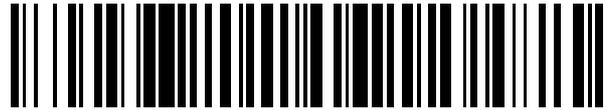


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 466**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2009 E 09770086 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2305025**

54 Título: **Planta genéticamente modificada capaz de biosintetizar capsinoides**

30 Prioridad:

23.06.2008 JP 2008163884

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

20.02.2015

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**KISAKA, HIROAKI;
LANG, YAQIN;
SUGIYAMA, RYUJI y
MIWA, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 529 466 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

Planta genéticamente modificada capaz de biosintetizar capsinoides

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para producir una planta genéticamente modificada que biosintetiza una cantidad aumentada de capsinoides, y a un método de producción de capsinoides a partir de la planta genéticamente modificada.

Antecedentes de la técnica

10 El capsaicinoide (capsaicina, dihidrocapsaicina, etc.), que es un componente picante del pimiento, es eficaz para prevenir la obesidad ya que promueve el metabolismo energético, estimula nervios centrales para promover la secreción de hormonas y activa la enzima lipolítica. Además, esteriliza el tracto gastrointestinal y mejora la inmunidad y es también eficaz para activar la inmunidad y mitigar la fatiga. Sin embargo, puesto que el capsaicinoide irrita la mucosa, su ingestión en grandes cantidades puede alterar el estado gastrointestinal. Además, a muchos japoneses no les gustan los sabores picantes.

15 Se ha comunicado que un pimiento menos picante, "CH-19 Sweet" (Registro de Variedad nº 10375), que es una variedad fijada y no picante de pimiento seleccionada y fijada por Yazawa et al., contiene una gran cantidad de nuevos capsinoides (por ejemplo, documento 1 de no patente). Dichos compuestos, que pertenecen a los capsinoides (éster de alcohol vainillíco y ácido graso, capsiato, dihidrocapsiato, etc., a los que más adelante se hace a veces simplemente referencia como "capsinoide" o "capsinoides"), son diferentes del capsaicinoide y no tienen un sabor picante. Sin embargo, se ha comunicado que muestran una acción potenciadora de la inmunidad, una acción activadora del metabolismo energético, una acción promotora del consumo de oxígeno, y similares (por ejemplo, documentos 1 y 2 de patente y documento 2 de no patente), y de ellos se espera que sean materiales de partida para suplementos y similares en el futuro.

25 En la mayoría de los pimientos, se forma vainillilamina a partir de fenilalanina a través de ácido ferúlico, vainillina y similares, y se produce capsaicinoide a partir de vainillilamina y un ácido graso de cadena ramificada mediante la capsaicinoide sintasa [Figura 1(a)]. Por contraste, apenas se produce capsaicinoide en CH-19 Sweet y en vez de él se produce capsinoide. Sin embargo, la razón de esto se ha desconocido durante años.

30 Como se mencionó anteriormente, los capsinoides tienen un sabor poco picante pero muestran actividades fisiológicas superiores similares a las del capsaicinoide. Por lo tanto, se espera su futura aplicación como material de partida para suplementos y similares. Por lo tanto, se desea clarificar la ruta biosintética de los capsinoides con el propósito de cultivar y desarrollar nuevas variedades vegetales capaces de producir capsinoides.

Referencias de la técnica previa

Documentos de patente:

Documento 1 de patente: JP-A-11-246478.

Documento 2 de patente: JP-A-2001-026538.

35 Documentos de no patente:

Documento 1 de no patente: Yazawa et al., Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, volumen 58, páginas 601-607, 1989.

Documento 2 de no patente: Biosci. Biotech. Biochem., 65 (12), 2735-2740 (2001).

Sumario de la invención

40 Problemas a resolver por la invención

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es clarificar la ruta biosintética de los capsinoides y, basándose en el hallazgo, obtener una planta capaz de producir capsinoides mediante la modificación genética de una planta distinta a la CH-19 Sweet actualmente conocida para producir capsinoides.

Medios para resolver los problemas

45 Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos para alcanzar el objeto anteriormente mencionado y han hallado que, en CH-19 Sweet, el gen pAMT que codifica la aminotransferasa que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina contiene una mutación por inserción. Es decir, se ha clarificado en cuanto a CH-19 Sweet que se produce un codón de parada a causa de una mutación por inserción de una base en la región de codificación del gen pAMT de la variedad picante "CH-19 Hot", que es una variedad

parental de la misma, y no se produce una aminotransferasa funcional. Los presentes inventores formularon la hipótesis de que, como resultado de la mutación del gen pAMT, en CH-19 Sweet se hace dominante una reacción de reducción de vainillina a alcohol vainílico en lugar de la conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina, y que otra reacción de esterificación con un ácido graso de cadena ramificada da lugar a la producción de capsinoides [Figura 1(b)].

Para verificar la hipótesis, los presentes inventores han preparado plantas transgénicas que tienen un ácido nucleico antisentido de pAMT introducido en una variedad picante, la variedad "Takanotsume" de *Capsicum annuum*. Se ha hallado que disminuye la producción de capsaicinoide pero aumenta notablemente la producción de capsinoide en una estirpe que muestra una expresión notablemente disminuida del gen pAMT entre las plantas transgénicas obtenidas.

Los presentes inventores han llevado a cabo más estudios basados en estos hallazgos y han completado la presente invención.

En consecuencia, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Un método para producir una planta genéticamente modificada que tiene una capacidad de producción de capsinoides aumentada, que comprende llevar a cabo una modificación genética para disminuir la expresión o actividad de una enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina en una planta que tiene un sistema para la biosíntesis de capsaicinoide, en donde la planta pertenece al género *Capsicum* y en donde la enzima es un producto del gen pAMT.

[2] El método según el punto [1] anterior, que comprende además seleccionar una planta que muestra una cantidad aumentada de producción de capsinoides en comparación con una planta no genéticamente modificada.

[3] El método según el punto [1] o [2] anterior, en donde la modificación genética es seleccionada del grupo que consiste en una introducción de un DNA que codifica un RNA antisentido, un iRNA, una ribozima o un mutante dominante-negativo para el susodicho gen enzimático, una destrucción del gen mediante un método de inactivación génica o un tratamiento con mutágenos, y una introducción de un gen que codifica un anticuerpo contra la enzima.

[4] Un método para producir capsinoide, que comprende recuperar el capsinoide de un fruto de una planta genéticamente modificada y distinta de CH-19 Sweet, que muestra una expresión o actividad disminuida de una enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina y una capacidad de producción de capsinoides aumentada, en comparación con poblaciones silvestres, en donde la planta pertenece al género *Capsicum* y la enzima es un producto del gen pAMT.

[5] El método según el punto [4] anterior, en donde la susodicha expresión o actividad disminuida de la enzima es causada por una destrucción o mutación del gen enzimático, una descomposición o una traducción suprimida de un producto de transcripción del gen, o una inhibición de la acción de la enzima sobre la vainillina.

Efecto de la invención

La presente invención también permite aumentar la producción de capsinoides en una variedad vegetal que no produce sustancialmente capsinoides o sólo produce una pequeña cantidad de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las esperadas rutas de síntesis de la capsaicina (a) y el capsiato (b).

La Figura 2 es un diagrama esquemático de un vector plasmídico Ti, pIG121-Hm, que tiene un gen pAMT insertado en la dirección antisentido.

La Figura 3 muestra los resultados de una PCR genómica usando DNA extraído de trozo(s) de hoja de pimiento transformado como un molde, en donde M es un marcador, C (del inglés, control) es un testigo (variedad "Takanotsume" de *Capsicum annuum* sin modificación genética), y cada número representa individuos seleccionados del pimiento transformado.

La Figura 4 muestra los resultados analíticos del contenido de capsiato (a) y el contenido de capsaicina (b) de frutos de pimiento transformado y CH-19 Sweet y la variedad "Takanotsume" de *Capsicum annuum*.

La Figura 5 muestra los resultados analíticos de la expresión de la transcripción del gen pAMT en frutos de pimiento transformado y la variedad "Takanotsume" de *Capsicum annuum*.

La Figura 6 muestra los resultados analíticos de proteínas extraídas de frutos de pimiento transformado, mediante análisis por transferencia Western, en donde cada carril es 1: CH-19 Hot, 2: TG-1, 3: TG-3, 4: TG-8, 5: TG-14, y 6: CH-19 Sweet.

Modo de llevar la invención a cabo

La presente invención proporciona un método para producir una planta genéticamente modificada capaz de producir capsinoides en comparación con poblaciones silvestres, que muestra una expresión o actividad disminuida de una enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina.

5 En la presente invención, la "población silvestre" significa una planta que va a ser la diana de una modificación genética en la presente invención. La población silvestre que se va a utilizar en la presente invención puede ser cualquiera con tal de que exprese funcionalmente el grupo enzimático [por ejemplo, fenilalanina amonio liasa (PAL), ácido cinámico 4-hidrolasa, (Ca4H), ácido cumárico 3-hidrolasa (Ca3H), ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT) y capsaicinoide sintasa (CS)] necesario para la biosíntesis de capsaicinoide. La planta puede tener dicho grupo enzimático por naturaleza, o se pueden proporcionar una o más enzimas mediante la expresión de un gen extraño. 10 Preferiblemente, la población silvestre que se puede utilizar para la presente invención es una planta que tiene por naturaleza la capacidad para producir capsaicinoide. La planta pertenece al género *Capsicum*. Los ejemplos de la misma incluyen, pero no se limitan a, *C. annuum* (variedad "Takanotsume", CH-19 Hot, "Yatsufusa", "Toranoo", "Fushimiama"), *C. baccatum* (ají amarillo), *C. chinense* (chile habanero, Bhut Jolokia), *C. frutescens* (*Capsicum frutescens* L.) y *C. pubescens* (rocoto). 15

Las enzimas que catalizan una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina son la aminotransferasa pAMT (supuesta aminotransferasa; del inglés, putative AMT) que presenta una elevada homología con la GABA aminotransferasa del arroz o el tomate, que se halló en el chile habanero, y la aminotransferasa codificada por su ortólogo en otra variedad vegetal.

20 Más específicamente, la proteína pAMT (a la que también se hace referencia como producto del gen pAMT) usada en la presente invención es una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos igual o sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. n° 2 y que tiene una actividad aminotransferasa al menos equivalente (por ejemplo, por un factor de 0,5 o más, preferiblemente un factor de 0,7 o más) a la de la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. n° 2. En esta memoria, la expresión "una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual" significa una secuencia de aminoácidos de una variante alélica natural o un polimorfismo génico de la proteína pAMT derivada de CH-19 Hot que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. n° 2, y una secuencia de aminoácidos de su ortólogo en otra variedad vegetal. Los ejemplos del ortólogo de pAMT en otra variedad vegetal incluyen la pAMT derivada del chile habanero (Refseq n° AAC78480), la GABA aminotransferasa del arroz (Refseq n° AAQ14479) y la GABA aminotransferasa del tomate (Refseq n° AAO92257). 30

La expresión "una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual" anteriormente mencionada representa deseablemente una similitud (preferiblemente, la identidad) no inferior al 80%, preferiblemente no inferior al 90%, más preferiblemente no inferior al 95%, lo más preferiblemente no inferior al 97%, con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. n° 2. En esta memoria, la "similitud", cuando se alinean dos secuencias de aminoácidos usando un algoritmo matemático conocido en la técnica, significa la proporción (%) de restos de aminoácido iguales y similares con respecto a los restos de aminoácido solapantes totales en una alineación óptima (preferiblemente, el algoritmo puede tener en cuenta la introducción de hueco(s) en una de las secuencias o en ambas para una alineación óptima). La similitud de secuencias de aminoácidos en la presente memoria descriptiva puede ser calculada utilizando el algoritmo NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) para cálculo de homologías, bajo las condiciones siguientes (expectativa = 10; permisión de huecos; matriz = BLOSUM62; filtración = sin efecto). 35 40

En la presente invención, un grupo enzimático del sistema para la biosíntesis de capsinoide es al menos parcialmente común con un grupo enzimático que constituye un sistema para la biosíntesis de capsaicinoide, salvo aquellos que catalizan la reacción de reducción de vainillina a alcohol vainílico, y la presente invención se basa en el hallazgo de que la relación cuantitativa entre el capsinoide y el capsaicinoide producidos depende de cuál de las reacciones se produzca más predominantemente, la anteriormente mencionada reacción de reducción o una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina. Por lo tanto, al reducirse la expresión o actividad de una enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina con respecto a la expresión o actividad de poblaciones silvestres, la reacción de reducción de vainillina a alcohol vainílico se vuelve más dominante y, como resultado, se puede mejorar la capacidad para la producción de capsinoide. 45 50

La "expresión" de la enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina significa que un producto de traducción (es decir, una proteína) es producido por el gen pAMT y se localiza en su sitio de acción en un estado funcional. La "menor expresión" de una enzima significa el resultado de una cantidad proteica significativamente disminuida de la enzima presente en una planta genéticamente modificada, en comparación con la cantidad en una población silvestre. Por lo tanto, se puede llevar a cabo una modificación genética para reducir la expresión de la enzima en cualquier fase, por ejemplo, a nivel génico, nivel de transcripción, nivel de regulación después de la transcripción, nivel de traducción y nivel de modificación después de la traducción. 55

Por ejemplo, como una modificación genética que suprime la expresión de la enzima a nivel génico, se pueden mencionar la destrucción del gen de la enzima y la introducción de una mutación funcionalmente defectuosa. En

esta memoria, la "mutación funcionalmente defectuosa" puede ser una mutación que disminuya la actividad enzimática de modo que aumente significativamente la producción de capsinoide en comparación con aquella en poblaciones silvestres, y no se plantea necesariamente una mutación que elimine completamente la actividad enzimática. Dicha modificación genética puede ser alcanzada mediante una técnica de inactivación (o modificación) génica de un gen enzimático utilizando una recombinación homóloga.

Como un medio específico para inactivar un gen enzimático, se puede emplear preferiblemente un método que incluye aislar un gen enzimático (DNA genómico) derivado de una planta que va a ser una diana de la modificación genética (es decir, una población silvestre) mediante un método convencional (por ejemplo, se puede clonar DNA genómico de pAMT mediante un método de hibridación de colonias o placas a partir de un banco de DNA genómico preparado a partir de DNA genómico aislado de una población silvestre, usando como una sonda un ácido nucleico que contiene la totalidad o parte de la secuencia de bases del cDNA de pAMT derivado de CH-19 Hot, mostrado mediante la ID. SEC. nº 1), e insertar una cadena de DNA (vector de direccionamiento) que tiene una secuencia de DNA construida para inactivar el gen en el locus del gen enzimático de una población silvestre mediante recombinación homóloga. Se prepara una cadena de DNA (vector de direccionamiento) que tiene una secuencia de DNA construida para inactivar el gen, por ejemplo,

(1) insertando otro fragmento de DNA (por ejemplo, un gen marcador de selección de un gen de resistencia a fármacos o un gen informador) en la región exónica o la región promotora del mismo para destruir la función del exón o del promotor,

(2) escindiendo la totalidad o parte del gen enzimático usando el sistema Cre-loxP o el sistema Flp-frt para suprimir el gen,

(3) insertando un codón de parada en una región de codificación de la proteína para evitar la traducción completa de la proteína, o

(4) insertando una secuencia de DNA (por ejemplo, una señal poliadenilada) que termine la transcripción génica en una región de transcripción para evitar la síntesis del mRNA completo.

El gen marcador de selección está preferiblemente en forma de un casete de expresión que contiene cualesquier promotores capaces de actuar intracelularmente en una planta diana. Cuando el gen se inserta de modo que se coloca bajo el control de un promotor endógeno del gen enzimático diana, el gen marcador de selección no requiere un promotor.

En general, la recombinación génica en la planta es en su mayoría no homóloga, y el DNA introducido se inserta aleatoriamente en cualquier posición del cromosoma. Por lo tanto, no se puede alcanzar una selección eficaz de sólo un clon dirigido a un gen enzimático mediante recombinación homóloga basándose en la selección por detección de resistencia a fármacos o la expresión de un gen informador. Por consiguiente, se hace necesaria la confirmación del sitio de recombinación de cualquier clon seleccionado mediante un método de hibridación Southern o un método de PCR. Por consiguiente, cuando, por ejemplo, el gen de timidina cinasa derivado del virus del herpes simple (HSV-tk; del inglés, herpes simplex virus-thymidine kinase) que imparte sensibilidad al ganciclovir es ligado fuera de la región homóloga con respecto a la secuencia diana en un vector de direccionamiento, una célula que tenga el vector aleatoriamente insertado en ella tiene un gen HSV-tk y, por lo tanto, la célula no puede crecer en un medio que contenga ganciclovir. Sin embargo, una célula dirigida a un locus de gen enzimático mediante recombinación homóloga se vuelve resistente al ganciclovir puesto que no tiene un gen HSV-tk y puede ser seleccionada. Alternativamente, cuando, por ejemplo, se liga un gen de toxina diftérica en lugar del gen HSV-tk, puesto que una célula que tenga el vector aleatoriamente insertado en ella muere por la toxina que produce, también se puede seleccionar un recombinante homólogo en ausencia de un fármaco. La presencia de DNA introducido puede ser confirmada sometiendo una parte de la colonia resistente formada a una PCR o una hibridación Southern.

Como otra modificación genética para suprimir la expresión de una enzima a nivel génico, se puede mencionar la introducción de una mutación funcionalmente defectuosa en un gen enzimático mediante un tratamiento con mutágenos. En cuanto al tratamiento con mutágenos, se puede utilizar cualquiera con tal de que provoque una mutación puntual, una delección o una mutación por desplazamiento del marco de lectura en el DNA de una población silvestre. Específicamente, se pueden mencionar los tratamientos con etilnitrosourea, nitrosoguanidina, benzopireno, colorante de acridina y radiación. Además, también se pueden emplear diversos agentes alquilantes y agentes carcinógenos como mutágenos. Como un método para hacer reaccionar un mutágeno con una célula, se puede utilizar el método descrito en Technique of Tissue Culture, 3ª edición (Asakura Publishing Co., Ltd.), The Japan Tissue Culture Association ed. (1996), y Nature Genet., 314 (2000). Se puede seleccionar una variante funcionalmente defectuosa de un gen enzimático usando la cantidad de proteína diana como un índice. En el caso de la pAMT, por ejemplo, se puede llevar a cabo un análisis por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal hacia la proteína pAMT y se puede determinar la cantidad de la proteína pAMT. En cuanto a una planta que muestre un nivel de proteína pAMT significativamente disminuido, se puede confirmar la introducción de una mutación en el gen determinando la secuencia de nucleótidos del gen enzimático aislado de una parte de la planta.

En cuanto a una modificación genética para suprimir la expresión de una enzima a nivel de traducción, se puede

mencionar la introducción de un ácido nucleico que tenga una actividad que degrade un producto de transcripción de un gen enzimático, o un ácido nucleico que suprima la traducción de un producto de transcripción en una proteína enzimática. En cuanto a tal ácido nucleico, se puede mencionar un ácido nucleico que contenga una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de la secuencia de nucleótidos del mRNA de la enzima, o una parte de la secuencia.

Una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria de la secuencia de nucleótidos del mRNA de una enzima diana significa una secuencia de nucleótidos que tiene complementación del nivel de capacidad de unirse a la secuencia diana del mRNA e inhibir la traducción del mismo bajo condiciones fisiológicas en la planta objetivo. Específicamente, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que tenga una similitud no inferior a aproximadamente 80%, preferiblemente no inferior a aproximadamente 90%, más preferiblemente no inferior a aproximadamente 95%, lo más preferiblemente no inferior a aproximadamente 97%, con respecto a la región que solapa con una secuencia de nucleótidos completamente complementaria de la secuencia de nucleótidos del mRNA (es decir, la secuencia de nucleótidos de la cadena complementaria del mRNA). La "similitud de secuencias de nucleótidos" se puede calcular en la presente invención usando el algoritmo NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) para cálculo de homologías y bajo las condiciones siguientes (expectativa = 10; permisión de huecos; filtración = activada; puntuación de apareamiento = 1; puntuación de apareamiento incorrecto = -3).

Más específicamente, por ejemplo, cuando la enzima es pAMT, los ejemplos de una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de la secuencia de nucleótidos del mRNA de pAMT incluyen (a) la secuencia de nucleótidos mostrada por la ID. SEC. n° 1 y (b) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos bajo condiciones rigurosas, que es una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de una secuencia que codifica una proteína que tiene una actividad equivalente a la de una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. n° 2. Bajo condiciones rigurosas significa, por ejemplo, las condiciones descritas en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999, tales como, por ejemplo, hibridación con SSC (cloruro sódico/citrato sódico) 6x/45 °C y luego lavado una o más veces con SSC 0,2x/SDS al 0,1%/50-65 °C, y quienes tienen una experiencia normal en la técnica pueden seleccionar apropiadamente unas condiciones de hibridación que proporcionen un rigor equivalente al de estas condiciones.

El mRNA de pAMT es preferiblemente mRNA de pAMT de CH-19 Hot que contiene la secuencia de nucleótidos mostrada por la ID. SEC. n° 1, o un ortólogo del mismo en otra variedad vegetal [por ejemplo, pAMT derivado de chile habanero (Refseq n° AF085149), GABA aminotransferasa de arroz (Refseq N° AF297651) y GABA aminotransferasa de tomate (Refseq n° AY240231), etc.], o, además, una variante alélica natural o un polimorfismo génico del mismo.

La "parte de una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de una secuencia de nucleótidos de mRNA de una enzima diana" no está particularmente limitada en términos de longitud y posición con tal de que se pueda unir específicamente al mRNA de la enzima diana e inhibir la traducción del mRNA hasta la proteína. Sin embargo, desde el punto de vista del aspecto de la especificidad secuencial, contiene al menos 10 bases, preferiblemente no menos de aproximadamente 15 bases, más preferiblemente no menos de aproximadamente 20 bases, de una parte complementaria o sustancialmente complementaria de la secuencia diana.

Específicamente, los ejemplos preferibles del ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de una secuencia de nucleótidos de mRNA de una enzima diana, o una parte de dicha secuencia, incluyen los ejemplos (a) a (c) siguientes.

(a) RNA antisentido con respecto al mRNA de la enzima diana;

(b) RNA de interferencia (iRNA; del inglés, interfering RNA) con respecto al mRNA de la enzima diana;

(c) ribozima con respecto al mRNA de la enzima diana.

(a) RNA antisentido con respecto al mRNA de la enzima diana

El "RNA antisentido" empleado en la presente invención es un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de la secuencia de nucleótidos del mRNA diana, o una parte de la misma, y tiene la función de suprimir las síntesis proteica al formar una doble cadena específica y estable con el mRNA diana. La región diana del RNA antisentido no está particularmente limitada en términos de longitud con tal de que la hibridación del RNA antisentido dé lugar a la inhibición de la traducción del mRNA diana hasta la proteína enzimática, y puede ser la secuencia de mRNA total que codifica la enzima o una secuencia parcial de la misma, en donde una más corta tiene una longitud de aproximadamente 10 bases y una más larga es la secuencia de mRNA total.

Además, el RNA antisentido de la presente invención no sólo puede hibridarse con el mRNA de la enzima diana para inhibir la traducción hasta una proteína sino también unirse a un gen de la enzima, que es un DNA de doble cadena, para formar una estructura triple e inhibir la transcripción hasta RNA (anti-gen).

(b) iRNA con respecto al mRNA de la enzima diana

En la presente memoria descriptiva se define también que un RNA de doble cadena que consiste en oligoRNA complementario de mRNA de la enzima diana y una cadena complementaria del mismo, es decir, iRNA, está incluido en el ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de una secuencia de nucleótidos de mRNA de una enzima diana, o una parte de la misma. En nematodos, insectos y plantas se conoce desde hace tiempo el fenómeno de la introducción intracelular de un RNA de doble cadena que da lugar a la degradación de mRNA complementario del RNA, la llamada interferencia de RNA (RNAi). Desde entonces, se ha confirmado que este fenómeno tiene lugar en gran medida en células animales [Nature, 411 (6836): 494-498 (2001)], y ha sido ampliamente utilizado como una técnica alternativa a la ribozima. Se puede diseñar apropiadamente un iRNA basándose en la información de la secuencia de nucleótidos del mRNA que va a ser la diana y utilizando un software comercialmente asequible (por ejemplo, RNAi Designer; Invitrogen).

(c) Ribozima con respecto al mRNA de la enzima diana

Como ribozima con la utilidad más amplia se puede mencionar el RNA de autoayuste que se ve en RNA infeccioso, tal como un viroide o un virusoide, y se conocen el tipo pez martillo y el tipo horquilla. El tipo pez martillo muestra actividad enzimática con sólo aproximadamente 40 bases y es posible escindir específicamente sólo el mRNA diana haciendo que varias bases de ambos extremos (aproximadamente 10 bases en total), adyacentes a la parte con estructura de pez martillo, formen una secuencia complementaria de un deseado sitio de escisión de mRNA. Puesto que este tipo de ribozima sólo contiene RNA como sustrato, es más ventajoso ya que no ataca al DNA genómico. Cuando el propio mRNA de la enzima diana tiene una estructura de cadena doble, la secuencia diana puede ser convertida en una cadena sencilla utilizando una ribozima híbrida a la que está ligado un motivo de RNA derivado de ácido nucleico de virus, capaz de unirse específicamente a una RNA helicasa [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (10): 5572-5577 (2001)]. Además, para promover la transferencia al citoplasma se puede utilizar una ribozima híbrida a la que esté además ligada una secuencia obtenida al modificar tRNA [Nucleic Acids Res., 29 (13): 2780-2788 (2001)].

Se puede producir un DNA que codifique un RNA antisentido para el mRNA de la enzima diana, cuando el RNA antisentido es comparativamente largo y tiene, por ejemplo, no menos de 100 pares de bases (bp; del inglés, *base pairs*), clonando cDNA de la enzima diana de acuerdo con un método convencional y ligando directamente el mismo, o ligando después de una fragmentación hasta una longitud deseada que contenga una región deseada mediante digestión con una enzima de restricción adecuada, a la región cadena abajo de un promotor capaz de actuar en la célula de la planta diana, en una dirección antisentido. Cuando el RNA antisentido es comparativamente corto y tiene, por ejemplo, 100 bp o menos, puede ser también químicamente sintetizado mediante un sintetizador automático de DNA/RNA comercialmente asequible.

Un DNA que codifique iRNA para el mRNA de la enzima diana puede ser construido como un DNA que codifique un dsRNA de tipo horquilla multiplicando la secuencia diana (por ejemplo, aproximadamente 200-500 bases) sobre mRNA mediante RT-PCR para obtener DNA de doble cadena y ligando dos DNAs de doble cadena en la dirección sentido y la dirección antisentido por medio de secuencias conectoras adecuadas utilizando una enzima de restricción y una ligasa. La secuencia conectora no está particularmente limitada en términos de su secuencia y longitud con tal de que pueda formar un bucle capaz de formar un dsRNA de tipo horquilla sobre la transcripción del DNA construido. Por ejemplo, cuando se utiliza un gen informador tal como el gen de β -glucuronidasa como una secuencia conectora, se puede determinar el recorte de iRNA del dsRNA de tipo horquilla mediante la detección de la expresión del gen informador.

El DNA que codifica la ribozima para el mRNA de la enzima diana puede ser preparado sintetizando, mediante un sintetizador automático de DNA/RNA, un DNA que tenga una secuencia de nucleótidos de la ribozima diseñada.

Se puede introducir un ácido nucleico que contenga una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de una secuencia de nucleótidos de mRNA de una enzima diana, o una parte de la misma, en una planta diana mediante cualquier método de ingeniería genética. Por ejemplo, se pueden mencionar la infección con un virus vegetal que contenga un genoma vírico genéticamente modificado para que contenga el ácido nucleico, y la transformación de una célula de la planta diana con un vector de expresión que contenga el ácido nucleico.

Preferiblemente, la planta genéticamente modificada producida en la presente invención es una planta transgénica obtenida al transformar la célula de la población silvestre con un vector de expresión que contiene el anteriormente mencionado ácido nucleico bajo el control de un promotor capaz de actuar en una célula de la planta diana (población silvestre).

El promotor capaz de actuar en una célula de la población silvestre puede ser apropiadamente seleccionado de acuerdo con la variedad vegetal utilizada como población silvestre. En general, se pueden mencionar un promotor génico constitutivamente expresado en una célula vegetal, preferiblemente un promotor constitutivo derivado de una planta o un virus vegetal [por ejemplo, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV; del inglés, *cauliflower mosaic virus*), el promotor 19S del CaMV, el promotor de NOS, etc.], y un promotor en cis de un gen enzimático diana de la población silvestre.

En el vector de expresión empleado en la presente invención, un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de una secuencia de nucleótidos de mRNA de una enzima diana, o una parte de la misma, está situado en la región cadena abajo de un promotor capaz de actuar en una célula de la población silvestre, de modo que la transcripción del mismo puede ser regulada por el promotor. Es preferible que en la región cadena abajo de la secuencia de ácido nucleico se añada además una señal de terminación de la transcripción (región terminadora) capaz de actuar en una población silvestre. Un ejemplo del terminador incluye el terminador del gen NOS (nopalina sintasa).

El vector de expresión utilizado en la presente invención puede contener además un elemento regulador en cis, tal como una secuencia potenciadora. Por otra parte, el vector de expresión contiene además deseablemente un gen marcador para la selección de un transformante, tal como un marcador génico de resistencia a fármacos [por ejemplo, el gen de neomicina fosfotransferasa II (NPTII; del inglés, *neomycin phosphotransferase II*), el gen de higromicina fosfotransferasa (HPT; del inglés, *hygromycin phosphotransferase*), el gen de fosfinotricina acetiltransferasa (PAT; del inglés, *phosphinothricin acetyltransferase*) y el gen de resistencia a glifosato].

Además, para facilitar la preparación y purificación a gran escala, el vector de expresión contiene deseablemente un origen de replicación que permite la replicación autónoma en *Escherichia coli*, y un gen marcador de selección en *Escherichia coli* (por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina, el gen de resistencia a tetraciclina, etc.). El vector de expresión utilizado en la presente invención puede ser convenientemente construido insertando un casete de expresión del ácido nucleico anteriormente mencionado y, si es necesario, un gen marcador de selección en un sitio de clonación de un vector pUC o pBR de *Escherichia coli*.

Cuando el ácido nucleico anteriormente mencionado se introduce utilizando la infección con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*, se puede insertar un casete de expresión del ácido nucleico en la región de T-DNA (región que se va a transferir al cromosoma de la planta) sobre un plásmido Ti o Ri retenido por la bacteria y hacer uso de él. Para un método estándar de transformación por el método del *Agrobacterium* se utiliza un sistema vectorial binario. La función necesaria para la transferencia de T-DNA es independientemente proporcionada tanto por el propio T-DNA como por el plásmido Ti (o Ri), y cada factor constitutivo puede estar dividido en diferentes vectores. Un plásmido binario tiene una secuencia marginal de 25 bp en ambos extremos, necesaria para el recorte y la inserción de T-DNA, y está exento de un gen de hormona vegetal que causa la agalla de la corona (o raíz peluda), lo que proporciona simultáneamente espacio para la inserción de un gen extraño. Como tal vector binario se dispone comercialmente de, por ejemplo, pBI101 y PBI121 (ambos de CLONTECH). La región vir que actúa sobre la inserción de T-DNA está situada en un plásmido Ti (o Ri) diferente, llamado plásmido auxiliar.

Para la transformación de plantas se pueden utilizar diversos métodos convencionalmente conocidos. Los ejemplos de los mismos incluyen un método que incluye aislar un protoplasto de una célula de una planta diana mediante un tratamiento con enzimas que degradan la pared celular, tales como celulasa y hemicelulasa, y añadir polietilenglicol a una suspensión del protoplasto y un vector de expresión que contiene el anteriormente mencionado casete de expresión del gen pAMT para insertar el vector de expresión en el protoplasto mediante un proceso de tipo endocitosis (método del PEG), un método que incluye insertar un vector de expresión en una vesícula de membrana lipídica, tal como de fosfatidilcolina, por sonicación y fusionar la vesícula y el protoplasto en presencia de PEG (método del liposoma), un método que incluye la fusión mediante un proceso similar usando una minicélula, y un método que incluye aplicar un impulso eléctrico a una suspensión de un protoplasto y un vector de expresión para insertar el vector en disolución extracelular en el protoplasto (método de electroporación). Sin embargo, estos métodos son complicados ya que es necesaria una técnica de cultivo para la rediferenciación del protoplasto en una planta. Como métodos del transgén en una célula intacta que tiene una pared celular, se pueden mencionar un método de microinyección que incluye presionar una micropipeta sobre una célula e inyectar intracelularmente un DNA vector con la pipeta mediante presión hidráulica o presión gaseosa, un método de introducción directa que incluye acelerar micropartículas metálicas revestidas con DNA mediante explosión de pólvora o presión gaseosa para la introducción intracelular, tal como un método de cañón de partículas, y un método en que se utiliza la infección con *Agrobacterium*. La microinyección presenta el defecto de que la operación requiere práctica y el número de células manipulables es pequeño. Por lo tanto, considerando la conveniencia de la operación, la planta es preferiblemente transformada mediante un método con *Agrobacterium* o un método de cañón de partículas. El método del cañón de partículas es más útil ya que se puede introducir directamente un gen en el meristemo apical de una planta antes de su cosecha. Además, en el método con *Agrobacterium*, al insertar simultáneamente un virus vegetal, por ejemplo, un DNA genómico de un geminivirus tal como el virus del mosaico dorado del tomate (TGMV; del inglés, *tomato golden mosaic virus*), entre secuencias marginales de un vector binario, la infección vírica se propaga por toda la planta al inocular meramente una suspensión celular con un tubo de jeringa en una célula de cualquier parte de una planta antes de la cosecha, y se introduce simultáneamente un gen objetivo en la planta completa.

Sin embargo, en el método del cañón de partículas y el método con *Agrobacterium*, puesto que el transgén es a menudo quimérico, es necesario utilizar para la transformación una célula de muestra que permita la introducción del ácido nucleico anteriormente mencionado en una célula de la línea germinal con elevada frecuencia. Por ejemplo, se pueden mencionar un embrión, un trozo de hipocótilo, un callo embriogénico y un punto de crecimiento aislado. Por otra parte, puesto que el método de transformación en que se utiliza un protoplasto y el método de microinyección

anteriormente mencionados permiten la selección de una planta de rediferenciación a partir de una sola célula, son medios de transformación superiores para obtener una planta transgénica homogénea que tenga un gen pAMT introducido en la célula completa.

5 Como ejemplos específicos, se muestran a continuación la introducción de un ácido nucleico objetivo mediante *Agrobacterium* y el método de regeneración de una célula transformada en una planta, en una planta de *Capsicum*, que son meros ejemplos y no limitan en modo alguno el método de producción de la planta genéticamente modificada empleada en la presente invención.

10 Se esteriliza una semilla de una planta de pimiento, se siembra en un medio para germinación de semillas adecuado (por ejemplo, medio MS, medio LS y medio B5) y se cultiva asépticamente. Por otra parte, se cultiva *Agrobacterium* que tiene un promotor conectado con un ácido nucleico objetivo, y transformado con un plásmido que tiene un gen de resistencia a kanamicina y un gen de resistencia a higromicina, y se diluye con un medio adecuado para obtener una disolución de *Agrobacterium*. Después de la germinación, se sumerge un cotiledón en la disolución de *Agrobacterium* durante aproximadamente 10 minutos, se trasplanta a un medio de selección (por ejemplo, medio MS, medio LS y medio B5) al que se han añadido una hormona vegetal deseada (por ejemplo, auxinas tales como IAA y NAA, y citocininas tales como cinetina y benciladenina) y los antibióticos kanamicina e higromicina, y se cultiva a 20-30 °C. El callo y el plantón resistentes a kanamicina e higromicina obtenidos son trasplantados a un medio de rediferenciación (arraigado) (por ejemplo, medio MS, medio LS y medio B5) al que se ha añadido benciladenina cuando es necesario para inducir la rediferenciación (arraigado), mediante lo cual se obtiene un plantón. Cuando se observan varias hojas verdaderas, el plantón es trasplantado al suelo para su aclimatación y es cultivado en un invernadero controlado tal como un Biotron. Se pueden obtener semillas y frutos del transformante así obtenido.

20 Se extrae un DNA genómico del transformante anteriormente mencionado de acuerdo con un método convencional, se escinde el DNA con una adecuada enzima de restricción y se lleva a cabo una hibridación Southern utilizando como una sonda el ácido nucleico objetivo introducido, mediante lo cual se puede confirmar la presencia o ausencia de transformación. Además, la presencia o ausencia de transformación puede ser también confirmada sintetizando un cebador que multiplique específicamente el ácido nucleico objetivo y llevando a cabo un método de PCR.

25 Además, se puede extraer RNA de un transformante o no transformante mediante un método convencional y se pueden examinar los cambios en el nivel de expresión del mRNA de la enzima diana mediante RT-PCR cuantitativa e hibridación Northern. Alternativamente, se puede extraer una proteína de un transformante o no transformante mediante un método convencional y se pueden examinar los cambios en el nivel de expresión de la proteína enzimática diana mediante un inmunoensayo (método RIA, método ELISA y método FIA) usando un anticuerpo hacia la enzima diana. Como se mencionó anteriormente, puesto que la mayor parte de los procesos de recombinación génica en las plantas son el resultado de una recombinación no homóloga, la expresión de la enzima diana no siempre disminuye en todas las plantas transgénicas en comparación con las poblaciones silvestres a causa del efecto de posición de la región cromosómica insertada con el ácido nucleico introducido. Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, midiendo y comparando las cantidades de expresión del transformante y el no transformante a nivel de RNA o nivel proteico de la enzima diana, se puede confirmar una expresión menor de la enzima diana en una planta transgénica que en una población silvestre, basándose en lo cual se puede obtener la planta genéticamente modificada objetivo.

30 Las plantas diferenciadas a partir de una semilla obtenida por autofertilización de las plantas transgénicas así obtenidas, que muestran una menor expresión de la enzima diana en comparación con las poblaciones silvestres y, como resultado, muestran una mayor capacidad de producción de capsinoide en comparación con las poblaciones silvestres, están estadísticamente contenidas en una cierta relación de acuerdo con la manera de inserción del ácido nucleico objetivo. La relación de aparición de la capacidad mejorada de producción de capsinoide en plantas diferenciadas a partir de la semilla R1 obtenida por autofertilización de una planta de generación rediferenciada (R0) sigue en general la Ley de Mendel. Por ejemplo, cuando el ácido nucleico objetivo es heterocigóticamente insertado en un locus génico, las semillas R1 se dividen en 3:1 con respecto a la capacidad mejorada de producción de capsinoide. Entre las plantas R1 diferenciadas a partir de la semilla R1, aquellas que tienen una capacidad mejorada de producción de capsinoide son cultivadas y autofertilizadas para obtener semillas R2. Cuando la capacidad mejorada de producción de capsinoide se mantiene en todas las semillas, la planta R1 es considerada un homocigoto para el ácido nucleico introducido, y, cuando la capacidad mejorada de producción de capsinoide se muestra en 3:1, la planta R1 es considerada un heterocigoto para el ácido nucleico introducido. La planta genéticamente modificada así seleccionada que es un homocigoto para el ácido nucleico introducido es muy útil como una población que tiene permanentemente una capacidad mejorada de producción de capsinoide. Puesto que el capsinoide se acumula en un fruto (la piel y la placenta del fruto), se puede conocer la capacidad de producción de capsinoide en una fase más temprana usando deseablemente, como un índice, la expresión o actividad de una enzima diana que también se expresa en un tejido tal como una hoja.

50 La modificación genética que inhibe la actividad de una enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina no está particularmente limitada con tal de que sea conocida. Por ejemplo, se pueden mencionar la introducción de un gen de anticuerpo hacia la enzima y la introducción de un gen mutante dominante-negativo.

Para evitar dificultades tales como la eficacia del ensamblaje de la cadena H y la cadena L dentro de la planta, el gen de anticuerpo codifica deseablemente un anticuerpo de cadena única preparado por ingeniería genética, tal como scFv, scFv-Fc, minicuerpo y diacuerpo. Dicho anticuerpo puede ser preparado al producir un hibridoma productor de anticuerpo procedente de un ratón inmunizado con una proteína enzimática diana o un fragmento de la misma mediante un método convencional, clonar el gen de anticuerpo de la célula mediante un método convencional y ligar el fragmento por medio de un DNA conector cuando sea apropiado.

Un mutante dominante-negativo se refiere a uno con actividad disminuida a causa de la introducción de una mutación en una enzima diana. En el mutante dominante-negativo, la función de la enzima puede ser indirectamente inhibida por la interacción competitiva de una enzima endógena diana de una población silvestre con el sustrato vainillina. El mutante dominante-negativo puede ser producido al introducir una mutación en el ácido nucleico que codifica el gen diana. Los ejemplos de la mutación incluyen una mutación de aminoácido que causa una disminución en la función proporcionada por un sitio funcional (por ejemplo, una supresión, sustitución o adición de uno o más aminoácidos). Se puede producir un mutante dominante-negativo por PCR o un método *per se* conocido usando un kit conocido.

Como un método para introducir un DNA que codifica un gen de anticuerpo y un mutante dominante-negativo en una planta diana para obtener una planta transgénica, se emplea preferiblemente un método similar a los métodos anteriormente mencionados para introducir un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria de la secuencia de nucleótidos del mRNA de una enzima diana, o una parte de la misma.

Por lo tanto, midiendo y comparando la actividad de la enzima diana entre el transformante y el no transformante, se puede confirmar una actividad menor de la enzima diana en la planta genéticamente modificada obtenida que en una población silvestre, basándose en lo cual se puede obtener la planta genéticamente modificada objetivo. Por ejemplo, cuando la enzima diana es pAMT, se extrae una proteína de la placenta y la flor, se añade vainillina al extracto y se incuba la mezcla durante un tiempo dado, y se cuantifica la vainillilamina resultante por HPLC, por medio de lo cual se puede examinar la actividad de la enzima.

La planta genéticamente modificada obtenida del modo anteriormente mencionado, que muestra una expresión o actividad disminuida de una enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina en comparación con una población silvestre, muestra una capacidad aumentada de producción de capsinoide en comparación con la población silvestre. La "capacidad aumentada de producción" puede ser una capacidad más aumentada de producción de capsinoide en comparación con una población silvestre que tiene capacidad para producir capsinoides por naturaleza, o una capacidad de producción recién adquirida por una planta incapaz de producir capsinoide por naturaleza.

La presente invención también proporciona un método de producción de capsinoides, que incluye recuperar capsinoides de la planta genéticamente modificada producida en la presente invención. Como método para recuperar capsinoides se puede utilizar cualquier método conocido, y, por ejemplo, se pueden utilizar sin limitación los métodos descritos en el anteriormente mencionado documento 1 de patente (JP-A-11-246478) y en los documentos JP-A-2002-226445, JP-A-2004-018428, WO 2005/122787 y/o 2006/043601.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de pimiento transformado con supresión de la expresión del gen pAMT

Se insertó el gen pAMT, multiplicado mediante RT-PCR con cDNA extraído de CH-19 Sweet, en una región GUS de un vector plasmídico Ti, pIG121-Hm, en la dirección antisentido (Figura 2). El plásmido fue introducido en la cepa EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens* y fue utilizado para la transformación de pimiento.

La superficie de una semilla de la variedad "Takanotsume" de *Capsicum annuum* fue esterilizada con etanol al 70% durante 1 minuto y con hipoclorito sódico al 2% durante 15 minutos, enjuagada 3 veces con agua estéril y sembrada en medio MS. El cotiledón germinado 10 días más tarde fue cortado y fue trasplantado a medio MS que contenía 10 mg/l de benciladenina (BA). Se llevó a cabo un cultivo a 25 °C durante 24 horas, con un periodo diario de luz de 16 horas, y se sumergió el cotiledón durante 10 minutos en una suspensión de *Agrobacterium* cultivado en medio YEP que contenía 50 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de higromicina durante 24 horas. Para eliminar la suspensión de *Agrobacterium* superflua, la hoja fue colocada sobre papel de filtro esterilizado y fue luego trasplantada de nuevo a medio MS que contenía 10 mg/l de benciladenina (BA). Después de un cultivo conjunto en una zona oscura durante 3 días, se trasplantó la hoja a medio MS (medio de selección) que contenía 10 mg/l de BA, 50 mg/l de kanamicina y 300 mg/l de carbenicilina y se llevó a cabo un cultivo a 25 °C con un periodo diario de luz de 16 horas. Para suprimir el crecimiento de *Agrobacterium*, el medio de selección fue cambiado por medio nuevo cada 10 días – 2 semanas. Un brote rediferenciado 1-2 meses después del inicio de la selección fue trasplantado a medio MS (medio de arraigo) que contenía 50 mg/l de kanamicina y 300 mg/l de carbenicilina para inducir el arraigo. Las plantas arraigadas de 16 poblaciones fueron trasplantadas a suelo y cultivadas en un Phytotron. Se extrajo DNA de hoja/hojas del individuo seleccionado y se llevó a cabo un análisis por PCR genómica usando un cebador que multiplica el gen NPTII en el vector. El producto de la PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y

fue teñido con bromuro de etidio. Como resultado, se halló que el individuo seleccionado tenía el gen NPTII introducido en él (Figura 3).

Ejemplo 2: Medición de los contenidos de capsiato y capsaicina del pimiento transformado

5 Se tomaron frutos de 16 poblaciones de pimiento transformado y de la variedad "Takanotsume" de *Capsicum annuum* sin introducción de un gen y se midieron los contenidos de capsiato y capsaicina mediante un método convencional. Como resultado, se halló que 3 frutos de pimiento transformado (TG-3, 8 y 14) contenían mayores cantidades de capsiato que el testigo de la variedad "Takanotsume" de *Capsicum annuum*. TG-3 y TG-8 tenían menores contenidos de capsaicina que otras poblaciones [Figuras 4(a) y 4(b)].

Ejemplo 3: Análisis de la transcripción y expresión del gen pAMT en fruto de pimiento transformado

10 Se extrajo RNA de un fruto de una población con mayor contenido de capsiato y se llevó a cabo un análisis de la cantidad de transcripción del gen pAMT endógeno mediante RT-PCR. Como resultado, se halló que la población con elevado contenido de capsiato mostraba una transcripción y una expresión suprimidas del gen pAMT. Por otra parte, en una población en que el contenido de capsiato no era elevado aun cuando se había introducido el gen, la transcripción y la expresión del gen pAMT endógeno no estaban suprimidas (Figura 5). A partir de los resultados
15 anteriores se ha hallado que, mediante la supresión de la expresión del gen pAMT, se puede modificar una planta para que sintetice artificialmente capsiato.

Ejemplo 4: Análisis de la cantidad de proteína pAMT en fruto de pimiento transformado

20 Se insertó el gen pAMT de longitud completa, aislado de CH-19 Hot, en un sitio para multiclonación de un vector de expresión de *Escherichia coli* (vector pColdI, Takara Bio Inc.). Se transformó la célula competente BL21 que expresa chaperonas (Chaperone Competent Cell BL21; Takara Bio Inc.) con el vector obtenido y se cultivó con sacudimiento en medio LB (500 ml) que contenía 20 mg/l de cloranfenicol, 50 mg/l de ampicilina, 10 µl/l de tetraciclina y 1 g/l de L-arabinosa durante 10 horas a 37 °C. Cuando el medio de cultivo mostró una densidad óptica de 0,6 a 600 nm, se añadió IPTG 1 mM y se cultivó la mezcla con sacudimiento a 15 °C durante 24 horas.

25 La bacteria *E. coli* cultivada fue recuperada por centrifugación y fue sometida a extracción proteica y a purificación mediante etiquetas de His usando el kit QIAexpress Ni-NTA Fast Start (QIAGEN). La proteína purificada fue confirmada mediante SDS-PAGE. La proteína fue inyectada a un conejo para que produjera un anticuerpo policlonal.

30 Empleando el anticuerpo policlonal producido, la proteína extraída del fruto, en la cantidad de 1 mg, fue sometida a electroforesis SDS-PAGE y fue analizada por transferencia Western. Como resultado, TG-3 y TG-8, que habían mostrado acumulación de capsiato, mostraron una cantidad de proteína pAMT notablemente disminuida. También en TG-14 la cantidad de proteína pAMT era menor que en CH-19 Hot (Figura 6).

A partir de lo precedente, se ha mostrado que la supresión de la expresión del gen pAMT de pimiento, que biosintetiza capsaicinoides, permite la producción de una planta que muestra una cantidad aumentada de biosíntesis de capsinoide.

Listado de secuencias

<110> Ajinomoto Co.. Inc.

<120> Plantas genéticamente modificadas que biosintetizan capsinoide

<130> 091394

5 <150> JP2008-163884
<151> 2008-6-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 1616

<212> DNA

<213> CH-19 hot

<220>

<221> CDS

15 <222> (77).. (1456)

<400> 1

```

tctttctctt tccttagcaa tttttccat attttgacta attattaagt cataattttc   60
aagaaatctt gaagga atg gcc aat att act aat gaa ttt atg gga cat gat   112
          Met Ala Asn Ile Thr Asn Glu Phe Met Gly His Asp
          1                    5                    10

atg ttg gca ccc ttt act gcg gga tgg cag agt gat atg gaa cot tta   160
Met Leu Ala Pro Phe Thr Ala Gly Trp Gln Ser Asp Met Glu Pro Leu
          15                    20                    25

gtt ata gaa aag tog gag gcc tct tat gtc tat gac ata aat ggg aag   208
Val Ile Glu Lys Ser Glu Gly Ser Tyr Val Tyr Asp Ile Asn Gly Lys
          30                    35                    40

aag tat ctt gac act tta tct ggt tta tgg tgc aca aca tta ggg gga   256
Lys Tyr Leu Asp Thr Leu Ser Gly Leu Trp Cys Thr Thr Leu Gly Gly
          45                    50                    55                    60

agt gag act cga ctt gtt gaa gct gca aat aaa caa ctc aat aca ttg   304
Ser Glu Thr Arg Leu Val Glu Ala Ala Asn Lys Gln Leu Asn Thr Leu
          65                    70                    75

cca ttt tat cat tca ttt tgg aat cga acc aca aaa cct tct ttg gat   352
Pro Phe Tyr His Ser Phe Trp Asn Arg Thr Thr Lys Pro Ser Leu Asp
          80                    85                    90

ctt gca aag gag ctc cta aat atg ttt act gca aat aaa atg gcc aaa   400
Leu Ala Lys Glu Leu Leu Asn Met Phe Thr Ala Asn Lys Met Ala Lys
          95                    100                    105

gtt ttt ttc act aat agc gga tca gaa gcc aat gac act cag gtg aag   448
Val Phe Phe Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn Asp Thr Gln Val Lys
          110                    115                    120

ctg gtg tgg tat tac aat aat gcc ott ggg agg cca cag aaa aag aaa   496
Leu Val Trp Tyr Tyr Asn Asn Ala Leu Gly Arg Pro Gln Lys Lys Lys
          125                    130                    135                    140

att att gct cga gca aaa gca tat cat ggt tcc act tac att tct gct   544
Ile Ile Ala Arg Ala Lys Ala Tyr His Gly Ser Thr Tyr Ile Ser Ala
          145                    150                    155

ggt ctc tct ggg ctt cct cca atg cat caa aaa ttt gat ttg cca cct   592
Gly Leu Ser Gly Leu Pro Pro Met His Gln Lys Phe Asp Leu Pro Pro
          160                    165                    170

cca ttt gtt ctg cac act gag tgc cct cat tat tgg gcc tat cac ttg   640
Pro Phe Val Leu His Thr Glu Cys Pro His Tyr Trp Ala Tyr His Leu
          175                    180                    185
    
```

ES 2 529 466 T3

cca ggt gaa acc gaa gag gaa ttc tot act agg ttg gca aat aat ttg 688
 Pro Gly Glu Thr Glu Glu Glu Phe Ser Thr Arg Leu Ala Asn Asn Leu
 190 195 200

gaa agt ctt ata ctc aac gag ggg cct gaa aca gta gct gct ttc att 736
 Glu Ser Leu Ile Leu Asn Glu Gly Pro Glu Thr Val Ala Ala Phe Ile
 205 210 215 220

gcc gaa cca gtc cta gga gca gca ggt gta ata ctt cct ccc gca aca 784
 Ala Glu Pro Val Leu Gly Ala Ala Gly Val Ile Leu Pro Pro Ala Thr
 225 230 235

tat ttt gat aag gtt caa gct att tta agg aaa cat gac att ctt ttt 832
 Tyr Phe Asp Lys Val Gln Ala Ile Leu Arg Lys His Asp Ile Leu Phe
 240 245 250

atc gcg gat gag gtg gta tgt gga ttt gga aga ctt ggg aca atg ttt 880
 Ile Ala Asp Glu Val Val Cys Gly Phe Gly Arg Leu Gly Thr Met Phe
 255 260 265

ggc agt gat aaa tac aac att aaa cct gat ctt gtc tct gta gca aag 928
 Gly Ser Asp Lys Tyr Asn Ile Lys Pro Asp Leu Val Ser Val Ala Lys
 270 275 280

gca ctt tct tot gga tat atg cca att gcc gct gtc ctt gta agc cag 976
 Ala Leu Ser Ser Gly Tyr Met Pro Ile Ala Ala Val Leu Val Ser Gln
 285 290 295 300

aaa att tct agt gtc atc ctt tct gaa agc aat aaa att ggt gcc ttt 1024
 Lys Ile Ser Ser Val Ile Leu Ser Glu Ser Asn Lys Ile Gly Ala Phe
 305 310 315

tgc cat gga ttt act tat tcc gga cac cct gtt gcg tgc gca gtt gca 1072
 Cys His Gly Phe Thr Tyr Ser Gly His Pro Val Ala Cys Ala Val Ala
 320 325 330

ttg gaa goa ttg aag ato tat aag gaa aga aat att act gag gtg gtg 1120
 Leu Glu Ala Leu Lys Ile Tyr Lys Glu Arg Asn Ile Thr Glu Val Val
 335 340 345

aac aaa ata tca caa aag ttt caa gaa ggt ttg aaa gca ttc gcc gac 1168
 Asn Lys Ile Ser Gln Lys Phe Gln Glu Gly Leu Lys Ala Phe Ala Asp
 350 355 360

agt ccc ata att ggg gag ata agg gga act ggt ttg gca ctt tct aca 1216
 Ser Pro Ile Ile Gly Glu Ile Arg Gly Thr Gly Leu Ala Leu Ser Thr
 365 370 375 380

gag ttt gtg aac aat aaa tot cct aat gat ccc ttt cca tat gaa tgg 1264
 Glu Phe Val Asn Asn Lys Ser Pro Asn Asp Pro Phe Pro Tyr Glu Trp
 385 390 395

gct gtc ggt aca tat ttt gga gca caa tgt gct aag tac ggg atg ttg 1312
 Ala Val Gly Thr Tyr Phe Gly Ala Gln Cys Ala Lys Tyr Gly Met Leu
 400 405 410

gta agt tcc act ggt gat cat gta aat atg gct cca cca ttt acc ttg 1360
 Val Ser Ser Thr Gly Asp His Val Asn Met Ala Pro Pro Phe Thr Leu
 415 420 425

agt ctt gaa gaa ctt gat gag ttg ata cgc ata tat ggg aaa gca ttg 1408
 Ser Leu Glu Glu Leu Asp Glu Leu Ile Arg Ile Tyr Gly Lys Ala Leu
 430 435 440

aag gat act gaa aag aga gtt gaa gaa ctc aag tot cag aag aag taa 1456
 Lys Asp Thr Glu Lys Arg Val Glu Glu Leu Lys Ser Gln Lys Lys
 445 450 455

aagctcaccg cgaagccttg tttatcctaa aaaagaagag agaaaaatg atcagatttc 1516

ctctttgtgc tatttacta gtaataaata atgttctcct tgcaactttg cactagagat 1576

tttctattga aagagctttt gttatccaca attatttaca 1616

<210> 2
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> CH-19 hot

5

ES 2 529 466 T3

<400> 2

Met Ala Asn Ile Thr Asn Glu Phe Met Gly His Asp Met Leu Ala Pro
 1 5 10 15

Phe Thr Ala Gly Trp Gln Ser Asp Met Glu Pro Leu Val Ile Glu Lys
 20 25 30

Ser Glu Gly Ser Tyr Val Tyr Asp Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Leu Asp
 35 40 45

Thr Leu Ser Gly Leu Trp Cys Thr Thr Leu Gly Gly Ser Glu Thr Arg
 50 55 60

Leu Val Glu Ala Ala Asn Lys Gln Leu Asn Thr Leu Pro Phe Tyr His
 65 70 75 80

Ser Phe Trp Asn Arg Thr Thr Lys Pro Ser Leu Asp Leu Ala Lys Glu
 85 90 95

Leu Leu Asn Met Phe Thr Ala Asn Lys Met Ala Lys Val Phe Phe Thr
 100 105 110

Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn Asp Thr Gln Val Lys Leu Val Trp Tyr
 115 120 125

Tyr Asn Asn Ala Leu Gly Arg Pro Gln Lys Lys Lys Ile Ile Ala Arg
 130 135 140

Ala Lys Ala Tyr His Gly Ser Thr Tyr Ile Ser Ala Gly Leu Ser Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Pro Met His Gln Lys Phe Asp Leu Pro Pro Pro Phe Val Leu
 165 170 175

His Thr Glu Cys Pro His Tyr Trp Ala Tyr His Leu Pro Gly Glu Thr
 180 185 190

Glu Glu Glu Phe Ser Thr Arg Leu Ala Asn Asn Leu Glu Ser Leu Ile
 195 200 205

Leu Asn Glu Gly Pro Glu Thr Val Ala Ala Phe Ile Ala Glu Pro Val
 210 215 220

Leu Gly Ala Ala Gly Val Ile Leu Pro Pro Ala Thr Tyr Phe Asp Lys
 225 230 235 240

Val Gln Ala Ile Leu Arg Lys His Asp Ile Leu Phe Ile Ala Asp Glu
 245 250 255

Val Val Cys Gly Phe Gly Arg Leu Gly Thr Met Phe Gly Ser Asp Lys
 260 265 270

ES 2 529 466 T3

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

Aplicabilidad industrial

5 De acuerdo con la presente invención, se pueden producir capsinoides en gran cantidad a partir de una planta convencionalmente incapaz de producir capsinoides o capaz de producir capsinoides en pequeña cantidad. La presente invención es útil ya que puede proporcionar capsinoides, de los que se espera que sean aplicables a diversos campos tales como medicinas y alimentos saludables, en grandes cantidades y a bajo costo.

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente nº 2008-163884, presentada en Japón (fecha de presentación: 23 de junio de 2008).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una planta genéticamente modificada que tiene una capacidad de producción de capsinoides aumentada, que comprende llevar a cabo una modificación genética para disminuir la expresión o actividad de una enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina en una planta que tiene un sistema para la biosíntesis de capsaicinoide, en donde la planta pertenece al género *Capsicum* y en donde la enzima es un producto del gen pAMT.
2. El método según la Reivindicación 1, que comprende además seleccionar una planta que muestra una cantidad aumentada de producción de capsinoides en comparación con una planta no genéticamente modificada.
- 10 3. El método según la Reivindicación 1 o 2, en donde la modificación genética es seleccionada del grupo que consiste en una introducción de un DNA que codifica un RNA antisentido, un iRNA, una ribozima o un mutante dominante-negativo para el susodicho gen enzimático, una destrucción del gen mediante un método de inactivación génica o un tratamiento con mutágenos, y una introducción de un gen que codifica un anticuerpo contra la enzima.
- 15 4. Un método para producir capsinoide, que comprende recuperar el capsinoide de un fruto de una planta genéticamente modificada y distinta de CH-19 Sweet, que muestra una expresión o actividad disminuida de una enzima que cataliza una reacción de conversión de grupos amino de vainillina a vainillilamina y una capacidad de producción de capsinoides aumentada, en comparación con poblaciones silvestres, en donde la planta pertenece al género *Capsicum* y la enzima es un producto del gen pAMT.
- 20 5. El método según la Reivindicación 4, en donde la susodicha expresión o actividad disminuida de la enzima es causada por una destrucción o mutación del gen enzimático, una descomposición o una traducción suprimida de un producto de transcripción del gen, o una inhibición de la acción de la enzima sobre la vainillina.

FIG. 1

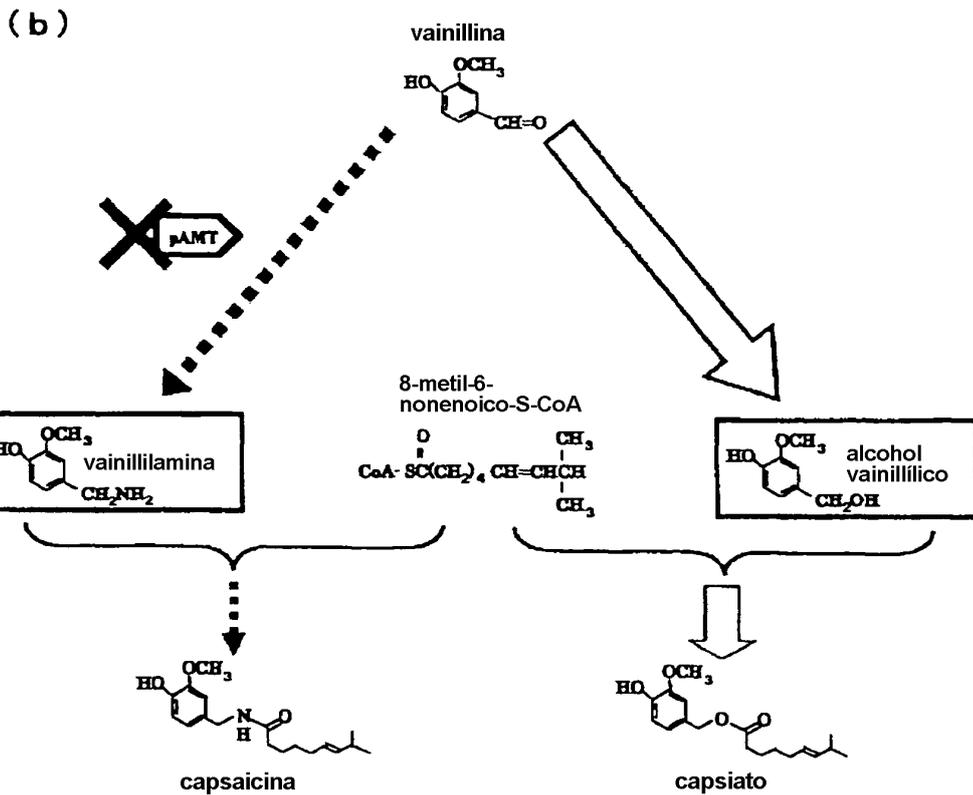
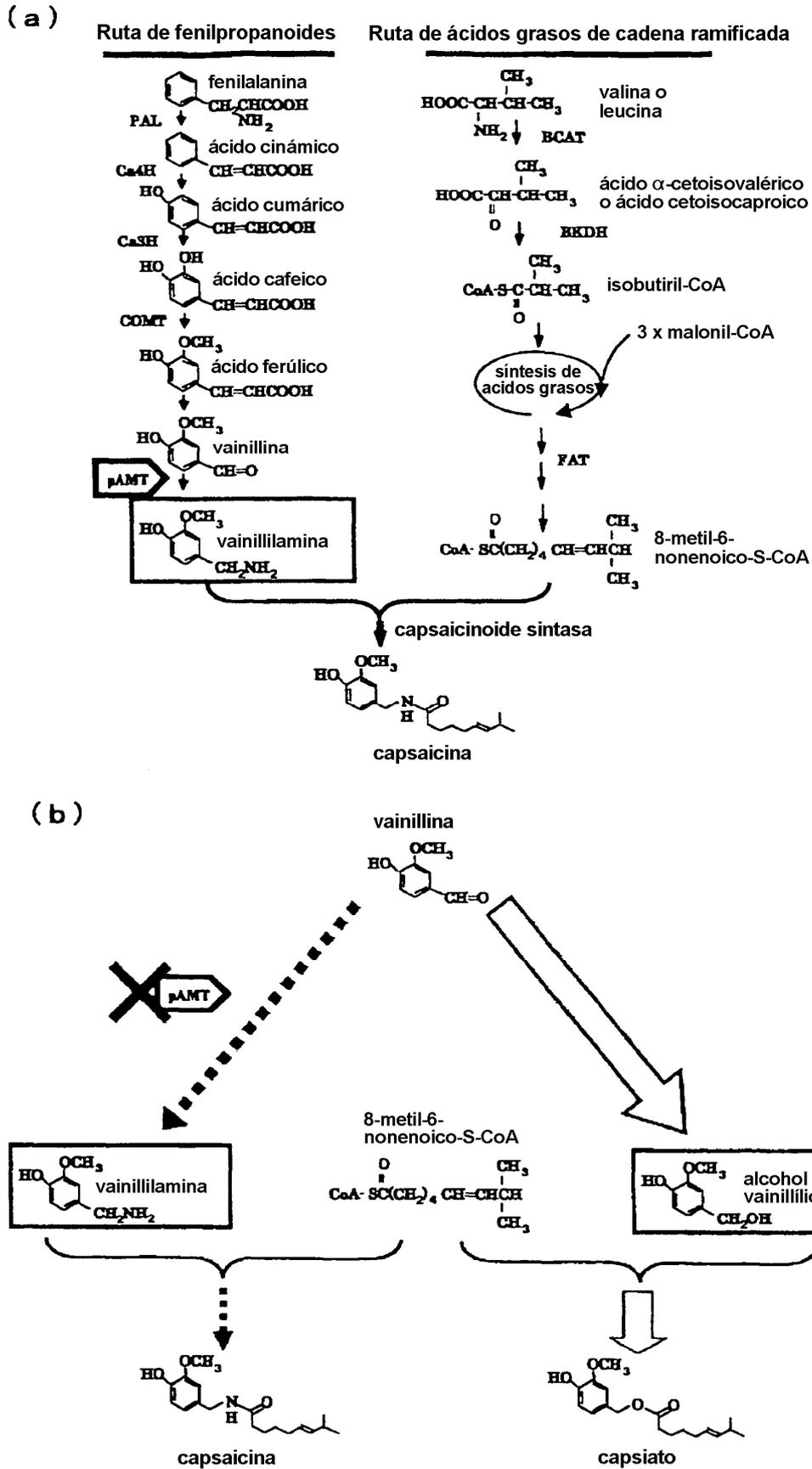


FIG. 2

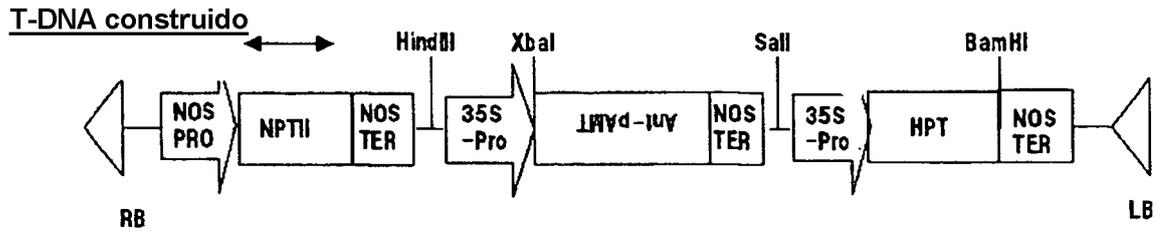


FIG. 3

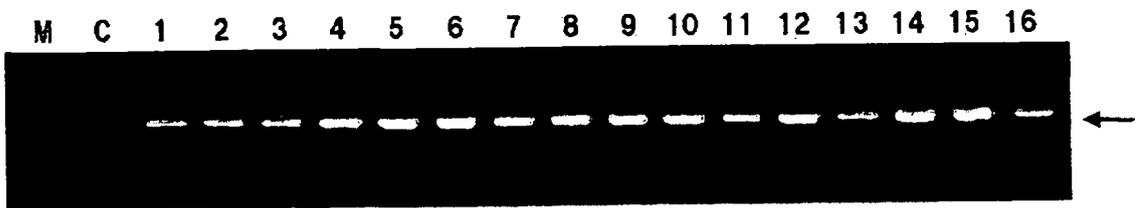


FIG. 4

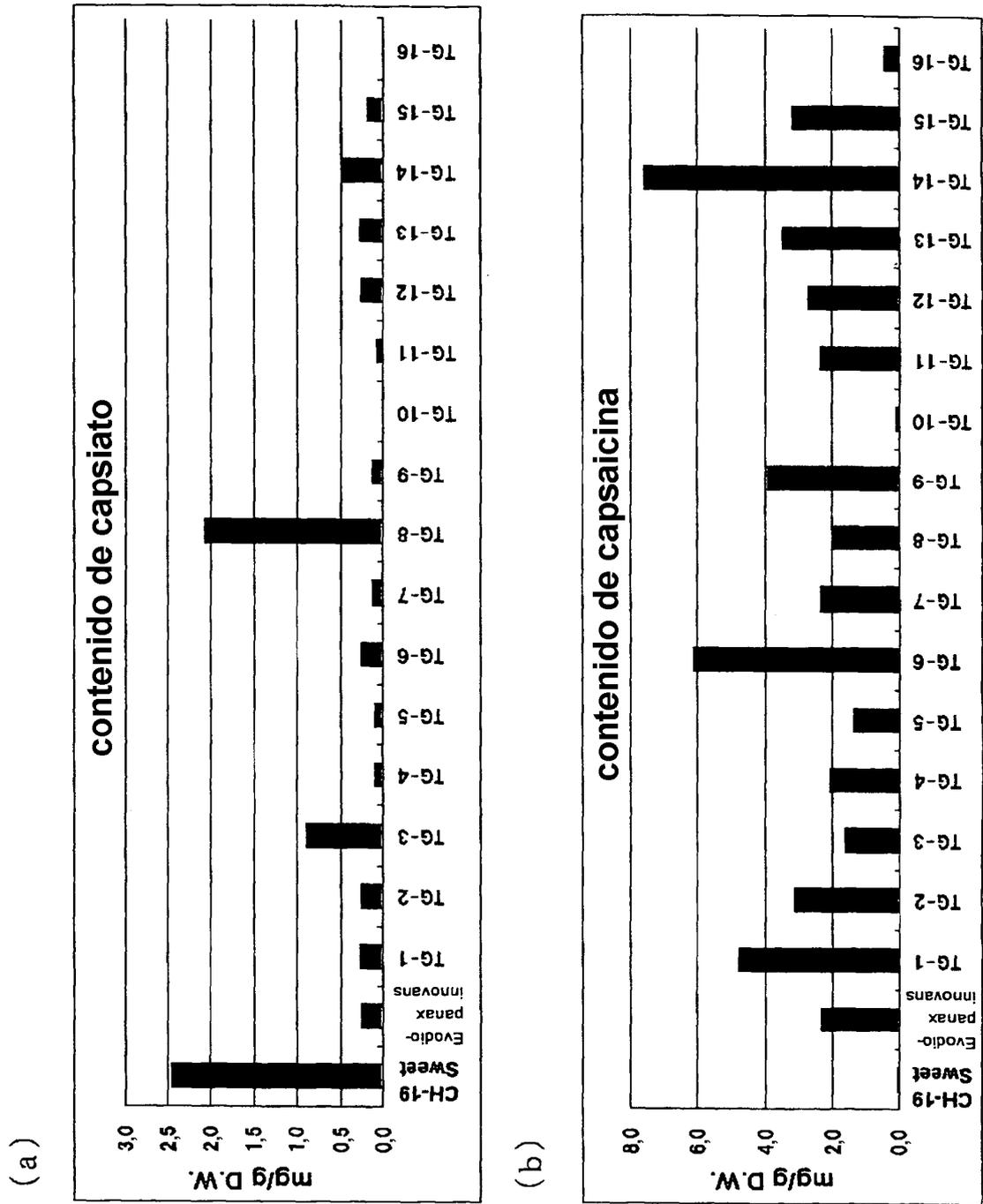


FIG. 5

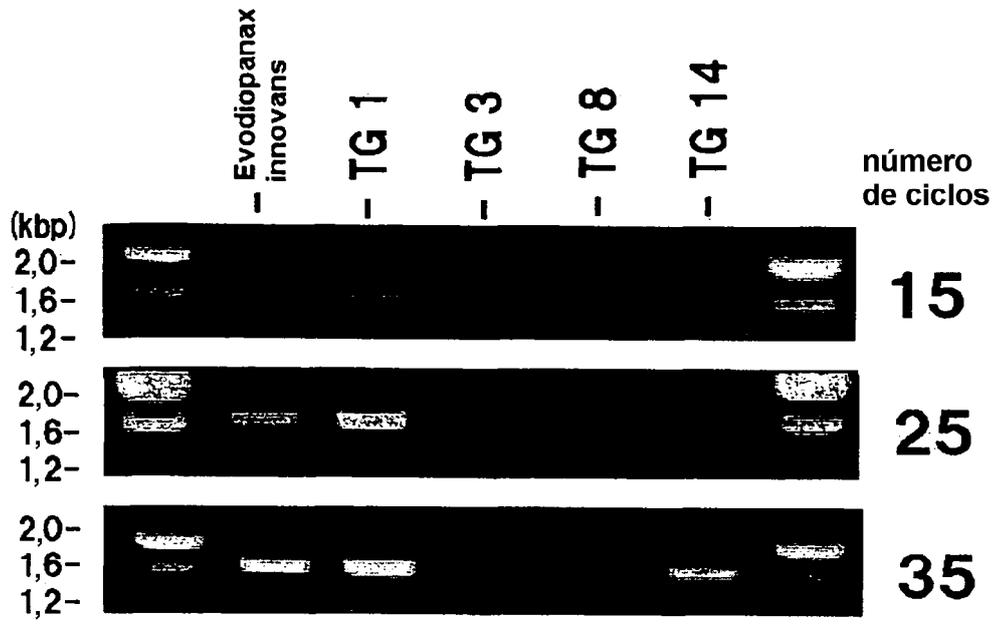


FIG. 6

