figura, M representa un marcador molecular, el carril 1 representa el resultado de un precipitado saturado con sulfato amónico al 40 - 70% y el carril 2 representa el resultado de la fracción activa después de la columna Dyematrix.

La Fig. 7 muestra un resultado de simulación del color de las flores usando el líquido de expresión de Medio.

30 MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención proporciona un método para añadir grupos acilo aromático a azúcares en las posiciones 3' y 5 de una antocianina, comprendiendo el método la etapa de:

- 35 usar un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como la indicada en el N° ID SEC: 4 o 6, o un gen que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de 90% o más con la secuencia de aminoácidos que se indica en el N° ID SEC: 4 o 6 y que tiene una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en las posiciones tanto 3' como 5 de una antocianina.

- 40 Se sabe que las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que se ha modificado mediante la adición o delección de una pluralidad de aminoácidos o mediante la sustitución por otros aminoácidos mantienen la actividad enzimática similar a la de la proteína original. Por tanto, con tal de que se haya mantenido la actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3' y 5, también se prevén una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que se ha modificado mediante la adición o delección de uno o una pluralidad de aminoácidos, o mediante la sustitución por otros aminoácidos, o un gen que codifica la proteína.

- 45 También se describe en la presente memoria un gen que codifica una proteína que tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos de 70% o más, preferiblemente 90% o más, con la secuencia de aminoácidos de la acil(aromático)transferasa que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de antocianina derivada de Gentiana triflora, secuencia de aminoácidos que se indica en el N° ID SEC: 4 o 6, y que tiene una actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3' de la antocianina.

- 50 También se describen en la presente memoria casos que usan un gen que se hibrida a un DNA de gentiana que codifica una acil(aromático)transferasa para un azúcar en la posición 3' de antocianina bajo una condición relativamente suave de 5 x SSC y 50°C, y que codifica una proteína con una actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a la posición 3'.

Por otra parte, se describen en la presente memoria casos que usan un gen que se hibrida a un DNA de gentiana que codifica una 3'-acil(aromático)transferasa bajo una condición rigurosa, y que codifica una proteína con una

actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a la posición 3'.

Aunque la condición rigurosa que se usa en la presente memoria es, por ejemplo, 2 x SSC y 65°C, no se limita a esta condición ya que la condición de hibridación varía dependiendo de la longitud y la composición de las bases de DNA usadas. Genes seleccionados mediante tal hibridación incluyen los presentes en la naturaleza, por ejemplo genes derivados de plantas que contienen antocianina a la que se ha añadido un grupo acilo aromático en la posición 3', por ejemplo genes derivados de *Clitoria ternatea*, *lobelia* o *cineraria*, pero no limitados a los derivados de plantas. Por tanto, pueden usarse cualesquiera genes que codifiquen enzimas que tengan una actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a la posición 3' de antocianina. El gen seleccionado mediante hibridación puede ser cDNA o DNA genómico.

También es posible purificar acil(aromático)transferasas que transfieren grupos acilo aromático a la posición 3' de plantas tales como *lobelia* y *Clitoria ternatea* que contienen antocianina a la que se ha añadido un grupo acilo aromático a la posición 3' mediante el método de purificación de por sí de la enzima procedente de la *Gentiana triflora* o modificando el método. Por otra parte, al determinar la secuencia de aminoácidos de la enzima purificada, puede clonarse un gen que codifica dicha enzima.

Puede sintetizarse DNA que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos alterada usando una mutagénesis dirigida al sitio o un método de PCR conocidos. Por ejemplo, un fragmento de DNA del que se desea alterar una secuencia de aminoácidos puede obtenerse al obtener cDNA o DNA genómico mediante tratamiento con enzimas de restricción, y, con este como una plantilla, usar cebadores correspondientes a la alteración de la secuencia de aminoácidos deseada, y realizar la mutagénesis dirigida al sitio o un método de PCR para obtener un fragmento de DNA correspondiente a la alteración de la secuencia de aminoácidos deseada. A continuación, el fragmento de DNA introducido por alteración puede ligarse a un fragmento de DNA que codifica otra porción de la enzima de interés.

Alternativamente, a fin de obtener un DNA que codifica una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos acortada, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos más larga que la secuencia de aminoácidos de interés, por ejemplo una secuencia de aminoácidos de longitud completa, puede segmentarse con la enzima de restricción deseada y, si el fragmento de DNA resultante no codifica toda la secuencia de aminoácidos de interés, un fragmento de DNA correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la parte ausente puede sintetizarse y ligarse. Al expresar el gen así obtenido a la *Escherichia coli* (*E. coli*) o un sistema de expresión de levadura y medir la actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a la posición 3' en dichos *E. coli* o extracto de levadura, puede confirmarse que el gen obtenido codifica una acil(aromático)transferasa. También puede sintetizarse un DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de interés.

También se describen casos en los que acil(aromático)transferasa extraída de vectores recombinantes, específicamente vectores de expresión, y células huésped transformadas con dichos vectores. Como células huésped, pueden usarse procariontas o eucariotas. Como procariontas, pueden usarse células huésped conocidas convencionales incluyendo, por ejemplo, bacterias pertenecientes al género *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* tales como *Bacillus subtilis*, y similares. Como eucariotas, pueden usarse, por ejemplo, microorganismos eucarióticos, preferiblemente levaduras u hongos filamentosos.

Como la levadura, pueden mencionarse levaduras del género *Saccharomyces* tales como *Saccharomyces cereviceae* y, como los hongos filamentosos, pueden mencionarse microorganismos del género *Aspergillus* tales como *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*, y del género *Penicillium*. Por otra parte, pueden usarse células animales o células vegetales y, como las células animales, pueden usarse sistemas celulares tales como ratones, hámsteres y células humanas. Por otra parte, pueden usarse como el huésped células de insecto tales como células de gusano de seda o larvas de gusano de seda de por sí.

Los vectores de expresión pueden contener regiones de control de la expresión tales como promotores y terminadores y orígenes de replicación dependiendo de la especie del huésped en el que han de introducirse. Como los promotores de vectores de expresión para bacterias tales como *E. coli*, pueden usarse promotores conocidos convencionalmente tales como un promotor *trc*, un promotor *tac* y un promotor *lac*. Como los promotores para levadura, pueden usarse, por ejemplo, el promotor de glicerilaldehído-3-fosfato deshidrogenasa y el promotor PH05, y los promotores para los hongos filamentosos incluyen, pero no se limitan a, promotores tales como *amilasa* y *trpC*. Además, como los promotores para células animales, pueden usarse promotores virales tales como el promotor temprano de SV40 y el promotor tardío de SV40.

Los vectores de expresión pueden prepararse usando enzimas de restricción, ligasas y similares de acuerdo con métodos estándar. La transformación de células huésped con vectores de expresión también puede efectuarse de acuerdo con métodos convencionalmente conocidos. Como los vectores de expresión para plantas, pueden usarse vectores binarios tales como pBI121 cuando se usa *Agrobacterium*, y vectores de *E. coli* tales como pUC19 cuando se usan pistolas de partículas. Por otra parte, las células vegetales que se transformaban con dicho vector de expresión pueden seleccionarse con un gen marcador tal como un gen resistente a antibióticos, y se rediferenciaron usando una condición de una hormona vegetal adecuada, etc. para obtener plantas transformadas.

También se describe el uso de acil(aromático)transferasa capaz de transferir un grupo acilo aromático a la posición 3' de antocianina obtenida cultivando las células huésped así transformadas o plantas transformadas y recuperando y/o purificando del cultivo mediante métodos estándar tales como filtración, centrifugación, ruptura celular, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico.

5 Con el presente estado de la tecnología en la especialidad, es posible introducir un gen en plantas y expresar el gen de un modo constitutivo o específico de un tejido, y la expresión del gen de interés también puede suprimirse mediante el método antisentido o el método de cosupresión. Ejemplos de plantas que pueden ser transformadas incluyen, pero no se limitan a, rosas, crisantemos, claveles, calceolarias, ciclámenes, orquídeas, praderas, gencianas, fresias, gerberas, gladiolos, gipsófilas, calanchoes, lirios, pelargonios, geranios, petunias, torenias, tulipanes, arroz, cebada, trigo, colza, patatas, tomates, álamo, plátanos, eucaliptos, boniatos, sojas, alfalfa, altramuz, 10 maíz, coliflor y similares.

Por tanto, las usadas en el método de acilación aromática a la posición 3' de una antocianina no se limitan a aciltransferasas derivadas de *Gentiana triflora*, o cDNA o un gen que codifica la enzima procedente de *Gentiana triflora*, o una enzima recombinante obtenida al expresar el cDNA o el gen en un huésped tal como *E. coli*, y también 15 pueden usarse acil(aromático)transferasas para transferir grupos acilo aromático a la posición 3 de antocianina obtenida de una amplia variedad de otros organismos, cDNA o un gen que codifica las enzimas, o enzimas recombinantes obtenidas al expresar el cDNA o el gen en un huésped tal como *E. coli*.

Por otra parte, aunque la presente invención usaba ésteres de CoA tales como p-cumaroil-CoA y cafeoil-CoA como el donante para el grupo acilo, también pueden usarse p-cumaroil- o hidroxycinamoil-1-O-glucosa tal como cinamoil- 1-O-glucosa como el donante para el grupo acilo (Glassgen y Seitz, Planta 186: 582, 1992). 20

Ejemplos

La presente invención se explicará ahora con más detalle con referencia a realizaciones específicas. A menos que se especifique otra cosa, los procedimientos experimentales eran como se describe en Sambrook et ál., *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), PCT-JP96-00348 y los informes de Fujisawa et ál. (1997, 1998). 25

Ejemplo 1. Expresión de cDNA de aciltransferasa derivada de *Gentiana triflora* en *Escherichia coli* y purificación de proteína recombinante

Al segmentar un constructo pGeAT102 (Fujiwara et ál., *Plant J.*, 16, 421, 1998) para la expresión en *E. coli* de cDNA de aciltransferasa derivada de *Gentiana triflora* con NcoI/HindIII, un fragmento que contenía la región de codificación de la aciltransferasa y la región no traducida 3' se subclonó al sitio NcoI/HindIII del vector de expresión de *E. coli* pQE60 (QIAGEN) para obtener un constructo pQE8 para la expresión en *E. coli*. 30

Una cepa de *E. coli* JM109, en la que se introducía pQE8, se cultivó en un medio SB a 37°C hasta OD600nm = 0,8, y a continuación se cultivó adicionalmente a una temperatura reducida de 15°C durante 1 hora, a lo que se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,1 M para inducir la expresión del gen de aciltransferasa de *Gentiana triflora*. 35 Después de cultivar a 15°C durante 1 hora, las células se recogieron y se rompieron por sonicación y se usaron en la siguiente purificación. Las células rotas se sometieron a DE52 (Whatman), y se recogió la fracción de flujo pasante con Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM. Se realizó además desalado con sulfato amónico para recoger una fracción saturada con sulfato amónico al 40-60%, que se disolvió en una pequeña cantidad de Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) y se dializó usando Sephadex G-25 (Farmacia) equilibrada con Tris-HCl 20 mM (pH 7,5).

Después de que esto se cargara a DEAE-TOYOPEARL (TOSOH Corporation) y se eluyera con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 M contenido en Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), una actividad de 5-aciltransferasa para 3,5-diglucósido de delfinidina (DEL 3G-5G) estaba presente en la fracción eluida de NaCl 120 - 240 mM. La fracción activa se dializó contra un Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), y a continuación se cargó a Blue Sepharose (Farmacia). No se encontró actividad en la fracción de flujo pasante de Blue Sepharose, y la fracción adsorbida se eluyó con Tris-HCl 20 mM (pH 40 7,5) que contenía NaCl 1 M.

Subsiguientemente, esta fracción se adsorbió a Phenyl Sepharose (Farmacia), y se eluyó con un gradiente lineal de sulfato amónico de 40 a 0% en Tris-HCl 20 mM (pH 7,5). La fracción activa se eluyó con sulfato amónico al 0%. Esto se dializó contra Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), a continuación se dejó adsorber a una columna Dyematrix Orange A (Amicon), y se eluyó con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 0,3 M y DTT 0,5 mM. No se encontró actividad 50 en la fracción de flujo pasante, y la actividad solo se encontró en la fracción adsorbida, que se concentró con Centricon-10 (Amicon).

Ejemplo 2. Medida de la actividad de aciltransferasa recombinante

La actividad enzimática de la enzima recombinante obtenida en el Ejemplo 1 se midió con 3 tipos de derivados de delfinidina (3,5,3'-triglucósido de delfinidina (DEL 3G-5G-3'G), 3-glucosil-5-cafeoilglucosil-3'-glucósido de delfinidina (DEL 3G-5CafG-3'G), 3-glucosil-5-glucosil-3'-cafeoilglucósido de delfinidina (DEL 3G-5G-3'CafG)) mostrados en la Fig. 1 y la Fig. 2 como sustratos. La mezcla de reacción contenía tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 8,5), 55

cafeoil-CoA 0,2 mM, 250 mM de cada uno de los sustratos anteriores y 5 µl de la solución de enzima en un volumen total de 50 µl, y la reacción se llevó a cabo a 30°C durante 15 minutos. Un volumen igual de solución de acetonitrilo al 90% que contenía ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% se añadió a la mezcla de reacción para detener la reacción.

5 A fin de analizar los cambios de los productos de reacción con el transcurso del tiempo, 5 µl de una solución de enzima diluida 25 veces y cada uno de 50 µM, 100 µM o 200 µM de DEL 3G-5G-3'G se usaron como un sustrato, y la reacción se detuvo a los 2,5, 5, 10 y 20 minutos más tarde para analizar los productos. Los productos de reacción se analizaron con una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa usando una columna DE-41 (4,6 x 250 mm, Shodex). Las muestras se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo al 20-50% que contenía TFA al 0,5% a 0,6 ml/min durante 15 minutos, y a continuación elución isocrática a 0,6 ml/min durante 10 minutos, y se detectaron con SPD-M10A (SHIMAZU Corporation) a una longitud de onda de 250 - 600 nm. El tiempo de elución de HPLC y los espectros de absorción de los productos se compararon con los de muestras auténticas para identificar la estructura de los productos.

15 Como resultado de la reacción usando los tres tipos anteriores de compuestos como el sustrato, la aciltransferasa recombinante reaccionaba con todos los sustratos. Con DEL 3G-5CafG-3'G 250 mM como el sustrato, 94,1% se convertía en DEL 3G-5CafG-3'CafG. Por otra parte, con DEL 3G-5G-3'CafG 250 mM como el sustrato, 95,2% se convertía en DEL 3G-5CafG-3'CafG. Cuando se usaba DEL 3G-5G-3'G 250 mM como un sustrato, 7,2% se convertía en DEL 3G-5CafG-3'G a la que sólo se añadía un grupo acilo aromático en la posición 5, y 58,7% se convertía en DEL 3G-5CafG-3'CafG, mientras que solamente se producía la cantidad traza de DEL 3G-5G-3'CafG, a la que se sólo añadía un grupo acilo aromático en la posición 3' (1% o menos).

20 Cuando los cambios con el transcurso del tiempo de la reacción se medían usando una solución de enzima diluida con DEL 3G-5G-3'G como un sustrato, la cantidad producida de DEL 3G-5CafG-3'G y DEL 3G-5CafG-3'CafG se incrementaba de acuerdo con el tiempo de reacción. La cantidad de DEL 3G-5G-3'G era mucho menor que la de los otros dos sustratos, y apenas se detectaba cuando se incrementaban la cantidad del sustrato y el tiempo de reacción (Fig. 3, Fig. 4 y Fig. 5). Este resultado está de acuerdo con los obtenidos cuando la solución de enzima no diluida se hacía reaccionar con DEL 3G-5G-3'G.

25 A partir del resultado anterior, se revelaba que una proteína recombinante obtenida al expresar el gen de una aciltransferasa derivada de Gentiana triflora en E. coli tiene una actividad de transferencia de grupos acilo a azúcares tanto en la posición 5 como en la posición 3' de la antocianina. Por tanto, aunque un informe previo (Fujiwara et ál., Plant J., 16, 421, 1998) mostraba que se creía que esta enzima transfería un grupo acilo aromático solamente a la posición 5 de la antocianina, la presente invención revelaba que esta enzima transfiere grupos acilo aromático a azúcares en la posición tanto 5 como 3' de la antocianina. Por otra parte, considerando los productos de reacción con DEL 3G-5G-3'G como un sustrato, es probable que la adición de un grupo acilo aromático a la 5-glucosa preceda a la adición a la 3'-glucosa.

Ejemplo 3. Purificación de grupo acilo aromático transferasa derivada de Gentiana triflora

35 La proteína recombinante obtenida al expresar un cDNA de gentiana de una acil(aromático)transferasa en E. coli resultaba tener una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a glucosas en la posición 5 y 3' de una antocianina (Ejemplo 2). A fin de confirmar que una enzima presente en la naturaleza en pétalos de gentiana tiene actividades tanto de la 5-acil(aromático)transferasa como de la 3'-acil(aromático)transferasa, esta enzima se purificó de pétalos de gentiana. En una serie de purificación, que se describe en el Ejemplo 2, cada fracción eluida de la cromatografía en columna se midió con respecto a la actividad de 5-acil(aromático)transferasa con DEL 3G-5G como un sustrato y con respecto a la actividad de 3'-acil(aromático)transferasa con DEL 3G-5G-3'G como un sustrato.

45 De acuerdo con un informe de Fujiwara et ál. (Fujiwara et ál., Eur. J. Biochem. 249: 45, 1997) en el que se purificaba una 5-acil(aromático)transferasa de gentiana, se obtenía fracción saturada con sulfato amónico al 40 - 70% de extracto de aproximadamente 100 g de pétalos de Gentiana. Esta fracción se dializó con Sephadex G-25 (Pharmacia) equilibrada con Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) que contenía fluoruro de p-aminofenilmetanosulfonilo (APMSF) 10 µM y DTT 1 mM (en lo sucesivo denominado en la presente memoria el tampón de Tris), a continuación se cargó a MONO Q (Pharmacia) equilibrada con el tampón de Tris. La fracción no adsorbida se lavó con el tampón de Tris, y a continuación se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0 - 0,5 M NaCl en el tampón de Tris a un caudal de 5 ml/min durante 20 minutos. La actividad de transferencia de un grupo acilo aromático estaba presente en las fracciones eluidas con NaCl 0,2 - 0,42 M.

55 Las fracciones activas se cargaron a HiTrap Blue (Pharmacia) y se lavaron intensivamente en el tampón de Tris, y a continuación la fracción adsorbida se eluyó con un tampón de Tris que contenía NaCl 0,9 M. La actividad estaba presente en la fracción adsorbida. A continuación, la fracción activa se cargó a una DEAE-Sepharose (Pharmacia). Después de lavar intensivamente con el tampón de Tris, la fracción adsorbida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en el tampón de Tris a 0,5 ml/min durante 60 minutos. La actividad se encontró en las fracciones eluidas con NaCl 0,22 - 0,3 mM. La fracción activa concentrada con Centricon 30 (Amicon) se cargó a una columna Dyematrix Red (Amicon). Después del lavado de la fracción no adsorbida con el tampón de Tris, la fracción adsorbida se eluyó con el tampón de Tris que contenía KCl 1,5 M. Cuando la proteína eluida se sometía a SDS-

PAGE, solo se detectaba una única banda a un peso molecular de 52 kDa que es un peso molecular estimado para una antocianina 5-aciltransferasa.

En una serie de purificaciones, cada fracción eluida de la cromatografía en columna se midió con respecto a la actividad de 5-acil(aromático)transferasa con DEL 3G-5G como un sustrato y con respecto a la actividad de 5,3'-acil(aromático)transferasa con DEL 3G-5G-3'G, y las fracciones con la actividad más alta en ambas reacciones de aciltransferasa eran completamente idénticas. Cuando se medían las actividades para tres tipos de sustratos (DEL 3G-5G-3'G, DEL 3G-5CafG-3'G, DEL 3G-5G-3'CafG) usando la fracción activa que se adsorbía a la columna Dyematrix Red como en el Ejemplo 2, todos los sustratos reaccionaban y exhibían características similares a las del Ejemplo 2.

Después de que la fracción activa que se absorbía a la columna Dyematrix Red se separara con electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, la proteína separada se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham) de acuerdo con el método descrito anteriormente (Towbin et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350, 1979), y se cruzó contra un anticuerpo específico para una 5-antocianina aciltransferasa de gentiana (Fujiwara et ál., Eur. J. Biochem. 249: 45, 1997) en una transferencia Western, que detectaba una banda clara (Fig. 6).

Estos resultados revelaban que la actividad de antocianina 3'-aciltransferasa y la actividad de antocianina 5-aciltransferasa presentes en pétalos de gentiana se derivaban de una sola proteína.

Ejemplo 4. Estabilización y azulado de antocianina con una aciltransferasa derivada de Gentiana triflora

Ya se ha presentado la estabilidad relativa de DEL 3G-5G-3'G, DEL 3G-5CafG-3'G, DEL 3G-5G-3'CafG y DEL 3G-5CafG-3'CafG; en una solución acuosa de pH 6,5, DEL 3G-5CafG-3'CafG es la más estable y refractaria a la decoloración, seguida por DEL 3G-5G-3'CafG, DEL 3G-5CafG-3'G y DEL 3G-5G-3'G en este orden (Yoshida et ál., Phytochemistry 54: 85, 2000). En cuanto al máximo de absorbancia, la de DEL 3G-5CafG-3'CafG es la longitud de onda más larga seguida por DEL 3G-5G-3'CafG, DEL 3G-5CafG-3'G y DEL 3G-5G-3'G en este orden. Por tanto, este informe muestra que DEL 3G-5CafG-3'CafG exhibe el mayor azulado en superficie seguida por DEL 3G-5G-3'CafG (Yoshida et ál., Phytochemistry 54: 85, 2000).

A fin de estimular el color de las flores cuando se introducía en gen para antocianina 5,3'-aciltransferasa de gentiana en rosas y se acumulaba DEL 3G-5CafG-3'CafG en pétalos de rosa, se medía el desarrollo de color de un pigmento purificado suspendido en jugo exprimido de pétalos de rosa (cv. Medeo). En cuanto a los pigmentos purificados, se usaron DEL 3G-5CafG-3'CafG y, como un control comparativo, DEL 3G-5G, 3,5-diglucósido de cianidina (CYA 3G-5G), 3,5-diglucósido de pelargonidina (PEL 3G-5G) y 3,5-diglucósido de malvidina (MAL 3G-5G). Alrededor de 20 g de pétalos de Medeo congelados a -80°C durante más de una hora se exprimieron mediante una exprimidora de ajos de uso doméstico, y se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto para retirar el residuo de los pétalos, y el sobrenadante se preparó como el jugo exprimido.

Veinte µl de solución de DMSO 50 mM de pigmento purificado se añadieron a 1 ml del jugo exprimido, y se mantuvieron durante 10 minutos, y la absorción y los espectros de transmitancia a 380 - 780 nm se midieron con un espectrofotómetro UV-2500PC (SHIMADZU Corporation). Los valores de los espectros de transmitancia se convirtieron en el sistema cromático CIE L*a*b* (JISZ8729). El número de la carta cromática de The Royal Horticultural Society (RHSCC) se usó como referencia basándose en el índice cromático (sistema cromático CIE L*a*b*) para verificar los colores aproximados usando el sistema de clasificación cromática Version 2.1.1 (The Japan Research Institute, Co. Ltd., Japón; Publicación de Patente Japonesa No Examinada N° 2002-016935). Al usar este sistema, puede seleccionarse objetivamente un número RHSCC aproximado. La concentración final del pigmento añadida al jugo exprimido era aproximadamente idéntica a la concentración de antocianina media en las vacuolas de los pétalos de rosa. Sin embargo, puesto que la absorbancia para 3G-5CafG-3'CafG era demasiado alta, se diluyó 4 veces antes de la medida. Medeo es una variedad que muestra un pH de los pétalos medio (pH 4,38) entre las especies de rosas de jardín.

Según se muestra en la Fig. 7, DEL 3G-5CafG-3'CafG exhibía el mayor espectro de absorción máxima entre cinco pigmentos purificados. El color aproximado era 89A en la carta cromática de the Royal Horticultural Society (RHSCC), que se obtenía basándose en el valor de L*a*b* convertido a partir del espectro de transmisión, y la DEL 3G-5CafG-3'CafG exhibía el color azul más fuerte entre los cinco pigmentos purificados según se muestra en la Fig. 7.

A partir de este resultado, parece posible producir DEL 3G-5CafG-3'CafG en pétalos de rosa y como resultado producir rosas con color azul al coexpresar los genes para antocianina 5,3'-acil(aromático)transferasa, el gen F3'5'H (WO 2004/020637) y el gen de 3'- glicosiltransferasa (WO 2001/92509) en pétalos de rosa. Además, parece posible crear variedades de flores azules de claveles, crisantemos, petunias, verbenas, nierembergias, lirios, etc.

Ejemplo 5. aislamiento de homólogo de acil(aromático)transferasa de las posiciones 5,3' de antocianina procedente de especies relacionadas con Gentiana triflora

En el género *Gentiana*, existen diversas especies relacionadas tales como *Gentiana rubicunda* y *Gentiana yakushimensis* además de *Gentiana triflora*. El aislamiento de homólogo de 5,3'- acil(aromático)transferasa de estas

especies se intentó mediante PCR.

5 Puesto que se sabía que el gen para 5,3'-acil(aromático)transferasa de gentiana no contenía intrones, se usaron DNA genómicos extraídos de las hojas de las especies relacionada como plantillas en PCR con cebadores específicos para el gen de 5,3'-acil(aromático)transferasa. Se usó un estuche DNeasy de QIAGEN para la extracción de DNA genómico siguiendo un método recomendado por el fabricante. Los cebadores, GAT4-Met-F y GAT4-B, específicos para el gen de 5,3'-aciltransferasa tenían las siguientes secuencias, y el cDNA de longitud completa que contiene toda la región de codificación puede amplificarse mediante PCR usando estos cebadores. La condición de reacción para la PCR es como se describe posteriormente.

Secuencias de cebadores:

10 GAT4-Met-F: TCA TTA TGG AGC AAA TCC AAA (Nº ID SEC: 1)

GAT4-B: CAT GTC AGG TGT GAG GTT CAA C (Nº ID SEC: 2)

Condición de PCR:

Reacción de desnaturalización: 94°C durante 5 minutos, 1 ciclo

15 Reacción de amplificación: 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto 30 segundos, 72°C durante 3 minutos, 30 ciclos

Reacción de extensión: 72°C durante 7 minutos, 1 ciclo

20 En esta PCR, una banda a un tamaño esperado, 1,5 kb, se amplificaba en tres especies relacionadas, *Gentiana yakushimensis*, *ochroleuca* y *wutaiensis*. Estos fragmentos se recogieron y se clonaron en un pCRII-TOPO (Invitrogen) y se determinaron sus secuencias de nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos y las correspondientes secuencias de aminoácidos de los fragmentos amplificados obtenidos de cada especie se muestran en el Listado de Secuencias.

Gentiana yakushimensis: Nº ID SEC: 3 y 4

Gentiana ochroleuca y *wutaiensis*: Nº ID SEC: 5 y 6

25 Los fragmentos obtenidos de *ochroleuca* y *wutaiensis* resultaban codificar la secuencia de aminoácidos idéntica. La identidad con 5,3'-acil(aromático)transferasa obtenida en primer lugar de *Gentiana triflora* era 95% para la procedente de *Gentiana yakushimensis* y 90% para las obtenidas de *ochroleuca* y *wutaiensis*. A partir de esta alta identidad, las proteínas codificadas en estos DNA parecen ser homólogos con 5,3'-acil(aromático)transferasa.

Ejemplo 6. Expresión de 5,3'-acil(aromático)transferasa de antocianina procedente de *Gentiana triflora* en *nierembergia*

30 El gen para 5,3'-acil(aromático)transferasa procedente de *Gentiana triflora* se introdujo en *nierembergia* junto con los genes para 3'-glucosiltransferasa de gentiana y para el gen F3'5'H de pensamiento. En los transformantes, se espera que la posición 3' de DEL 3G-5G sea glucosilada en primer lugar por 3'-glucosiltransferasa de gentiana para formar DEL 3G-5G-3'G, sobre la que puede actuar 5,3'-acil(aromático)transferasa de gentiana para formar un producto final, gentiodelfina (DEL 3G-5CafG-3'CafG).

35 Se preparó un constructo de expresión pSPB1536 al introducir un casete de expresión de 3'-glucosiltransferasa en los sitios HindIII y EcoRI de un vector binario para la expresión en plantas (van Engelen FA et ál. (1995) *Transgenic Res.* 4: 288-290), un casete de expresión de F3'5'H de pensamiento en el sitio PacI y un casete de expresión de 5,3'-acil(aromático)transferasa en el sitio AscI. Cualquiera de los casetes de expresión se regula mediante el promotor 35S derivado de un virus del mosaico de la coliflor, y tiene la secuencia terminadora de nopalina sintasa derivada de *Agrobacterium* aguas abajo de cada gen estructural. La transformación de *nierembergia* se efectuó según se describe en un informe de Tanaka et ál. (Tanaka et ál. (2005) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 1-24).

40 La expresión de tres genes (gen de 5,3'-acil(aromático)transferasa de gentiana, gen de 3'-glucosiltransferasa de gentiana y gen F3'5'H de pensamiento) en transformantes de *nierembergia* se confirmó mediante RT-PCR. Para las líneas en las que se confirmaba la transcripción de los tres genes, el color de los pétalos se analizó de un modo similar al descrito en un informe de Mizutani et ál. (Fukuchi-Mizutani et ál. (2003) *Plant Physiol.* 132: 1652-1663), pero la gentiodelfina obtenida como producto final esperada no se detectaba en ninguna de las líneas.

50 Por otra parte, una enzima en bruto se extrajo de los pétalos de los transformantes en los que se confirmaba la transcripción de los tres genes, de un modo como el descrito en el informe de Fujiwara et ál. (Fujiwara et ál., (1997) *Eur. J. Biochem.* 249: 45-51). Usando este extracto en bruto como una solución de enzima, se midió la actividad *in vitro* de 5,3'-acil(aromático)transferasa con DEL 3G-5G-3'G como el sustrato de un modo similar al del Ejemplo 2, a continuación, se confirmaba la formación de gentiodelfina. Por otra parte, cuando la enzima en bruto procedente de una *nierembergia* no recombinante se usaba como el control, no se detectaba gentiodelfina. Este resultado revelaba

que la nierembergia transgénica tiene actividad de 5,3'-acil(aromático)transferasa, es decir, una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a la posición tanto 5 como 3' de DEL 3G-5G-3'G usada como un sustrato.

5 Sin embargo, cuando se medía in vitro la actividad de 3'-glucosiltransferasa según se describe en el informe de Mizutani et ál. (Fukuchi-Mizutani et ál. (2003) Plant Physiol. 132: 1652-1663) con solución de enzima en bruto procedente de transformantes de nierembergia, no se detectaba actividad de 3'-glucosiltransferasa. Estos resultados confirmaban que una proteína con una actividad de 5,3'-acil(aromático)transferasa está presente en efecto en la célula de los transformantes de nierembergia. Sin embargo, la razón por la que la gentiodelfina esperada no se detectaba en los pétalos de los transformantes se debía a que la proteína de la 3'-glucosiltransferasa que actuaría antes que la 5,3'-acil(aromático)transferasa no se sintetizaba en la célula de nierembergia, o no funcionaba aunque se sintetizara.

Efecto de la Invención

15 Según se describe anteriormente, la presente invención ha demostrado que una acil(aromático)transferasa recombinante obtenida al expresar un gen de acil(aromático)transferasa de gentiana en E. coli tiene una actividad de transferencia de grupos acilo aromático no solo a un azúcar en la posición 5 de glucósidos de delfinidina, sino también a un azúcar en su posición 3'. Revelaba además que la antocianina 5-acil(aromático)transferasa presente en la naturaleza purificada de pétalos de gentiana también tiene una actividad de transferencia de un grupo acilo aromático a un azúcar en la posición 3', es decir, a diferencia de la antocianina acil(aromático)transferasa comercial, una sola enzima transfiere grupos acilo aromático a azúcares tanto en la posición 5 como en la posición 3' de una antocianina. Por otra parte, era posible expresar este gen en diferentes especies de plantas, para obtener así la actividad de 5,3'-acil(aromático)transferasa.

25 Se cree generalmente que el grupo acilo aromático en la posición 3' contribuye a la estabilización y el azulado de antocianina más fuertemente que el grupo acilo aromático en la posición 5, y se prefiere más la presencia de cadenas laterales de acilo de azúcar en múltiples posiciones incluyendo la posición 3'. Por tanto, según se describe en la presente invención, es posible crear una antocianina que tiene un tono más estable y azulado al efectuar la acilación aromática en la posición tanto 5 como 3' de un glucósido de antocianina usando una 5,3'-acil(aromático)transferasa que transfiere grupos acilo aromático a la posición tanto 5 como 3'. Por otra parte, al expresar el gen para dicha enzima en plantas junto con otros genes esenciales para la biosíntesis de antocianina o la modificación de la antocianina, es posible hacer el color de las flores, que comprende principalmente antocianinas, más estable y más azul.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110>International Flower Developments Proprietary Limited

<120>Método para la estabilización y la coloración azul de colorante de antocianina usando un gen que codifica una enzima que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina

- 5 <130>IFD (STY)-R881
 <150>JP 2004-315733
 <151>2004-10-29
 <160>6
 <170>
- 10 <210>1
 <211>21
 <212>DNA
 <213>Secuencia Artificial
 <220>
- 15 <221>
 <222>
 <223>Cebador GAT4-Met-F
 <400>1
 tcattatgga gcaaatccaa a 21
- 20 <210>2
 <211>
 <212>DNA
 <213>Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <221>
 <223>Cebador GAT4-B
 <400>2
 catgtcaggt gtgaggttca ac 22
 <210>3
- 30 <211>1603
 <212>DNA
 <213>Gentiana yakushimensis
 <220>
 <221>
- 35 <222>
 <223>secuencia de nucleótidos que codifica enzima que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina

ES 2 385 568 T3

<400>3

tcatt atg gag caa atc caa atg gcg aag gtt gtt gaa aaa tgc caa	47
Met Glu Gln Ile Gln Met Ala Lys Val Val Glu Lys Cys Gln	
1 5 10	
gtt aca cca cca ttt gac aca aca gat gtc gag tta tca gta ccg gta	95
Val Thr Pro Pro Phe Asp Thr Thr Asp Val Glu Leu Ser Val Pro Val	
15 20 25 30	
aca ttc ttt gat atc ccc tgg ttg cac ttg tat aag atg cag tcc ctt	143
Thr Phe Phe Asp Ile Pro Trp Leu His Leu Tyr Lys Met Gln Ser Leu	
35 40 45	
ctg ttt tac gac ttt ccg tac cca aaa aca cat ttc ttg gac act gtt	191
Leu Phe Tyr Asp Phe Pro Tyr Pro Lys Thr His Phe Leu Asp Thr Val	
50 55 60	
atc cct aat ctt aag gcc tct ttg tct ctc act cta aaa cac tac ctt	239
Ile Pro Asn Leu Lys Ala Ser Leu Ser Leu Thr Leu Lys His Tyr Leu	
65 70 75	
ccg ctt agt gga aat ttg tta atg ccc atc aaa tcg ggc aaa atg cca	287
Pro Leu Ser Gly Asn Leu Leu Met Pro Ile Lys Ser Gly Lys Met Pro	
80 85 90	
aag ttt cac tac tcc cgt gat gac gga gac tcg ata act ttg atc ttt	335
Lys Phe His Tyr Ser Arg Asp Asp Gly Asp Ser Ile Thr Leu Ile Phe	
95 100 105 110	
gcg gag tct gac cag gat ttt gac tac ctt aaa ggt cat caa ctg gta	383
Ala Glu Ser Asp Gln Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Gly His Gln Leu Val	
115 120 125	
gat tcc aat gat ttg cat gcc ctt ttt tat gtt atg cca cgg gtt ata	431
Asp Ser Asn Asp Leu His Ala Leu Phe Tyr Val Met Pro Arg Val Ile	
130 135 140	
agg acc atg caa gac tat aaa gtg atc ccg ctc gta gct gtg caa gta	479
Arg Thr Met Gln Asp Tyr Lys Val Ile Pro Leu Val Ala Val Gln Val	
145 150 155	
acc gtt ttt cct aac cat ggc ata gcc gtg gct ctg acg gca cat cat	527

ES 2 385 568 T3

Thr	Val	Phe	Pro	Asn	His	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Ala	His	His	
160						165					170					
tca	att	gca	gat	gct	aaa	agt	ttt	gta	atg	ttc	atc	aat	gct	tgg	gcc	575
Ser	Ile	Ala	Asp	Ala	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Phe	Ile	Asn	Ala	Trp	Ala	
175					180					185					190	
tat	att	aac	aaa	ttt	ggg	aaa	gac	gcg	gac	ttg	ttg	tcc	gcg	aat	ctt	623
Tyr	Ile	Asn	Lys	Phe	Gly	Lys	Asp	Ala	Asp	Leu	Leu	Ser	Ala	Asn	Leu	
				195					200					205		
ctt	cca	tct	ttt	gat	aga	tcg	ata	atc	aaa	gat	ctg	tat	ggc	cta	gag	671
Leu	Pro	Ser	Phe	Asp	Arg	Ser	Ile	Ile	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gly	Leu	Glu	
			210					215					220			
gaa	aca	ttt	tgg	aac	gaa	atg	caa	gat	att	ctt	gaa	atg	ttc	tct	aca	719
Glu	Thr	Phe	Trp	Asn	Glu	Met	Gln	Asp	Ile	Leu	Glu	Met	Phe	Ser	Thr	
		225					230						235			
ttt	gga	agc	aaa	ccc	cct	cga	ttc	aac	aag	gta	cga	gct	gca	tat	gtc	767
Phe	Gly	Ser	Lys	Pro	Pro	Arg	Phe	Asn	Lys	Val	Arg	Ala	Ala	Tyr	Val	
	240					245						250				
cta	tcc	ctt	gct	gaa	atc	cag	aag	cta	aag	aac	aaa	gta	ctg	aat	ctc	815
Leu	Ser	Leu	Ala	Glu	Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Leu	Asn	Leu	
255					260					265					270	
aga	gga	tcc	gaa	ccg	aca	ata	cgt	gta	acg	acg	ttc	aca	gtg	aca	tgt	863
Arg	Gly	Ser	Glu	Pro	Thr	Ile	Arg	Val	Thr	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Cys	
				275						280					285	
gga	tac	gta	tgg	aca	tgc	atg	gtc	aaa	tca	aaa	gat	gac	gtt	gta	tca	911
Gly	Tyr	Val	Trp	Thr	Cys	Met	Val	Lys	Ser	Lys	Asp	Asp	Val	Val	Ser	
			290					295					300			
gag	gaa	tca	tcg	aac	gac	gaa	aat	gag	ctc	gag	tac	ttc	agt	ttt	aca	959
Glu	Glu	Ser	Ser	Asn	Asp	Glu	Asn	Glu	Leu	Glu	Tyr	Phe	Ser	Phe	Thr	
		305						310						315		
gcg	gat	tgc	cga	gga	ctt	ctg	acg	ccc	ccg	tgt	ccg	cct	aac	tac	ttt	1007
Ala	Asp	Cys	Arg	Gly	Leu	Leu	Thr	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Tyr	Phe	
	320					325						330				
ggc	aac	tgt	ctt	gcg	tca	tgc	gtt	gca	aaa	gca	aca	cat	aaa	gag	tta	1055
Gly	Asn	Cys	Leu	Ala	Ser	Cys	Val	Ala	Lys	Ala	Thr	His	Lys	Glu	Leu	
335					340					345					350	
gtt	ggg	aat	aaa	ggg	ctt	ctt	gtt	gca	gtt	gca	gct	att	gta	gaa	gcc	1103

ES 2 385 568 T3

Val Gly Asn Lys Gly Leu Leu Val Ala Val Ala Ala Ile Val Glu Ala
 355 360 365
 att gaa aag agg gtg cac aac gaa aaa ggc gtt ctt gca gat gca aaa 1151
 Ile Glu Lys Arg Val His Asn Glu Lys Gly Val Leu Ala Asp Ala Lys
 370 375 380
 act tgg tta tcg gaa tct aat gga atc cct tca aaa aga ttt ctc ggc 1199
 Thr Trp Leu Ser Glu Ser Asn Gly Ile Pro Ser Lys Arg Phe Leu Gly
 385 390 395
 att act gga tca cct aag ttt gat tgc tat ggt gta gat ttt gga tgg 1247
 Ile Thr Gly Ser Pro Lys Phe Asp Ser Tyr Gly Val Asp Phe Gly Trp
 400 405 410
 gga aag cct gca aaa ttt gac att acc tct att gat tat gca gaa ttg 1295
 Gly Lys Pro Ala Lys Phe Asp Ile Thr Ser Ile Asp Tyr Ala Glu Leu
 415 420 425 430
 att tat gtg att gag tcc agg gat ttt gaa aaa ggt gtg gag atc gga 1343
 Ile Tyr Val Ile Glu Ser Arg Asp Phe Glu Lys Gly Val Glu Ile Gly
 435 440 445
 gta tca ttg ccc aag att cat atg gat gca ttt gca aaa atc ttt gaa 1391
 Val Ser Leu Pro Lys Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys Ile Phe Glu
 450 455 460
 gaa ggt ttt tgc ttt ttg tca tagtctcttt aatagaacca tatttgctgc 1442
 Glu Gly Phe Cys Phe Leu Ser
 465
 aataaagtac gaagtcitta gtaacactac accaaaccct actttcgagg caggaacacc 1502
 acaacaacga ggttcaatca ctagaagggt gtacttcata aattccagag gtcgaatata 1562
 cacggtgic ctatgaaaag ttgaacctca cacctgacat g 1603

<210>4

<211>469

<212>PROTEÍNA

5 <213>Gentiana yakushimensis

<220>

<221>

<222>

<223>Secuencia de aminoácidos enzima que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina

10 <400>4

ES 2 385 568 T3

Met Glu Gln Ile Gln Met Ala Lys Val Val Glu Lys Cys Gln Val Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Phe Asp Thr Thr Asp Val Glu Leu Ser Val Pro Val Thr Phe
 20 25 30
 Phe Asp Ile Pro Trp Leu His Leu Tyr Lys Met Gln Ser Leu Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Asp Phe Pro Tyr Pro Lys Thr His Phe Leu Asp Thr Val Ile Pro
 50 55 60
 Asn Leu Lys Ala Ser Leu Ser Leu Thr Leu Lys His Tyr Leu Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Gly Asn Leu Leu Met Pro Ile Lys Ser Gly Lys Met Pro Lys Phe
 85 90 95
 His Tyr Ser Arg Asp Asp Gly Asp Ser Ile Thr Leu Ile Phe Ala Glu
 100 105 110
 Ser Asp Gln Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Gly His Gln Leu Val Asp Ser
 115 120 125
 Asn Asp Leu His Ala Leu Phe Tyr Val Met Pro Arg Val Ile Arg Thr
 130 135 140
 Met Gln Asp Tyr Lys Val Ile Pro Leu Val Ala Val Gln Val Thr Val
 145 150 155 160
 Phe Pro Asn His Gly Ile Ala Val Ala Leu Thr Ala His His Ser Ile
 165 170 175
 Ala Asp Ala Lys Ser Phe Val Met Phe Ile Asn Ala Trp Ala Tyr Ile
 180 185 190
 Asn Lys Phe Gly Lys Asp Ala Asp Leu Leu Ser Ala Asn Leu Leu Pro
 195 200 205
 Ser Phe Asp Arg Ser Ile Ile Lys Asp Leu Tyr Gly Leu Glu Glu Thr
 210 215 220
 Phe Trp Asn Glu Met Gln Asp Ile Leu Glu Met Phe Ser Thr Phe Gly
 225 230 235 240
 Ser Lys Pro Pro Arg Phe Asn Lys Val Arg Ala Ala Tyr Val Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ala Glu Ile Gln Lys Leu Lys Asn Lys Val Leu Asn Leu Arg Gly
 260 265 270
 Ser Glu Pro Thr Ile Arg Val Thr Thr Phe Thr Val Thr Cys Gly Tyr

ES 2 385 568 T3

	275		280		285														
	Val	Trp	Thr	Cys	Met	Val	Lys	Ser	Lys	Asp	Asp	Val	Val	Ser	Glu	Glu			
	290						295					300							
	Ser	Ser	Asn	Asp	Glu	Asn	Glu	Leu	Glu	Tyr	Phe	Ser	Phe	Thr	Ala	Asp			
	305					310					315					320			
	Cys	Arg	Gly	Leu	Leu	Thr	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Tyr	Phe	Gly	Asn			
					325					330					335				
	Cys	Leu	Ala	Ser	Cys	Val	Ala	Lys	Ala	Thr	His	Lys	Glu	Leu	Val	Gly			
					340				345					350					
	Asn	Lys	Gly	Leu	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Glu	Ala	Ile	Glu			
					355				360				365						
	Lys	Arg	Val	His	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Trp			
	370						375					380							
	Leu	Ser	Glu	Ser	Asn	Gly	Ile	Pro	Ser	Lys	Arg	Phe	Leu	Gly	Ile	Thr			
	385					390					395					400			
	Gly	Ser	Pro	Lys	Phe	Asp	Ser	Tyr	Gly	Val	Asp	Phe	Gly	Trp	Gly	Lys			
					405					410					415				
	Pro	Ala	Lys	Phe	Asp	Ile	Thr	Ser	Ile	Asp	Tyr	Ala	Glu	Leu	Ile	Tyr			
					420					425				430					
	Val	Ile	Glu	Ser	Arg	Asp	Phe	Glu	Lys	Gly	Val	Glu	Ile	Gly	Val	Ser			
					435				440				445						
	Leu	Pro	Lys	Ile	His	Met	Asp	Ala	Phe	Ala	Lys	Ile	Phe	Glu	Glu	Gly			
	450						455					460							
	Phe	Cys	Phe	Leu	Ser														
	465																		

<210>5

<211>1587

<212>DNA

5 <213>Ochroleuca y Wutariensis

<220>

<221>

<222>

10 <223>secuencia de nucleótidos que codifica enzima que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina

<400>5

ES 2 385 568 T3

tcatt atg gag caa atc caa atg gtg aag gtt ctt gaa aaa tgt caa	47
Met Glu Gln Ile Gln Met Val Lys Val Leu Glu Lys Cys Gln	
1 5 10	
gtt aca cca cca tct gac aca aca gat gtc gag tta tca cta tcg gta	95
Val Thr Pro Pro Ser Asp Thr Thr Asp Val Glu Leu Ser Leu Ser Val	
15 20 25 30	
aca ttc ttt gat atc ccc tgg ttg cat ttg tat aag atg cag tcc ctt	143
Thr Phe Phe Asp Ile Pro Trp Leu His Leu Tyr Lys Met Gln Ser Leu	
35 40 45	
ctg ttt tac gat ttt ccg tat cca aaa acg cgt ttc ttg gac act gtt	191
Leu Phe Tyr Asp Phe Pro Tyr Pro Lys Thr Arg Phe Leu Asp Thr Val	
50 55 60	
atc cct aat ctt aag gcc tcc ttg tct ctc act cta aaa cac tac ctt	239
Ile Pro Asn Leu Lys Ala Ser Leu Ser Leu Thr Leu Lys His Tyr Leu	
65 70 75	
ccg ctt agc gga aat ttg tta atg ccc atc aaa tcg ggc aaa atg cca	287
Pro Leu Ser Gly Asn Leu Leu Met Pro Ile Lys Ser Gly Lys Met Pro	
80 85 90	
atg ttt cac tac tct cgt gat gac gga gac tcg ata act ttg atc ttt	335
Met Phe His Tyr Ser Arg Asp Asp Gly Asp Ser Ile Thr Leu Ile Phe	
95 100 105 110	
gcg gag tct gac cag gat ttt gac tac ctt aaa ggt cat cac ctg caa	383
Ala Glu Ser Asp Gln Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Gly His His Leu Gln	
115 120 125	
gat tcc aat gat ttg cat gcg ctt ttt tat gtt atg cca cgg gtt tta	431
Asp Ser Asn Asp Leu His Ala Leu Phe Tyr Val Met Pro Arg Val Leu	
130 135 140	
agg acc act caa gac tat aaa gtc atc ccg ctc gta gct gtg caa gta	479
Arg Thr Thr Gln Asp Tyr Lys Val Ile Pro Leu Val Ala Val Gln Val	
145 150 155	
acc gtt ttt cct aac cat ggc att gcc gtg gct ctg acg gca cat cat	527
Thr Val Phe Pro Asn His Gly Ile Ala Val Ala Leu Thr Ala His His	
160 165 170	
tca att gca gat gct aaa agt ttt gta atg ttc atg aat gct tgg gcc	575
Ser Ile Ala Asp Ala Lys Ser Phe Val Met Phe Met Asn Ala Trp Ala	
175 180 185 190	

ES 2 385 568 T3

tgt att aac aaa ttt ggg aaa gac aca gac tta ttg tct ggg aat ctt	623
Cys Ile Asn Lys Phe Gly Lys Asp Thr Asp Leu Leu Ser Gly Asn Leu	
195 200 205	
ctt cca tct ttt gat aga tcg ata atc aaa gat ctg tat ggc cta gag	671
Leu Pro Ser Phe Asp Arg Ser Ile Ile Lys Asp Leu Tyr Gly Leu Glu	
210 215 220	
gaa aca ttt tgg aac gaa atg caa cat att ctt gac atg ttc tct aga	719
Glu Thr Phe Trp Asn Glu Met Gln His Ile Leu Asp Met Phe Ser Arg	
225 230 235	
ttt gga agc aaa ccc cct cga ttc aac aag gta cga gcc aca tat gtc	767
Phe Gly Ser Lys Pro Pro Arg Phe Asn Lys Val Arg Ala Thr Tyr Val	
240 245 250	
cta tcc cct gtt gaa atc gag aag cta aag aac aaa gta cta aat ctc	815
Leu Ser Pro Val Glu Ile Glu Lys Leu Lys Asn Lys Val Leu Asn Leu	
255 260 265 270	
aga gga tct gaa ccg gca ata cgt gta acg acg ttc aca gtg aca tgt	863
Arg Gly Ser Glu Pro Ala Ile Arg Val Thr Thr Phe Thr Val Thr Cys	
275 280 285	
gga tac ata tgg aca tgc atg gtc aaa tca aaa gat gtc gta tcg aac	911
Gly Tyr Ile Trp Thr Cys Met Val Lys Ser Lys Asp Val Val Ser Asn	
290 295 300	
gac gaa aat gag ctc gag tac ttc agt ttt aca gcg gat tgc cga ggg	959
Asp Glu Asn Glu Leu Glu Tyr Phe Ser Phe Thr Ala Asp Cys Arg Gly	
305 310 315	
ctt ctg acg ccc ccg tgt ccg cct aac tac ttt ggc aac tgt ctt gcg	1007
Leu Leu Thr Pro Pro Cys Pro Pro Asn Tyr Phe Gly Asn Cys Leu Ala	
320 325 330	
ccg tgc gtt gca aaa gca aca cgt aaa gag tta gtt gga aat aaa ggg	1055
Pro Cys Val Ala Lys Ala Thr Arg Lys Glu Leu Val Gly Asn Lys Gly	
335 340 345 350	
ttt ctt gtt gca gtt gca gct att gtg gaa gcc att gaa aag agg gtg	1103
Phe Leu Val Ala Val Ala Ala Ile Val Glu Ala Ile Glu Lys Arg Val	
355 360 365	
cac aac gaa aaa ggc gtt ctt gca gat gca aaa act tgg tta tcg gaa	1151
His Asn Glu Lys Gly Val Leu Ala Asp Ala Lys Thr Trp Leu Ser Glu	
370 375 380	

ES 2 385 568 T3

tct aat gga atc cct tca aaa aga ttt ctc ggg att act gga tca cct 1199
 Ser Asn Gly Ile Pro Ser Lys Arg Phe Leu Gly Ile Thr Gly Ser Pro
 385 390 395
 aag ttt gat tcg tat ggt gta gat ttt gga tgg gga aag cct gca aaa 1247
 Lys Phe Asp Ser Tyr Gly Val Asp Phe Gly Trp Gly Lys Pro Ala Lys
 400 405 410
 ttt gac att acc tct att gat tat gca gaa ttg att tat gtg att gag 1295
 Phe Asp Ile Thr Ser Ile Asp Tyr Ala Glu Leu Ile Tyr Val Ile Glu
 415 420 425 430
 tcc agg gag ttt gaa aaa ggc gtg gag atc gga gta tca ttg cct aag 1343
 Ser Arg Glu Phe Glu Lys Gly Val Glu Ile Gly Val Ser Leu Pro Lys
 435 440 445
 att cat atg gat gca ttt gca aaa atc ttt gaa caa ggt ttt tgc ttt 1391
 Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys Ile Phe Glu Gln Gly Phe Cys Phe
 450 455 460
 ttg tca tagtctcttt aatagaacca aattgttgc aataaagtac caagtctcta 1447
 Leu Ser
 gtgacactag ttaccaaac ctactttcga gtaggagca ccacaacaag gttcaatcac 1507
 tacaaggttg aacttcataa attccagagg tgaatatcc accgttgacc tctgaaaagt 1567
 tgaacctcac acctgacatg 1587

<210>6

<211>464

<212>PROTEÍNA

5 <213>Ochroleuca y Wutariensis

<220>

<221>

<222>

10 <223>Secuencia de aminoácidos de enzima que transfiere un grupo acilo aromático a la posición 3' de la antocianina

<400>6

Met Glu Gln Ile Gln Met Val Lys Val Leu Glu Lys Cys Gln Val Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Ser Asp Thr Thr Asp Val Glu Leu Ser Leu Ser Val Thr Phe
 20 25 30
 Phe Asp Ile Pro Trp Leu His Leu Tyr Lys Met Gln Ser Leu Leu Phe

ES 2 385 568 T3

	35		40		45														
Tyr	Asp	Phe	Pro	Tyr	Pro	Lys	Thr	Arg	Phe	Leu	Asp	Thr	Val	Ile	Pro				
	50					55					60								
Asn	Leu	Lys	Ala	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Leu	Lys	His	Tyr	Leu	Pro	Leu				
65					70					75					80				
Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Met	Pro	Ile	Lys	Ser	Gly	Lys	Met	Pro	Met	Phe				
				85					90					95					
His	Tyr	Ser	Arg	Asp	Asp	Gly	Asp	Ser	Ile	Thr	Leu	Ile	Phe	Ala	Glu				
			100					105					110						
Ser	Asp	Gln	Asp	Phe	Asp	Tyr	Leu	Lys	Gly	His	His	Leu	Gln	Asp	Ser				
	115						120					125							
Asn	Asp	Leu	His	Ala	Leu	Phe	Tyr	Val	Met	Pro	Arg	Val	Leu	Arg	Thr				
	130					135					140								
Thr	Gln	Asp	Tyr	Lys	Val	Ile	Pro	Leu	Val	Ala	Val	Gln	Val	Thr	Val				
145				150						155					160				
Phe	Pro	Asn	His	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Ala	His	His	Ser	Ile				
			165					170						175					
Ala	Asp	Ala	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Phe	Met	Asn	Ala	Trp	Ala	Cys	Ile				
		180						185					190						
Asn	Lys	Phe	Gly	Lys	Asp	Thr	Asp	Leu	Leu	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Pro				
	195						200					205							
Ser	Phe	Asp	Arg	Ser	Ile	Ile	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gly	Leu	Glu	Glu	Thr				
	210				215						220								
Phe	Trp	Asn	Glu	Met	Gln	His	Ile	Leu	Asp	Met	Phe	Ser	Arg	Phe	Gly				
225				230						235					240				
Ser	Lys	Pro	Pro	Arg	Phe	Asn	Lys	Val	Arg	Ala	Thr	Tyr	Val	Leu	Ser				
			245						250					255					
Pro	Val	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Leu	Asn	Leu	Arg	Gly				
		260						265					270						
Ser	Glu	Pro	Ala	Ile	Arg	Val	Thr	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Cys	Gly	Tyr				
	275						280						285						
Ile	Trp	Thr	Cys	Met	Val	Lys	Ser	Lys	Asp	Val	Val	Ser	Asn	Asp	Glu				
	290					295					300								
Asn	Glu	Leu	Glu	Tyr	Phe	Ser	Phe	Thr	Ala	Asp	Cys	Arg	Gly	Leu	Leu				
305				310						315					320				
Thr	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Tyr	Phe	Gly	Asn	Cys	Leu	Ala	Pro	Cys				

ES 2 385 568 T3

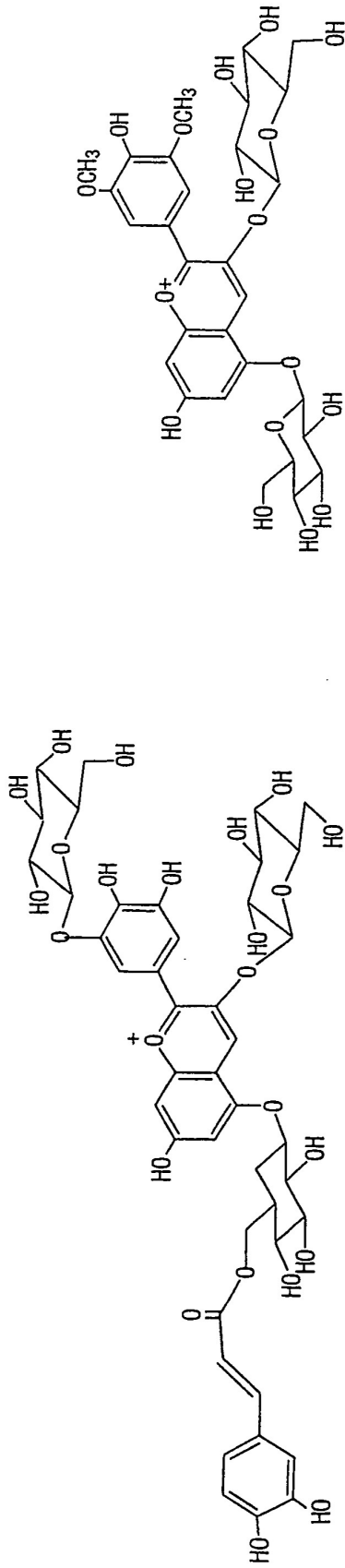
				325						330				335		
Val	Ala	Lys	Ala	Thr	Arg	Lys	Glu	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	Phe	Leu	
			340					345					350			
Val	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Glu	Ala	Ile	Glu	Lys	Arg	Val	His	Asn	
		355					360					365				
Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Trp	Leu	Ser	Glu	Ser	Asn	
	370					375						380				
Gly	Ile	Pro	Ser	Lys	Arg	Phe	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Ser	Pro	Lys	Phe	
385					390					395					400	
Asp	Ser	Tyr	Gly	Val	Asp	Phe	Gly	Trp	Gly	Lys	Pro	Ala	Lys	Phe	Asp	
				405					410					415		
Ile	Thr	Ser	Ile	Asp	Tyr	Ala	Glu	Leu	Ile	Tyr	Val	Ile	Glu	Ser	Arg	
			420					425					430			
Glu	Phe	Glu	Lys	Gly	Val	Glu	Ile	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Lys	Ile	His	
		435					440					445				
Met	Asp	Ala	Phe	Ala	Lys	Ile	Phe	Glu	Gln	Gly	Phe	Cys	Phe	Leu	Ser	
	450					455						460				

REIVINDICACIONES

1. Un método para añadir grupos acilo aromático a azúcares en las posiciones tanto 3' como 5 de una antocianina, comprendiendo el método la etapa de:

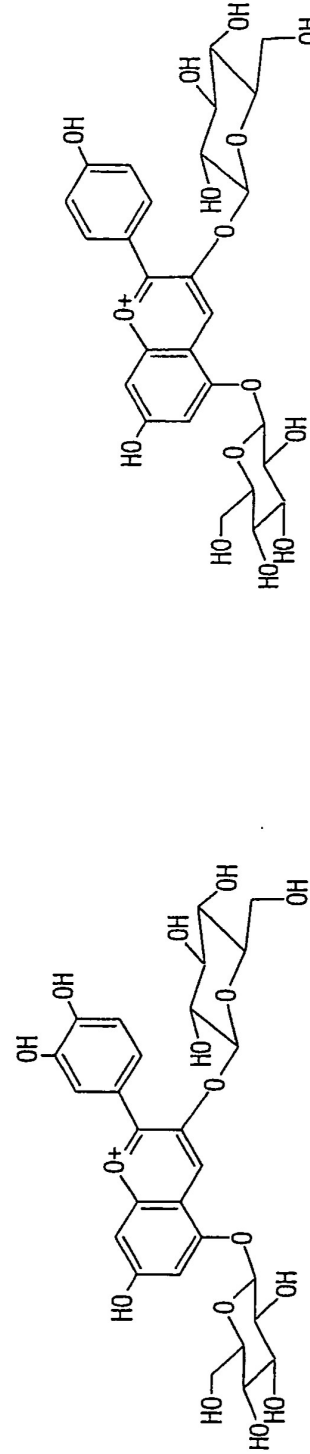
- 5 usar un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como la indicada en el N° ID SEC: 4 o 6, o un gen que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de 90% o más con la secuencia de aminoácidos que se indica en el N° ID SEC: 4 o 6 y que tiene una actividad de transferencia de grupos acilo aromático a azúcares en las posiciones tanto 3' como 5 de la antocianina.

Fig. 2



3-GLUCOSIL-5-CAFEOILGLUCOSIL-3'-GLUCÓSIDO DE DELFINIDINA
(DEL 3G-5cafG-3'G)

3,5-DIGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (MAL 3G-5G)

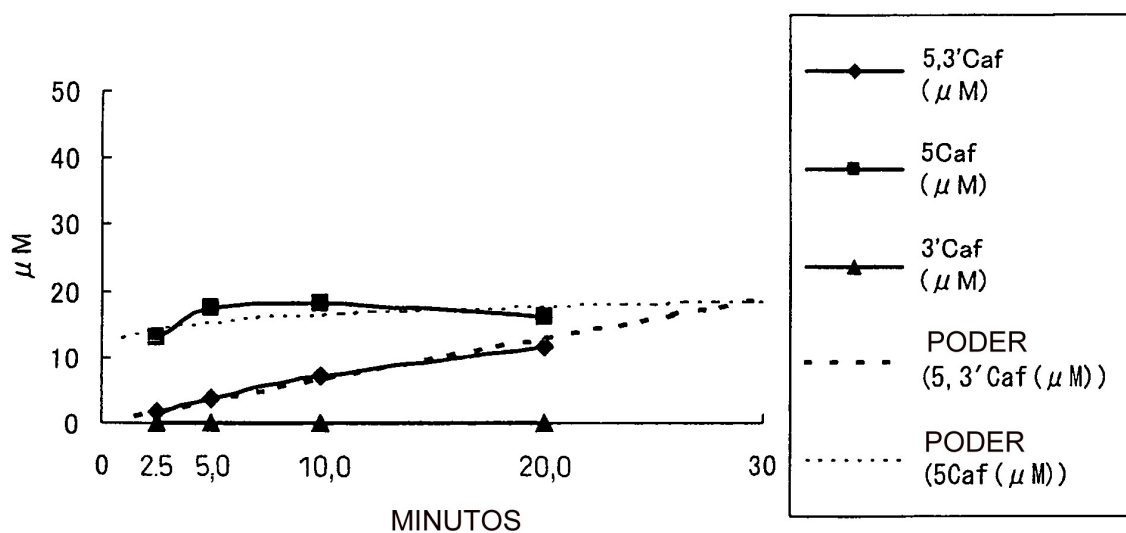


3,5-DIGLUCÓSIDO DE CIANIDINA (CYA 3G-5G)

3,5-DIGLUCÓSIDO DE PELARGONIDINA (PEL 3G-5G)

Fig.3

(A)



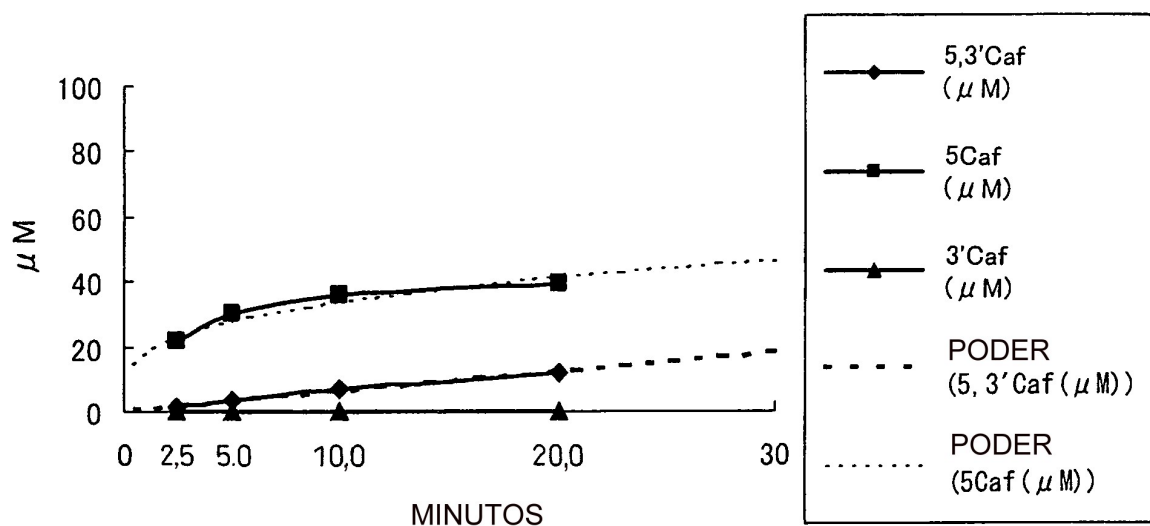
(B)

DEL 3G-5G-3'G 50 μM

TIEMPO (MINUTOS)	5,3'Caf (μM)	5Caf (μM)	3'Caf (μM)	triG (μM)
2,5	1,65	13,05	0,00	35,3
5,0	3,90	17,40	0,00	28,7
10,0	7,30	18,15	0,00	24,6
20,0	11,70	16,20	0,00	22,1

Fig.4

(A)



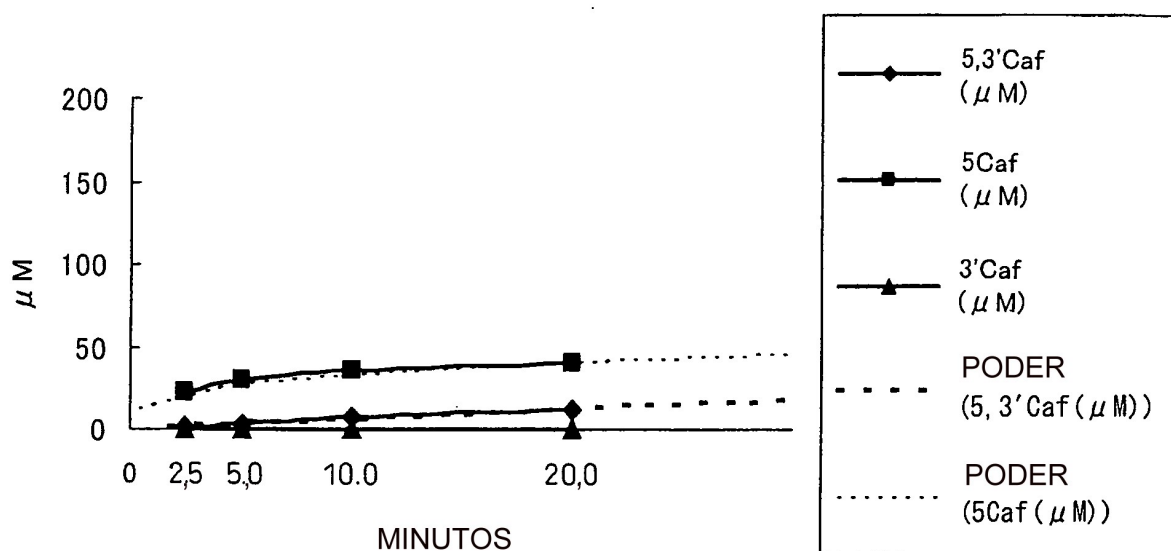
(B)

DEL 3G-5G-3'G 100 μM

TIEMPO (MINUTOS)	5,3'Caf (μM)	5Caf (μM)	3'Caf (μM)	triG (μM)
2,5	1,70	21,80	0,00	76,5
5,0	3,50	30,10	0,00	66,4
10,0	6,80	35,60	0,00	57,6
20,0	11,80	39,60	0,00	48,6

Fig.5

(A)



(B)

DEL 3G-5G-3'G 200 μM

TIEMPO (MINUTOS)	5,3'Caf (μM)	5Caf (μM)	3'Caf (μM)	triG (μM)
2,5	1,60	31,20	0,00	167,2
5,0	3,00	44,40	0,00	152,6
10,0	7,00	60,60	0,20	132,2
20,0	11,60	70,00	0,60	117,8

Fig.6

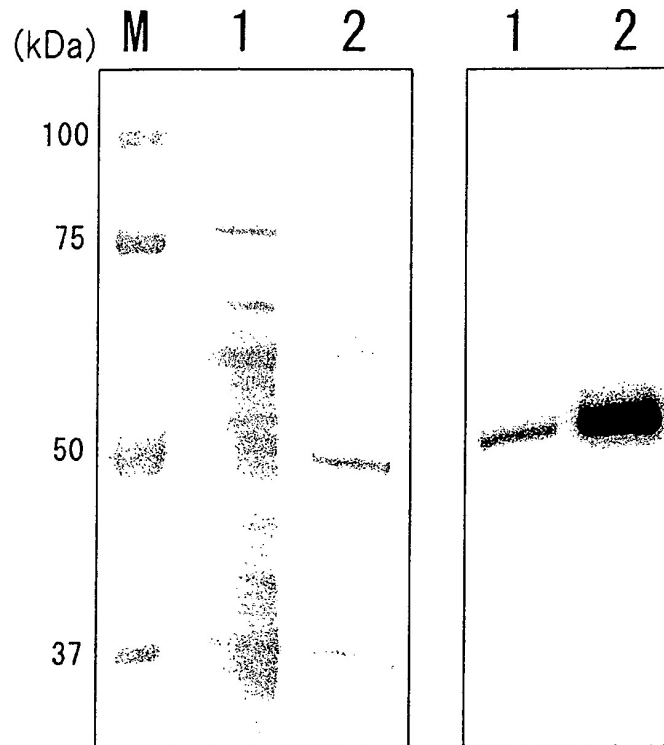


Fig.7

PEL 3G-5G Cya 3G-5G DEL 3G-5G Mal 3G-5G Gentiodefina

