

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 135**

51 Int. Cl.:

C12N 15/06 (2006.01)

C12N 5/14 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2001 E 01956945 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1312672**

54 Título: **Procedimiento para acumular producto de gen exógeno a una concentración alta en semillas de plantas**

30 Prioridad:

22.08.2000 JP 2000251606

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.04.2013

73 Titular/es:

NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES (50.0%)

1-2 Kannondai 2-chome Tsukuba-shi Ibaraki 305-8602, JP y

INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION (50.0%)

72 Inventor/es:

TAKAIWA, FUMIO y TADA, YOSHIFUMI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 400 135 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

Procedimiento para acumular producto de gen exógeno a una concentración alta en semillas de plantas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para acumular concentraciones altas de producto de un gen exógeno en semillas de plantas.

Técnica anterior

10 Las proteínas de almacenamiento de semillas se clasifican, convencionalmente, en cuatro grupos de proteínas, de acuerdo con su solubilidad, es decir, glutelinas, globulinas, prolaminas y albúminas. El arroz es diferente de otros cereales, tales como el trigo y el maíz, en cuanto que la glutelina es la principal proteína de almacenamiento de semillas, representando aproximadamente del 70 al 80 % de las proteínas de almacenamiento de semillas. El grupo de genes de glutelina comprende aproximadamente 10 genes por un genoma haploide, y los genes se dividen en dos subfamilias, GluA y GluB, que muestran una homología del 60 al 65 % en la secuencia de aminoácidos dentro de la región codificante. Cada subfamilia comprende aproximadamente 5 genes que tienen una homología del 80 % o mayor en la secuencia de aminoácidos. Un gen de glutelina se expresa específicamente y se acumula en el endospermo. La especificidad de tejido de la expresión de la glutelina está regulada de forma considerablemente estricta y las glutelinas no se expresan en otros tejidos, tales como la hoja y la raíz. En general, la expresión del grupo de genes de glutelina, con la excepción del GluA-3, es coordinada; sus niveles de ARNm muestran el siguiente patrón: emergencia 5 días después de la floración (día 5), alcance del máximo alrededor del día 15 y disminución después de esto. El gen GluB-1 tiene la actividad promotora más fuerte del grupo de genes de glutelina.

20 Se han aislado mutantes de arroz con disminución de la cantidad acumulada de glutelina, es decir, la principal proteína de almacenamiento de semillas. Por ejemplo, Iida *et al.* aislaron mutantes recesivos que carecen de cualquiera de las subunidades ácidas de la glutelina, $\alpha 1$, $\alpha 2$ o $\alpha 3$, a partir de una variedad de arroz Koshihikari que se irradió con rayos γ . Los fenotipos están regulados, respectivamente, por un único gen recesivo (es decir, *glu1*, *glu2* o *glu3*). También se ha obtenido una cepa mutante ($\alpha 123$) que carece de todas las $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ cruzando los tres mutantes anteriores (Iida, S. *et al.*, Theor. Appl. Genet. 94: 177-183 (1997)).

30 El LGC-1 (bajo contenido en glutelina-1 es un mutante seleccionado de Nihonmasari tratado con EMS y tiene un fenotipo con una concentración de glutelina significativamente disminuida (Iida, S. *et al.*, Theor. Appl. Genet. 87: 374-378 (1993)). El LGC-1 se caracteriza además por concentraciones aumentadas de prolamina y globulina. El LGC-1 está dominado por un único gen dominante. Mediante el mapeo de los genes defectivos en LGC-1 y los mutantes defectivos en $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, se reveló que el gen de proteína mutado (*lgc-1*) de LGC-1 y el gen de glutelina mutado (*glu1*) del mutante que carece de $\alpha 1$ están situados en el mismo locus. Los resultados de la hibridación de Southern usando el gen de glutelina (GluB) como sonda indicaron que el LGC-1 contenía una mutación en el gen GluB o próxima al mismo. De acuerdo con los resultados de los análisis de transferencia de bandas Northern, comparando el nivel de expresión del gen GluB en el endospermo después de aproximadamente 16 días desde la germinación principal en LGC-1 y su variedad original, Nihonmasari, se reveló que la expresión de GluB está considerablemente disminuida en LGC-1.

40 En la soja, se conoce la glicinina como proteína de almacenamiento de semillas. La glicinina se produce como un polipéptido precursor de un tamaño de aproximadamente 60 kDa en el que están unidos juntos un péptido señal, un polipéptido ácido y un polipéptido básico; el péptido señal se escinde posteriormente. Después de esto, se forma una subunidad en la que dos tipos de polipéptidos resultantes de una escisión en el sitio Asn-Gly, es decir, el polipéptido ácido (A) y el polipéptido básico (B) específicos, se polimerizan a través de enlaces disulfuro. Seis de estas subunidades se ensamblan para formar un hexámero y se almacenan en el cuerpo de la proteína (PB). El hexámero también se denomina "proteína de almacenamiento de semillas 11S", debido a su coeficiente de sedimentación (11S). Las subunidades de la glicinina se clasifican en el grupo I y el grupo II, basándose en la estructura primaria de sus ADNc y su homología de secuencia de aminoácidos. Hasta la fecha, se conocen las subunidades AlaB1b, A1bB2 y A2B1a del grupo I y las subunidades A3B4 y A5A4B3 del grupo II. Se sabe que seis de estas subunidades se combinan casi aleatoriamente en la glicinina de soja. Además, se ha informado de que un péptido derivado de la subunidad A1aB1b de la glicinina de soja tiene la capacidad de unirse a ácido biliar (Shio Makino, The Food Industry 39(24): 77-87 (1996)), lo que indica que la capacidad de las proteínas de soja de hacer disminuir la concentración de colesterol en sangre depende de la subunidad AlaB1b.

50 Momma, K. *et al.* (Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:314-318, 1999) analizaron arroz transformado con el gen de la glicinina de soja y descubrieron que tenía un contenido proteico aumentado como consecuencia de la expresión de la glicinina de soja.

55 Goossens, A. *et al.* (FEBS Letter 456:160-164, 1999) divulga la expresión potenciada de un transgén (Arc5) por la inducción simultánea de un gen antisentido para una proteína de almacenamiento de semillas endógena (albúmina 2S) en una planta natural que no es defectiva en ninguna proteína de almacenamiento de semillas endógena.

Takaiwa, F. *et al.* (Plant Sci. 111:39-49, 1995) divulga un vector que tiene una región no traducida en 5' de glicinina/glutelina quimérica para su inserción en una planta de tabaco para la producción de glicinina. Asimismo, Katsube, T. *et al.* (Plant Physiol. 120:1063-1073, 1999) han usado el mismo gen quimérico para sus experimentos en arroz transgénico.

5 El propio gen de glutelina de arroz se conoce a partir del N.º de acc. X54314 del EMBL.

Se conocen mutantes de arroz defectivos en proteínas de almacenamiento de semillas a partir de lida, S. *et al.*, (Theor. Appl. Genet. 94: 177-183, 1997), quienes describen nueve líneas mutantes que carecen de subunidades de glutelina debido a una mutación en sus genes de glutelina.

Divulgación de la invención

10 Los presentes inventores se centraron en las funciones fisiológicas beneficiosas de la glicinina de soja, tales como el efecto de disminución del colesterol descrito anteriormente, y ya han tenido éxito en la generación de arroz en el que se ha modificado la composición de proteínas de almacenamiento de las semillas expresando el gen A1aB1b en el endospermo de las semillas de arroz (en la patente N.º 3030339). No obstante, para que surja un efecto de función fisiológica deseado de la ingesta del arroz, se necesitan niveles de expresión mayores. En consecuencia, es necesario desarrollar y utilizar técnicas que permitan la acumulación de concentraciones mayores de producto de gen exógeno en el arroz. La presente invención se llevó a cabo teniendo en cuenta este requisito y su objetivo es proporcionar un procedimiento para acumular concentraciones altas de producto de gen exógeno en semillas de plantas.

20 Con el fin de conseguir el objetivo anterior, los presentes inventores intentaron mejorar el promotor para expresar niveles altos de un gen exógeno en semillas de plantas. Examinando la región promotora del gen GluB-1 de la proteína de almacenamiento de semillas glutelina del arroz, se reveló que los vectores convencionales usados para expresar el gen de la glicina contenían de forma incompleta la región no traducida en 5' del gen de la glutelina. Los presentes inventores se centraron en la región no traducida en 5' del gen de la glutelina, cuya importancia no se ha reconocido aún, y estudiaron si la inserción de la región no traducida en 5' en vectores de expresión mejoraría el nivel de acumulación de ARNm. Los resultados no mostraron ninguna mejora en el nivel de expresión en comparación con el transductante del gen de glicinina convencional asociado con la inserción de una secuencia potenciadora de un gen de la fotosíntesis del tabaco entre el promotor del gen GluB-1 y el gen de la glicina (A1aB1b) (pSaDb). Sin embargo, la inserción de la región no traducida en 5' completa de la glutelina (ATG) hizo aumentar de forma espectacular los niveles de acumulación tanto de ARNm como de proteína.

30 Los estudios anteriores nunca tuvieron en cuenta la capacidad máxima de expresión génica (transcripción y traducción) en la expresión de un gen exógeno en plantas. Por lo tanto, la introducción de un gen exógeno se intentó únicamente en variedades de plantas que se usaban de forma ordinaria para experimentos. Los presentes inventores se centraron en la "capacidad máxima" de las plantas y supusieron que los productos de genes exógenos se podrían acumular a concentraciones mayores al usar mutantes defectivos en una proteína en particular. En consecuencia, los inventores intentaron expresar y acumular un gen exógeno utilizando plantas mutantes.

35 Se conocen varios mutantes que carecen de proteína de almacenamiento principal para el arroz, tales como LGC-1 y α 123. Los presentes inventores predijeron que la cantidad de aminoácidos libres disponibles para la traducción de proteínas en estos mutantes defectivos en proteína de almacenamiento de semillas es mayor que en plantas normales, ya que no se utilizan los aminoácidos libres para la biosíntesis de la proteína de almacenamiento acumulada normalmente. Además, los presentes inventores consideraron que el uso del promotor de la glutelina en LGC-1 podría permitir niveles mayores de expresión del gen exógeno, ya que la expresión del gen de la glutelina está suprimida en LGC-1 y, por tanto, se pueden utilizar factores de transcripción que se usan originalmente para la expresión de la glutelina para la expresión del gen exógeno.

45 Así, los presentes inventores cruzaron LGC-1 o α 123 con 11-5, un transductante de glicinina, para introducir el gen de la glicinina en este mutante y estudiaron las concentraciones de glicinina acumulada en sus semillas. Como consecuencia, descubrieron que la cantidad de proteína glicinina acumulada aumentó de forma espectacular en ambas variedades de LGCx11-5 y α 123x11-5 en comparación con 11-5.

50 Por tanto, los presentes inventores desarrollaron con éxito un vector que expresa niveles altos de un gen exógeno en semillas de plantas utilizando la región no traducida en 5' de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas. También tuvieron éxito en la acumulación de concentraciones altas de producto de un gen exógeno en semillas de plantas usando un mutante defectivo en proteína de almacenamiento de semillas como objetivo para transferencia génica y, finalmente, llevaron a cabo la presente invención.

Más específicamente, la presente invención proporciona:

55 (1) un procedimiento para acumular producto de gen exógeno en semillas de plantas, que comprende las etapas de: introducir un vector que comprende un gen exógeno en una planta que es defectiva en proteína de almacenamiento de semillas endógena y expresar el gen exógeno en la planta, en el que dicho vector comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión del gen exógeno

en semillas de plantas, y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina, que se inserta entre el promotor y el gen exógeno, y en el que la etapa de introducción del vector no comprende cruce sexual;

5 (2) El procedimiento de acuerdo con (1) en el que la región no traducida en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

(3) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (2), en el que la proteína de almacenamiento de semillas defectiva en la planta se selecciona del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina.

10 (4) Una célula de planta transformada derivada de una planta mutante que es defectiva en proteína de almacenamiento de semillas endógena en la cual se ha introducido un vector como se define en (1);

(5) la célula de planta transformada de acuerdo con (4) en la que la región no traducida en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

15 (6) la célula de planta transformada de acuerdo con uno cualquiera de (4) o (5), en la que la proteína de almacenamiento de semillas defectiva en la planta es una proteína seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina;

(7) una planta transgénica que comprende la célula de planta transformada de acuerdo con uno cualquiera de (4) a (6);

20 (8) un vector que comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión en semillas de plantas y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina; que se inserta entre el promotor y el gen exógeno;

(9) el vector de acuerdo con (8), en el que la región no traducida en 5' del gen de la glutelina comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

25 (10) el vector de acuerdo con cualquiera de (8) o (9), en el que el promotor que garantiza la expresión en semillas de plantas es un promotor de un gen que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina;

(11) una célula de planta transformada en la que se introduce el vector de acuerdo con cualquiera de (8) a (10);

(12) una planta transgénica que comprende la célula de planta transformada de acuerdo con (11);

30 (13) una planta transgénica que es una progenie o clon de la planta transformada de acuerdo con (7) o (12); y que comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión del gen exógeno en semillas de plantas, y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina, que se inserta entre el promotor y el gen exógeno.

35 (14) un material de reproducción de la planta transgénica de acuerdo con uno cualquiera de (7), (12) y (13) y que comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión del gen exógeno en semillas de plantas, y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina, que se inserta entre el promotor y el gen exógeno.

40 La presente invención proporciona un procedimiento para acumular concentraciones altas de producto de un gen exógeno en semillas de plantas. Este procedimiento se caracteriza por el uso de una planta mutante que es defectiva en proteína de almacenamiento de semillas endógena como objetivo para expresar el gen exógeno. En el presente documento, el término "defectivo" no sólo comprende una delección completa, sino también una delección parcial. En plantas de este tipo, se considera que la cantidad de aminoácidos libres que están disponibles para la traducción de proteínas es mayor que en plantas normales; esto permite una acumulación eficaz de producto de traducción de un gen exógeno en semillas. No hay ninguna limitación en particular sobre la proteína de almacenamiento de semillas defectiva en plantas; la invención incluye, por ejemplo, glutelina, globulina, prolamina y albúmina.

45 Se pueden seleccionar plantas defectivas en estas proteínas a partir de semillas de plantas tratadas por irradiación, tal como con rayos γ , o con un agente inductor de mutaciones, tal como EMS y MNU. Se pueden seleccionar plantas mutantes por el procedimiento de bisección de semillas. Específicamente, se parte una semilla en dos y se extrae la proteína del endospermo para seleccionar semillas con el fenotipo deseado. Se pueden obtener progenies a partir de los embriones correspondientes al endospermo seleccionado con el fenotipo deseado.

De forma alternativa, se pueden generar plantas con una disminución del nivel de acumulación de proteína de almacenamiento de semillas a través de la cosupresión o el procedimiento antisentido. Para la cosupresión, se modifica una parte de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas que se quiere hacer disminuir y se introduce en plantas. De esta manera, se pueden suprimir las expresiones de genes que tienen una

5 homología mayor de un valor determinado con el gen modificado (por ejemplo, en el mutante LGC-1 mencionado anteriormente, originado a partir de plantas irradiadas con rayos γ , se sugiere que se ha producido cosupresión, debido a la mutación del gen de la subunidad $\alpha 1$ de la glutelina). Por otro lado, en el procedimiento antisentido, se introduce en plantas un ADN que codifica un ARN antisentido que es complementario al producto de transcripción de un gen que se quiere reducir.

10 De acuerdo con la presente invención, también se pueden usar mutantes de arroz conocidos que carecen proteína de almacenamiento principal, tales como LGC-1 y $\alpha 123$.

Como gen exógeno se puede usar cualquier gen adecuado para su expresión en las semillas de plantas. Por ejemplo, usando glicinina de soja como gen exógeno se pueden producir cultivos con altos valores añadidos, ricos en nutrición, que tienen excelentes características para su procesamiento y/o funcionamiento para mantener y mejorar la salud haciendo disminuir la concentración sanguínea de colesterol en el ser humano (en la patente N.º 3030339). De forma alternativa, se pueden introducir en arroz un gen de vacuna para inmunotratamiento pasivo, un

15 gen de glutelina modificado en el que se integra un péptido fisiológicamente activo en su región variable o un gen de enzima útil, para producir arroz con alto valor añadido.

Con el fin de expresar un gen exógeno en semillas de plantas, se puede usar de forma favorable un vector que comprenda el gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión en semillas de plantas. En el presente documento, la expresión "unido de forma funcional" significa que el gen exógeno y el promotor están unidos de forma que se expresa el gen exógeno en respuesta a la activación del promotor.

20

Por ejemplo, para la expresión en semillas de arroz, se puede usar el promotor del gen de la glutelina (Takaiwa, F. *et al.*, Plant Mol. Biol. 17: 875-885 (1991)) como el promotor de la expresión del gen exógeno. Cuando se expresa en plantas de vaina, tales como judía verde redonda, haba caballar y guisante; o plantas de semilla oleaginosa, tales como cacahuete, sésamo, colza, algodón, girasol y alazor, se puede usar el promotor del gen de la glicinina o el promotor de un gen de una proteína de almacenamiento principal de las plantas correspondientes. Por ejemplo, se pueden usar el promotor del gen de la faseolina (Murai, N. *et al.*, Science 222: 476-482 (1983)) y el promotor del gen de la cruciferina (Rodin, J. *et al.*, Plant Mol. Biol. 20: 559-563 (1992)) para la judía verde y la colza, respectivamente.

25 Los promotores anteriores se dan únicamente como ejemplos, y también se pueden usar promotores para expresión constitutiva, tales como el promotor 35S.

30

Es preferible insertar una región no traducida en 5' de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas entre el promotor y el gen exógeno en el interior de un vector para la acumulación eficaz del producto del gen exógeno en semillas de plantas.

Los ejemplos de una región no traducida en 5' de este tipo incluyen las de genes que codifican glutelina (X54313, gen GluA-3 para glutelina de *Oryza sativa*, gi|20207|emb|X54313.1|OSGLUA3 [20207]; X54314, gen GluB-1 para glutelina de *O. sativa*, gi|20209|emb|X54314.1|OSGLUB1[20209]), globulina (X62091, GLOBULINA DE BAJO PESO MOLECULAR, gi|5777591|emb|X62091.1|OSLMWG[5777591]), prolamina (D11385, ARNm para prolamina de *Oryza sativa*, scd completa, gi|218186|dbj|D11385.1 |RICPLM [218186]) y albúmina (D11431, gen RA17 del arroz para proteína alérgena, scd completa, gi|218194|dbj| D11431.1 |RICRA17[218194]; D11432, gen RA14 del arroz para proteína alérgena, scd completa, gi|218192|dbj|D11432.1|RICRA14[218192]). Se prefieren especialmente las regiones no traducidas en 5' en forma completa. En la presente invención, también se pueden usar regiones no traducidas en 5' quiméricas derivadas de genes que codifican dos proteínas de almacenamiento de semillas diferentes. La región no traducida en 5' completa del gen GluB-1 se muestra en la SEQ ID NO: 1.

35

40

Se pueden construir un vector en el que se inserta una región no traducida en 5' corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión en semillas de plantas y un vector en el que además se inserta un gen exógeno usando técnicas de manipulación génica conocidas por los expertos en la técnica.

45

Teniendo en cuenta la esencia de la presente invención, no hay ninguna limitación sobre las plantas para derivar una célula de planta para introducir un vector, siempre que sea una planta con semillas. Por ejemplo, las plantas que engloba la presente invención incluyen cereales tales como arroz, cebada, trigo, centeno y maíz; vainas tales como judía verde redonda, haba caballar y guisante; y plantas de semilla oleaginosa, tales como cacahuete, sésamo, colza, algodón, girasol y alazor; etc.

50

Las formas de célula de planta contempladas para la introducción de un vector en la presente invención incluyen todo tipo de formas que se puedan regenerar en una planta. Por ejemplo, las formas que engloba la presente invención incluyen células cultivadas, protoplastos, primordios de brotes, poliblastos, raíces pilosas y callos, pero no se limitan a ellas. Las células de una planta también se incluyen en la célula de planta de la presente invención.

55

Se pueden usar procedimientos conocidos por los expertos en la técnica para introducir un vector en células de plantas. Por ejemplo, tales procedimientos incluyen transducción indirecta, usando genes de *Agrobacterium*

tumefaciens o *Agrobacterium rhizo* (Hiei, Y. *et al.*, Plant J. 6: 271-282 (1994); Takaiwa, F. *et al.*, Plant Sci. 111: 39-49 (1995)); y transducción directa, representada por el procedimiento de electroporación (Tada, Y. *et al.*, Theor. Appl. Genet. 80: 475 (1990)), el procedimiento de polietilenglicol (Datta, S.K. *et al.*, Plant Mol. Biol. 20: 619-629 (1992)) y el procedimiento de bombardeo de partículas (Christou, P. *et al.*, Plant J. 2: 275-281 (1992); Fromm, M.E., Bio/Technology 8: 833-839 (1990)).

Se pueden producir plantas regenerando una célula de planta transformada. El procedimiento para la regeneración puede diferir en función del tipo de planta. Sin embargo, los procedimientos representativos incluyen el procedimiento de Fujimura *et al.* (Fujimura, T. *et al.*, Plant Tissue Culture Lett. 2: 74 (1995)), el procedimiento de Armstrong *et al.* (Armstrong, C.L. y Phillips R.L., Crop Sci. 28: 363-369 (1988)) y el procedimiento de Radke *et al.* (Radke, S.E. *et al.*, Theor. Appl. Genet. 75: 685-694 (1988)) para arroz, maíz y colza, respectivamente.

Además de los procedimientos anteriores, se puede usar el cruce para introducir un gen exógeno en una planta defectiva en proteína de almacenamiento de semillas endógena. Por ejemplo, en primer lugar, se genera una planta que alberga el gen exógeno en el interior del genoma introduciendo el vector mencionado anteriormente. Después, se cruza la planta con una planta que es defectiva en proteína de almacenamiento de semillas endógena para introducir un gen exógeno en la planta defectiva en proteína de almacenamiento de semillas endógena.

Una vez obtenida una planta transgénica, en la que se introduce un gen exógeno en el genoma, se puede obtener la progenie de la planta por reproducción sexual. De forma alternativa, se pueden obtener materiales de propagación (tales como semillas, variedad, callo y protoplasto) a partir de la planta y la progenie o clones de la misma como material de partida para generar la planta en grandes cantidades. Las plantas transgénicas de la presente invención pueden acumular concentraciones altas de producto de un gen exógeno en semillas expresando el gen exógeno. En consecuencia, se pueden modificar de forma eficaz el valor alimenticio, las características para el procesamiento, la función de mejora de la salud, etc. de una semilla en función de la característica del producto del gen exógeno seleccionado para su acumulación en el interior de la semilla. Además, se pueden fabricar de forma eficaz productos farmacéuticos y materiales industriales acumulando anticuerpo o enzima en semillas.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra las construcciones usadas para estudiar el efecto de una región no traducida en 5' (UTR).

La fig. 2 muestra el resultado de la comparación de los niveles de acumulación de glicinina medidos en las plantas transformadas con las construcciones que comprenden la región no traducida en 5' de la fig. 1.

La fig. 3 muestra la acumulación y expresión de la glicinina de soja en semillas de arroz transgénicas. (A) muestra fotografías que demuestran los resultados del análisis de SDS-PAGE (arriba) y del análisis de transferencia de bandas Northern (abajo). (B) muestra un cuadro en la que se cuantifican y comparan los resultados de (A). N indica la planta que comprende una secuencia quimérica de la regiones no traducidas de la glutelina y la glicinina; ATG la que comprende la región no traducida en 5' completa del gen de la glutelina; 11-5 un transductante con el gen de la glicinina convencional; y No-tra una planta no transgénica.

La fig. 4 es una fotografía que representa el efecto del fenotipo deficiente en glutelina sobre la acumulación de producto de gen exógeno mediante análisis de SDS-PAGE de las proteínas de endospermo. 11-5 indica Matsuyama-mii transgénica que comprende el gen de la (A1aB1b); LGC indica LGC-1; y No-tra la planta no transgénica.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, se describirá específicamente la presente invención usando ejemplos, pero no se debe interpretar como limitada a los mismos.

Ejemplo 1. Construcción de vector de expresión de glicinina de soja usando un promotor mejorado y generación de planta de arroz que expresa glicinina de soja

(1) Construcción de gen quimérico y transferencia génica

Se enlazó un ADNc que codificaba glicinina (A1aB1b) al promotor del gen GluB-1. Entre el ADNc y el promotor, se insertó una secuencia quimérica (45 pb) de las regiones no traducidas de glutelina (+1 a 18) y glicinina (-27 a ATG) para N, y la región no traducida en 5' completa (44 pb) del gen GluB-1 para ATG (fig. 1). Como control, se construyó un vector de expresión insertado con la región no traducida en 5' de pSaDb, la secuencia potenciadora de un gen de fotosíntesis del tabaco. Estos plásmidos que comprendían estos genes quiméricos se introdujeron en arroz (*Oryza sativa* vc Kitaake) usando el procedimiento de *Agrobacterium* (Goto, F. *et al.*, Nat. Biotechnol. 17: 282-286 (1999)).

Se seleccionó 11-5 de arroz (*Oryza sativa* vc Matsuyama-mii) al que se ha transferido por el procedimiento de electroporación un gen quimérico en el que un ADNc que codificaba glicinina (A1aB1b) estaba unido al promotor del gen GluB-1 (-1302 a +18).

(2) Efecto de la región no traducida en 5' del gen GluB-1 sobre la expresión de gen exógeno en semillas de plantas

Se introdujo un gen en plantas por el procedimiento de *Agrobacterium* y se analizó la concentración de proteína de las semillas (T1) de las plantas obtenidas. Comparando N, pSaDb y ATG, se reveló que la frecuencia de aparición de plantas que acumulan concentraciones altas de glicinina es mayor en el orden de ATG > N > pSaDb (fig. 2).

Posteriormente, se seleccionaron variedades con los niveles de expresión más altos de cada una de las variedades transgénicas N y ATG que acumulaban concentraciones altas de glicinina, y se autofecundaron para obtener un homocigoto. Después, se analizaron los niveles de ARNm y proteína en homocigotos como sigue. Para el análisis de ARN, en primer lugar, se extrajo ARN por el procedimiento de SDS-fenol. Se congelaron 12 semillas inmaduras aproximadamente 15 días después de la floración con nitrógeno líquido y se molieron en un mortero en polvo fino. Con esto se mezcló tampón (Tris-HCl 0,1 M (pH 9,0), SDS al 1 %, NaCl 0,1 M, EDTA 5 mM) y fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se extrajo el ácido nucleico total. Se centrifugó la muestra para recuperar el sobrenadante y se extrajo de nuevo con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Después, se recogió el ácido nucleico total por precipitación con etanol y se redisolvió en agua destilada. Después, se precipitó el ARN en LiCl 2 M y se recuperó por centrifugación como la muestra. El ARN se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 % y se transfirió a una membrana de nailon. La membrana preparada se hibridó con ADNc de glicinina marcado con ³²P (A1aB1b) a 42 °C en formamida al 50 % (v/v), SSC 6x, SDS al 0,5 % (p/v) y solución de Denhardt 5x. Después, se lavó la membrana tres veces en SSC 2x, solución de SDS al 0,1 % a temperatura ambiente, y una vez en SSC 0,1x, solución de SDS al 0,1 % a 55 °C durante 20 min. Para el análisis de proteína, se extrajo la proteína total usando 250 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8) que contenía glicerol al 10 % (v/v), SDS al 0,25 % (p/v) y 2-mercaptoetanol al 5 %) por 10 mg de semilla madura. La proteína extraída se trató a 100 °C durante 5 min y después se sometió a SDS-PAGE. La SDS-PAGE se realizó usando un gel de poli(acrilamida) al 15 % (p/v) (acrilamida:N, N'-metileno-bisacrilamida = 30:0,8).

Como resultado, se descubrió que los niveles de expresión de A1aB1b en N y ATG eran, respectivamente, 1,43 y 6,56 veces el medido en 11-5 (fig. 3). De acuerdo con una comparación del nivel de acumulación de proteína separando las subunidades ácidas de la glicinina por SDS-PAGE, los niveles de acumulación de A1aB1b en N y ATG fueron, respectivamente, 1,40 y 1,62 veces el medido en 11-5 (fig. 3). Estos resultados muestran que la inserción de una región no traducida en 5', específicamente la región no traducida en 5' completa del gen GluB-1, entre el promotor del gen GluB-1 y un ADNc que codifica la glicinina (A1aB1b) es eficaz para mejorar el nivel de expresión de un gen exógeno.

Ejemplo 2. Desarrollo de una técnica para acumular producto de gen exógeno en una concentración alta usando mutantes

Se cruzó 11-5 (Momma, K. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 314-318 (1999)) con LGC-1 (Iida, S. *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 87: 374-378 (1993)) o α 123 (Iida, S. *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 94: 177-183 (1997)), y se recogieron sus semillas F1. Se partieron las semillas en dos (el procedimiento de bisección de semillas) y se usó el endospermo para la extracción de proteína y análisis por SDS-PAGE. Con base en el resultado del análisis por SDS-PAGE, se seleccionaron semillas que mostraban una banda intensa correspondiente a la glicinina y una banda débil para la subunidad ácida de la glutelina. Repitiendo esta selección, se obtuvieron plantas que son homogéneas en todos los fenotipos.

Se analizaron las proteínas del endospermo en LGCx11-5 y α 123x11-5 por SDS-PAGE (fig. 4). Como consecuencia, LGCx11-5 mostró el fenotipo de LGC-1 en el que la banda para todas las subunidades ácidas de la glutelina de 37 a 39 kDa se hizo débil (la cantidad total de glutelina disminuyó hasta aproximadamente un tercio). En contraste, la banda correspondiente a la subunidad ácida de la glicinina del producto transgénico se ensanchó significativamente (1,4 veces) en comparación con el transductante de glicinina 11-5. Por otro lado, los α 123x11-5 eran defectivos en las subunidades ácidas de glutelina α 1, α 2 o α 3 y mostraron el mismo fenotipo que α 123. En α 123x 11-5, la banda correspondiente a las subunidades ácidas de la glicinina del producto transgénico se ensanchó significativamente (1,7 veces) en comparación con el transductante de glicinina 11-5.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de producto transgénico acumulado, glicinina A1aB1b. Específicamente, se manchó una membrana de nitrocelulosa con las proteínas totales extraídas de las semillas y se sometieron a inmunotransferencia de bandas usando anticuerpo anti-glicinina (A1aB1b). Como consecuencia, la banda de la subunidad ácida de la glicinina del producto transgénico se ensanchó significativamente en semillas de plantas que fueron cruzadas con LGC-1. Además, se obtuvo un resultado similar para las cruzadas con α 123. Estos resultados revelaron que la adición del fenotipo defectivo en proteína de almacenamiento de semillas a una línea que acumula producto de gen exógeno en el endospermo de semillas permite la acumulación del producto del gen exógeno a una concentración alta.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un procedimiento para acumular concentraciones altas de producto de un gen exógeno en semillas de plantas. El procedimiento de la presente invención puede servir como una técnica fundamental importante para el desarrollo de productos agrícolas y alimentos útiles.

5 Listado de secuencias

<110> National Institute of Agrobiological Sciences
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

10 <120> PROCEDIMIENTO PARA ACUMULAR PRODUCTO DE GEN EXÓGENO A UNA CONCENTRACIÓN ALTA
EN SEMILLAS DE PLANTAS

<130> MOA-A0004P

15 <140>
<141>

<150> Documento JP 2000-251606
<151> 22-08-2000

20 <160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

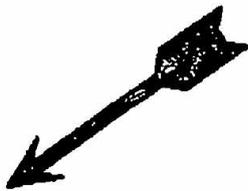
25 <210> 1
<211> 44
<212> ADN
<213> Oryza sativa (Kasalath)

30 <400> 1
tcacatcaat tagcttaagt ttccataagc aagtacaaat agct
44

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para acumular producto de un gen exógeno en semillas de plantas, que comprende las etapas de: introducir un vector que comprende un gen exógeno en una planta mutante que es defectiva en proteína de almacenamiento de semillas endógena y expresar el gen exógeno en la planta, en el que dicho vector comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión del gen exógeno en las semillas de la planta, y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina, que está insertada entre el promotor y el gen exógeno, y en el que la etapa de introducción del vector no comprende cruce sexual.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la región no traducida en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína de almacenamiento de semillas defectiva en la planta está seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina.
4. Una célula de planta transformada derivada de una planta mutante que es defectiva en proteína de almacenamiento de semillas endógena en la que se ha introducido un vector que comprende un gen exógeno, en la que dicho vector comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión del gen exógeno en semillas de plantas, y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina, que está insertada entre el promotor y el gen exógeno.
5. La célula de planta transformada de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la región no traducida en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
6. La célula de planta transformada de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en la que la proteína de almacenamiento de semillas defectiva en la planta es una proteína seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina.
7. Una planta transgénica que comprende la célula de planta transformada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. Un vector que comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión del gen exógeno en semillas de plantas y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina; que está insertada entre el promotor y el gen exógeno.
9. El vector de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la región no traducida en 5' del gen de la glutelina comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
10. El vector de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que el promotor que garantiza la expresión en semillas de plantas es un promotor de un gen que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina.
11. Una célula de planta transformada en la que se introduce el vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
12. Una planta transgénica que comprende la célula de planta transformada de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Una planta transgénica que es una progenie o clon de la planta transformada de acuerdo con la reivindicación 7 o 12 y que comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión del gen exógeno en semillas de plantas, y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina, que está insertada entre el promotor y el gen exógeno.
14. Un material de cultivo de la planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7, 12 o 13 y que comprende un gen exógeno unido de forma funcional corriente abajo de un promotor que garantiza la expresión del gen exógeno en semillas de plantas, y una región no traducida en 5' completa de un gen que codifica una proteína de almacenamiento de semillas seleccionada del grupo que consiste en glutelina, globulina, prolamina y albúmina, que está insertada entre el promotor y el gen exógeno.

FIG. 1



Construcciones que comprenden la inserción de la región no traducida en 5'

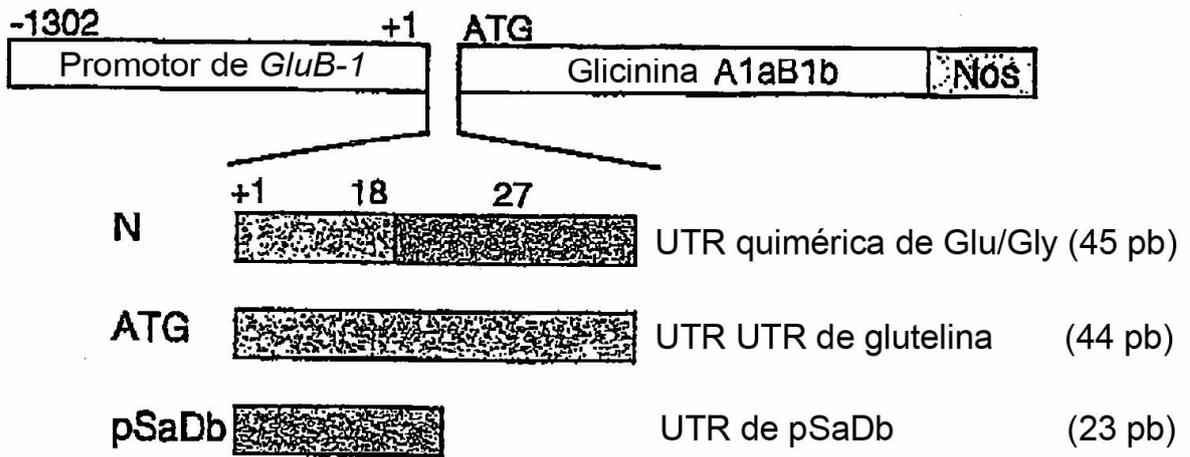


FIG. 2

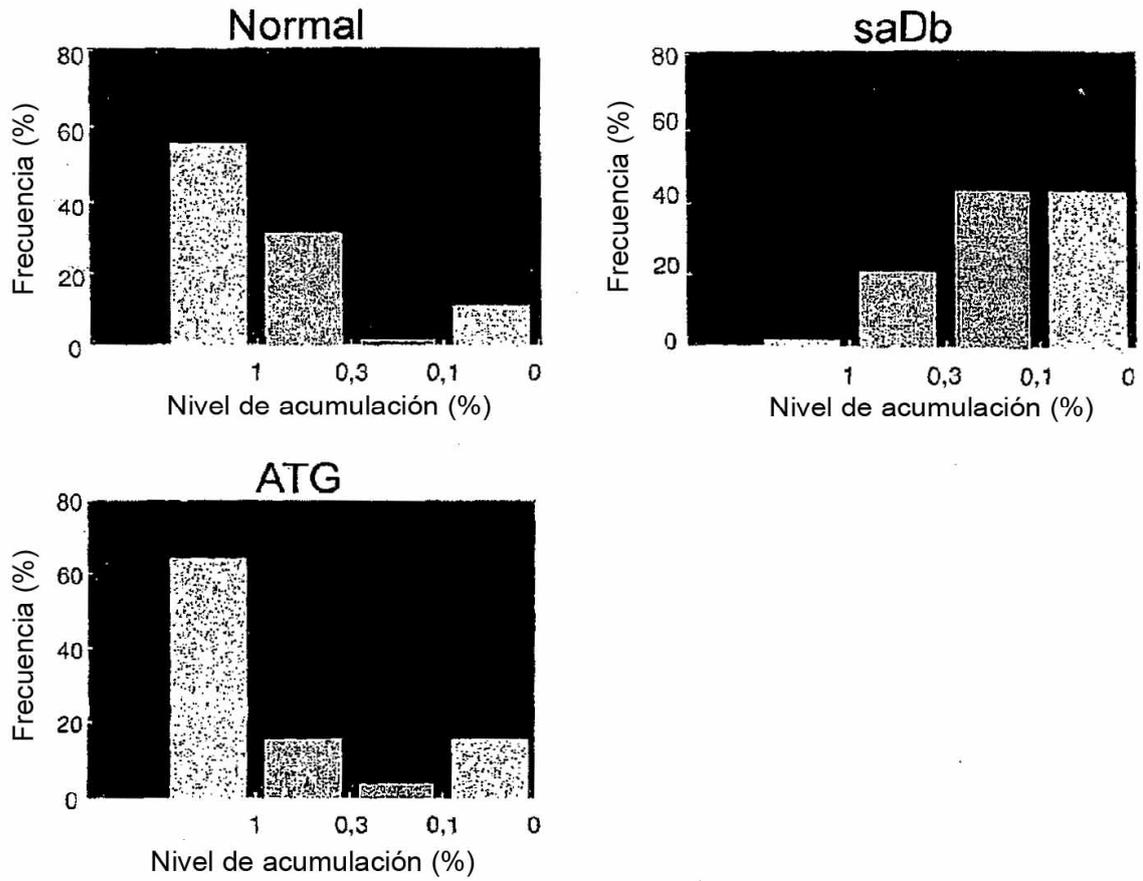
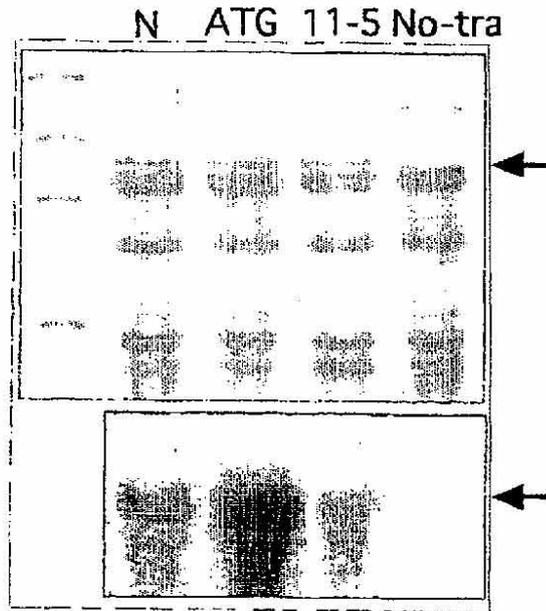


FIG. 3

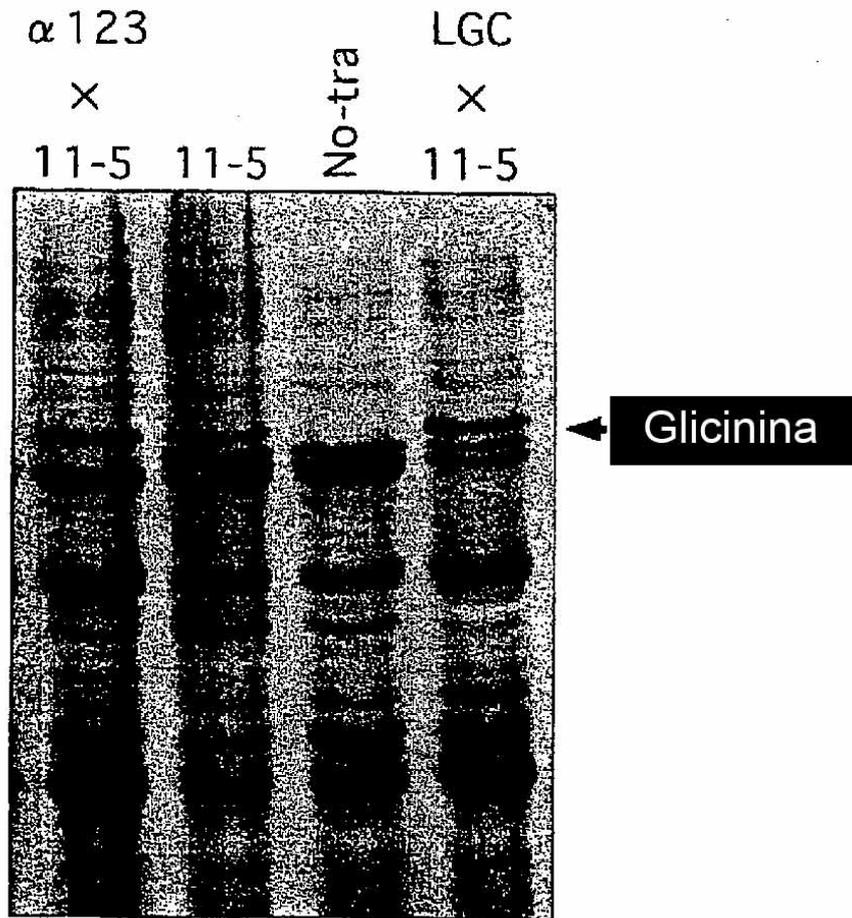
A



B

Transformante	Nivel de expresión	Proteína
N	1,43	1,40
ATG 10	6,56	1,62
Glicinina (11-5)	1,00	1,00

FIG. 4



Nombre	Proteína
LGC x 11-5	1,7
$\alpha 123$ x 1-5	1,4
Glicinina (11-5)	1