

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-531575

(P2016-531575A)

(43) 公表日 平成28年10月13日 (2016. 10. 13)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	2 B O 3 O
A O 1 H	5/00	(2006.01)	A O 1 H	5/00	A	
A O 1 H	1/00	(2006.01)	A O 1 H	1/00	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁)

(21) 出願番号	特願2016-537874 (P2016-537874)	(71) 出願人	501035309
(86) (22) 出願日	平成26年8月29日 (2014. 8. 29)		ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成28年4月20日 (2016. 4. 20)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/053327		68, インディアナポリス, ジオンス
(87) 国際公開番号	W02015/031705		ヴィレ ロード, 9330
(87) 国際公開日	平成27年3月5日 (2015. 3. 5)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	61/872, 134		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成25年8月30日 (2013. 8. 30)	(74) 代理人	100095360
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100126354
			弁理士 藤田 尚

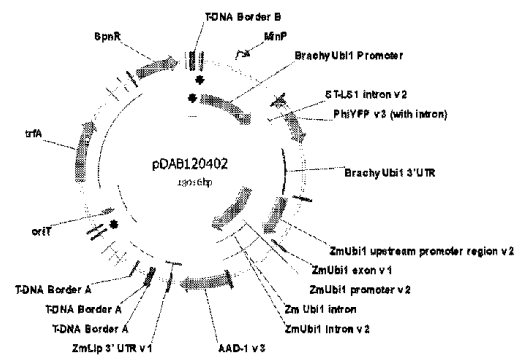
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キビ属 (*Panicum*) ユビキチン遺伝子の調節エレメントを用いて導入遺伝子を発現させるための構築物

(57) 【要約】

パニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) ユビキチン遺伝子から単離されたプロモーターおよび/または 3' - UTRを含む調節エレメントを用いて、植物細胞および/または植物組織中で導入遺伝子を発現させるための構築物および方法が提供される。

Fig. 34



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- i) ポリリンカー配列；
- ii) 非ユビキチン導入遺伝子または
- iii) i) と ii) の組み合わせ

と作動可能に連結しているプロモーターを含む核酸ベクターであって、前記プロモーターは配列番号 35 または配列番号 35 と 90 % の配列同一性を有する配列を含む、核酸ベクター。

【請求項 2】

前記プロモーターが長さ 3 kb 未満である、請求項 1 に記載の核酸ベクター。

10

【請求項 3】

前記プロモーターが配列番号 35 または配列番号 35 と 90 % の配列同一性を有する配列からなる、請求項 1 に記載の核酸ベクター。

【請求項 4】

選択マーカをコードする配列をさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の核酸ベクター。

【請求項 5】

前記プロモーターが導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 4 に記載の核酸ベクター。

【請求項 6】

前記導入遺伝子が殺虫剤耐性、除草剤耐性、窒素利用効率、水利用効率または栄養価を付与する選択マーカまたは遺伝子産物をコードする、請求項 5 に記載の核酸ベクター。

20

【請求項 7】

配列番号 36 または配列番号 36 と 90 % の配列同一性を有する配列を含む 3' 非翻訳配列をさらに含み、前記 3' 非翻訳配列が前記ポリリンカーまたは前記導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 1 から 3 または 5 のいずれかに記載の核酸ベクター。

【請求項 8】

配列番号 38 または配列番号 38 と 90 % の配列同一性を有する配列を含む 5' 非翻訳配列をさらに含み、前記 5' 非翻訳配列が前記プロモーター配列と前記ポリリンカーまたは導入遺伝子との間に挿入されており、これらと作動可能に連結している、請求項 1 から 3 または 5 のいずれかに記載の核酸ベクター。

30

【請求項 9】

前記 5' 非翻訳配列の後に挿入されたイントロン配列をさらに含む、請求項 8 に記載の核酸ベクター。

【請求項 10】

前記イントロン配列が配列番号 37 を含む、請求項 9 に記載の核酸ベクター。

【請求項 11】

前記プロモーターが配列番号 40 または配列番号 40 と 90 % の配列同一性を有する配列からなり、前記プロモーターが導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 1 に記載の核酸ベクター。

40

【請求項 12】

前記プロモーターが配列番号 39 または配列番号 39 と 90 % の配列同一性を有する配列からなり、前記プロモーターが導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 1 に記載の核酸ベクター。

【請求項 13】

配列番号 36 または配列番号 36 と 90 % の配列同一性を有する配列を含む 3' 非翻訳配列をさらに含み、前記 3' 非翻訳配列が前記導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 11 または 12 に記載の核酸ベクター。

【請求項 14】

導入遺伝子と作動可能に連結している配列番号 35 または配列番号 35 と 90 % の配列

50

同一性を有する配列を含む非パニカム属 (Panicum) 植物。

【請求項 15】

トウモロコシ、コムギ、イネ、ソルガム、エンバク、ライムギ、バナナ、サトウキビ、ダイズ、ワタ、ヒマワリおよびセイヨウアブラナからなる群から選択される、請求項 14 に記載の植物。

【請求項 16】

トウモロコシ (Zea mays) である、請求項 14 に記載の植物。

【請求項 17】

前記導入遺伝子が前記植物のゲノムに挿入されている、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の植物。

10

【請求項 18】

配列番号 38 または配列番号 38 と 90 % の配列同一性を有する配列を含む 5' 非翻訳配列をさらに含み、前記 5' 非翻訳配列が前記プロモーターと前記導入遺伝子との間に挿入されており、これらと作動可能に連結している、請求項 14 に記載の植物。

【請求項 19】

前記 5' 非翻訳配列の後に挿入されたイントロン配列をさらに含む、請求項 18 に記載の植物。

【請求項 20】

前記イントロン配列が配列番号 37 を含む、請求項 19 に記載の植物。

【請求項 21】

配列番号 36 または配列番号 36 と 90 % の配列同一性を有する配列を含む 3' 非翻訳配列をさらに含み、前記 3' 非翻訳配列が前記導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 18 に記載の植物。

20

【請求項 22】

前記プロモーターが配列番号 40 または配列番号 40 と 90 % の配列同一性を有する配列からなり、前記プロモーターが導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 14 に記載の植物。

【請求項 23】

前記プロモーターが配列番号 39 または配列番号 39 と 90 % の配列同一性を有する配列からなり、前記プロモーターが導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 14 に記載の植物。

30

【請求項 24】

配列番号 36 または配列番号 36 と 90 % の配列同一性を有する配列を含む 3' 非翻訳配列をさらに含み、前記 3' 非翻訳配列が前記導入遺伝子と作動可能に連結している、請求項 22 または 23 に記載の植物。

【請求項 25】

i) ポリリンカー配列；

ii) 非ユビキチン導入遺伝子または

iii) i) と ii) の組み合わせ

と作動可能に連結している転写ターミネーターを含む核酸ベクターであって、前記転写ターミネーターは配列番号 36 または配列番号 36 と 90 % の配列同一性を有する配列を含む、核酸ベクター。

40

【請求項 26】

前記転写ターミネーターが長さ 1 kb 未満である、請求項 25 に記載の核酸ベクター。

【請求項 27】

前記転写ターミネーターが配列番号 36 の 3' UTR 配列からなる、請求項 26 に記載の核酸ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条 (e) の下でその全体が参照により本明細書に組み込まれる、2 0 1 3 年 8 月 3 0 日出願の米国仮出願第 6 1 / 8 7 2 1 3 4 号に基づく優先権を主張するものである。

【 0 0 0 2 】

電子的に提出される材料の参照による組み込み

これと同時に提出され、以下のように特定されるコンピュータ可読ヌクレオチド / アミノ酸配列表は、その全体が参照により組み込まれる：2 0 1 4 年 8 月 1 5 日に作成された 1 つの 6 4 K B A C I I (テキスト) 「 P a n i c u m _ _ U B I _ _ S E Q _ _ L I S T _ _ S T 2 5 」という名前付きファイル。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

植物の形質転換は、農学的に望ましい形質または特性を異なる作物植物種に導入するのに使用するための魅力的な技術である。特定の望ましい形質を有するよう植物種が開発および / または改変されている。一般的に、望ましい形質には、例えば、栄養価の改善、収量増加、耐有害生物性または耐病性の付与、耐乾索性およびストレス耐性の増加、園芸品質 (例えば、着色および成長) の改善、除草剤耐性の付与、植物からの産業的に有用な化合物および / または材料の製造の可能化、ならびに / あるいは医薬品の製造の可能化が含まれる。

20

【 0 0 0 4 】

単一ゲノム遺伝子座に積み重なった複数の導入遺伝子を含むトランスジェニック植物は、植物の形質転換技術を介して作製される。植物の形質転換技術によって、導入遺伝子の植物細胞への導入、植物ゲノム中に安定に組み込まれた導入遺伝子のコピーを含む稔性トランスジェニック植物の回収がもたらされ、導入遺伝子 (複数可) の転写および翻訳を介したその後の導入遺伝子発現によって、望ましい形質および表現型を有するトランスジェニック植物が得られる。スタック中の各導入遺伝子は、典型的には遺伝子発現のために独立したプロモーターを要するので、複数のプロモーターが導入遺伝子スタックに使用される。

【 0 0 0 5 】

同じ形質を調節するために複数の導入遺伝子の同時発現が必要となることにより、しばしば複数の導入遺伝子の発現を駆動するために同じプロモーターを繰り返し使用することになる。しかしながら、高レベルの配列同一性を共有する配列を含むプロモーターを繰り返し使用することは、相同性ベースの遺伝子サイレンシング (homology-based gene silencing) (H B G S) をもたらし得る。反復 D N A 配列を導入遺伝子に使用すると、H B G S がトランスジェニック植物で頻繁に起こることが確認された (Peremarti et al., 2010) 。さらに、導入遺伝子構築物に類似 D N A 配列を繰り返し使用することは、プラスミドの組換えおよび不安定性のために、アグロバクテリウム (Agrobacterium) では困難と分かった。

30

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

40

【 0 0 0 6 】

トウモロコシユビキチン 1 プロモーターと低レベルの配列同一性または相同性を共有するユビキチン調節エレメント (例えば、プロモーターおよび 3 ' - U T R) が本明細書で記載される。さらに、ユビキチン調節エレメントを利用する構築物および方法が記載される。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

植物細胞および / または植物組織中で導入遺伝子を発現させるための構築物および方法が本明細書で開示される。一実施形態では、ユビキチン遺伝子の調節エレメントを、パニクム・ヴィルガツム (Panicum virgatum) 、ミナトカモジグサ (Brachypodium distachyo

50

n) またはアワ (*Setaria italica*) ゲノムから精製し、前記調節エレメントと自然では連結していない配列と組み換えて、ユビキチン調節配列に生まれつき備わっていない導入遺伝子を植物細胞中で発現させるための発現ベクターを創製する。一実施形態では、ユビキチン遺伝子の調節エレメントがポリリンカー配列と作動可能に連結している発現ベクターが提供される。このような発現ベクターは、ユビキチン遺伝子調節配列と作動可能に連結した状態で遺伝子または遺伝子カセットをベクターに挿入することを容易にする。

【 0 0 0 8 】

実施形態では、パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターを含む構築物が提供される。実施形態では、導入遺伝子と作動可能に連結しているパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターを含む遺伝子発現カセットが提供される。実施形態では、遺伝子発現カセットが、導入遺伝子と作動可能に連結しているパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 5' - UTR を含む。実施形態では、遺伝子発現カセットが、プロモーターと作動可能に連結しているパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 5' - UTR を含む。実施形態では、遺伝子発現カセットが、導入遺伝子と作動可能に連結しているパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンイントロンを含む。実施形態では、遺伝子発現カセットが、プロモーターと作動可能に連結しているパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンイントロンを含む。実施形態では、構築物が、パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 3' - UTR を含む遺伝子発現カセットを含む。実施形態では、遺伝子発現カセットが、導入遺伝子と作動可能に連結しているパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 3' - UTR を含む。実施形態では、遺伝子発現カセットが、少なくとも 1、2、3、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上の導入遺伝子を含む。

【 0 0 0 9 】

実施形態では、遺伝子発現カセットが、独立に、a) パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーター、b) パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンイントロン、c) パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 5' - UTR、および d) パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 3' - UTR を含む。

【 0 0 1 0 】

一実施形態によると、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結しているプロモーターを含む核酸ベクターであって、プロモーターが配列番号 39、または配列番号 39 と 90 % の配列同一性を有する配列からなる、核酸ベクターが提供される。さらなる実施形態では、核酸ベクターが遺伝子カセットを含み、遺伝子カセットがプロモーター、非ユビキチン導入遺伝子および 3' 非翻訳領域を含み、プロモーターが導入遺伝子の第 1 の末端と作動可能に連結している配列番号 39 からなり、導入遺伝子の第 2 の末端が配列番号 36 からなる 3' 非翻訳配列と作動可能に連結している。

【 0 0 1 1 】

パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) プロモーター、5' - UTR、イントロンおよ

び 3' - UTR を用いて導入遺伝子を発現する植物を育てる方法が本明細書で開示される。パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) プロモーター、5' - UTR、イントロンおよび 3' - UTR を用いて導入遺伝子を発現する植物組織および細胞を培養する方法も本明細書で開示される。

【0012】

一実施形態によると、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結しているプロモーターを含む植物、植物組織または植物細胞であって、プロモーターが配列番号 35 を含む、植物、植物組織または植物細胞が提供される。一実施形態によると、導入遺伝子と作動可能に連結している配列番号 35 または配列番号 35 と 90% の配列同一性を有する配列を含む非キビ属 (*Panicum*) 植物または植物細胞が提供される。一実施形態では、植物がトウモロコシ変種である。一実施形態では、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結しているプロモーターを含む植物、植物組織または植物細胞であって、プロモーターが配列番号 39 または 40 からなる、植物、植物組織または植物細胞が提供される。一実施形態では、遺伝子カセットを含む非キビ属 (*Panicum*) 植物または植物細胞であって、遺伝子カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているプロモーターを含み、さらにプロモーターが配列番号 39 からなる、非キビ属 (*Panicum*) 植物または植物細胞が提供される。さらなる実施形態では、プロモーターが導入遺伝子の第 1 の末端と作動可能に連結しており、導入遺伝子の第 2 の末端が配列番号 36 からなる 3' 非翻訳配列と作動可能に連結している。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】プロモーター同定に使用されるミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およびアワ (*Setaria italica*) ユビキチン配列に対するトウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン (*Zm Ub1*) タンパク質配列のタンパク質アラインメントを示す図である。*Zm Ub1* タンパク質配列は、配列番号 22 として本明細書で開示される。アワ (*S. italica*) *Ub2* タンパク質配列は、配列番号 23 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*B. distachyon*) *Ub1* プロモーター配列は、配列番号 24 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*B. distachyon*) *Ub1 C* タンパク質配列は、配列番号 25 として本明細書で開示される。コンセンサス配列は、配列番号 26 として本明細書で開示される。

30

【図 2 - 1】本明細書で同定されるミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およびアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターポリヌクレオチドに対するトウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン (*Zm Ub1*) プロモーターポリヌクレオチド配列のアラインメントを示す図である。トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 (*Zm - Ub1*) プロモーター配列は、配列番号 27 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*B. distachyon*) *Ub1* プロモーター配列は、配列番号 16 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*B. distachyon*) *Ub1 - C* プロモーター配列は、配列番号 15 として本明細書で開示される。アワ (*S. italica*) *Ub2* プロモーター配列は、配列番号 17 として本明細書で開示される。

40

【図 2 - 2】本明細書で同定されるミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およびアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターポリヌクレオチドに対するトウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン (*Zm Ub1*) プロモーターポリヌクレオチド配列のアラインメントを示す図である。トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 (*Zm - Ub1*) プロモーター配列は、配列番号 27 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*B. distachyon*) *Ub1* プロモーター配列は、配列番号 16 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*B. distachyon*) *Ub1 - C* プロモーター配列は、配列番号 15 として本明細書で開示される。アワ (*S. italica*) *Ub2* プロモーター配列は、配列番号 17 として本明細書で開示される。

【図 2 - 3】本明細書で同定されるミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およ

50

びアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターポリヌクレオチドに対するトウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン (*Z M U b i 1*) プロモーターポリヌクレオチド配列のラインメントを示す図である。トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 (*Z m - U b i 1*) プロモーター配列は、配列番号 27 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) *U b i 1* プロモーター配列は、配列番号 16 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) *U b i 1 - C* プロモーター配列は、配列番号 15 として本明細書で開示される。アワ (*S. italica*) *U b i 2* プロモーター配列は、配列番号 17 として本明細書で開示される。

【図 2 - 4】本明細書で同定されるミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およびアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターポリヌクレオチドに対するトウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン (*Z M U b i 1*) プロモーターポリヌクレオチド配列のラインメントを示す図である。トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 (*Z m - U b i 1*) プロモーター配列は、配列番号 27 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) *U b i 1* プロモーター配列は、配列番号 16 として本明細書で開示される。ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) *U b i 1 - C* プロモーター配列は、配列番号 15 として本明細書で開示される。アワ (*S. italica*) *U b i 2* プロモーター配列は、配列番号 17 として本明細書で開示される。

【図 3】合成したアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 プロモーター遺伝エレメントを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 4】合成したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 C プロモーター遺伝エレメントおよび隣接するシームレスクローニングオーバーハング (*seamless cloning overhang*) の場所を示すプラスミドマップを示す図である。

【図 5】合成したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 プロモーター遺伝エレメントおよび隣接するシームレスクローニングオーバーハングの場所を示すプラスミドマップを示す図である。

【図 6】*Phi YFP* レポーター遺伝子と融合したアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 (*S I - U b i 2*) プロモーターを含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 7】*Phi YFP* レポーター遺伝子と融合したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 C プロモーターを含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 8】*Phi YFP* レポーター遺伝子と融合したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 プロモーターを含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 9】*Phi YFP* レポーター遺伝子と融合した *OS Act 1* (イネアクチン 1) プロモーターを含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 10】*Phi YFP* レポーター遺伝子と融合した *Z M U b i 1* プロモーターを含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 11】*Gateway* テクノロジーを用いてバイナリー発現ベクターを構築するために使用されるバイナリーデスティネーションベクター (*binary destination vector*) を示すプラスミドマップを示す図である。

【図 12】*ST - LS 1* イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカー遺伝子コード領域と融合したアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 (*S I - U b i 2*) プロモーター、引き続いてジャガイモの *St Pin II 3' UTR* を含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 13】*ST - LS 1* イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカー遺伝子コード領域と融合したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 C プロモーター、引き続いてジャガイモの *St Pin II 3' UTR* を含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 14】*ST - LS 1* イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカ

10

20

30

40

50

ー遺伝子コード領域と融合したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン1プロモーター、引き続いてジャガイモの *StPinII* 3' UTRを含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図15】ST-LS1イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカー遺伝子コード領域と融合した *OS Act1* プロモーター、引き続いてジャガイモの *StPinII* 3' UTRを含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図16】ST-LS1イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカー遺伝子コード領域と融合した *ZM Ubi1* プロモーター、引き続いてジャガイモの *StPinII* 3' UTRを含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図17】図12、図13、図14、図15および図16に示されるように、*YFP* が異種間ユビキチンおよび *OS Act1* プロモーターによって駆動される、*T₀* 葉における *YFP* 発現を示す図である。

【図18】図12、図13、図14、図15および図16に示されるように、*AAD1* が *Zm Ubi1* プロモーターによって駆動される、*T₀* 葉における *AAD1* 発現を示す図である。

【図19】*ZM Ubi1* および *OS Act1* プロモーターによって駆動される *YFP* 発現と比べた、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およびアワ (*Setaria italica*) の新規なプロモーターによって駆動される一過性 *YFP* 発現を示す図である。

【図20】*ZM Ubi1* および *OS Act1* プロモーターによって駆動される *YFP* 発現と比べた、新規なミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およびアワ (*Setaria italica*) のプロモーターによって駆動されるカルス組織中の *YFP* 発現を示す図である。

【図21】*ZM Ubi1* および *OS Act1* プロモーターによって駆動される *YFP* 発現と比べた、新規なミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およびアワ (*Setaria italica*) のプロモーターによって駆動される根組織中の *YFP* 発現を示す図である。

【図22】合成したパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) ユビキチン1プロモーター遺伝子要素および隣接するシームレスクローニングオーバーハングの場所を示すプラスミドマップを示す図である。

【図23】合成したパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) ユビキチン1 3' UTR 遺伝子要素および隣接するシームレスクローニングオーバーハングの場所を示すプラスミドマップを示す図である。

【図24】合成したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン1 C 3' UTR 遺伝子要素および隣接するシームレスクローニングオーバーハングの場所を示すプラスミドマップを示す図である。

【図25】合成したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン1 3' UTR 遺伝子要素および隣接するシームレスクローニングオーバーハングの場所を示すプラスミドマップを示す図である。

【図26】合成したアワ (*Setaria italica*) ユビキチン2 (*SI-Ubi2*) 3' UTR 遺伝子要素および隣接するシームレスクローニングオーバーハングの場所を示すプラスミドマップを示す図である。

【図27】パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) ユビキチン1プロモーターおよび *Phi YFP* レポーター遺伝子と融合した 3' UTR を含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図28】ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン1 C プロモーターおよび *Phi YFP* レポーター遺伝子と融合した 3' UTR を含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図29】アワ (*Setaria italica*) ユビキチン2プロモーターおよび *Phi YFP* レポーター遺伝子と融合した 3' UTR を含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図

10

20

30

40

50

である。

【図 3 0】ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 プロモーターおよび *Phi YFP* レポーター遺伝子と融合した 3' UTR を含む発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 3 1】ST - LS 1 イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカー遺伝子コード領域と融合したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 C プロモーター、引き続いてミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 C 3' UTR を含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 3 2】ST - LS 1 イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカー遺伝子コード領域と融合したパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) ユビキチン 1 プロモーター、引き続いてパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) ユビキチン 1 3' UTR を含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 3 3】ST - LS 1 イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカー遺伝子コード領域と融合したアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 プロモーター、引き続いてアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 3' UTR を含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 3 4】ST - LS 1 イントロンを含む黄色蛍光タンパク質 (*Phi YFP*) マーカー遺伝子コード領域と融合したミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 プロモーター、引き続いてミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 3' UTR を含むフラグメントを含むバイナリー発現ベクターを示すプラスミドマップを示す図である。

【図 3 5 - 1】ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 C コード配列および推定プロモーター (ATG の上流配列) を表す図である。上流プロモーター配列に下線を施し、5' - UTR 配列を大文字で示し、イントロンを枠で囲み、Ubi 1 CDS をイタリックで示し、3' - UTR (下線) および転写終結配列は TAA (翻訳終止コドン) の下流にある。

【図 3 5 - 2】ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 C コード配列および推定プロモーター (ATG の上流配列) を表す図である。上流プロモーター配列に下線を施し、5' - UTR 配列を大文字で示し、イントロンを枠で囲み、Ubi 1 CDS をイタリックで示し、3' - UTR (下線) および転写終結配列は TAA (翻訳終止コドン) の下流にある。

【図 3 6 - 1】ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 コード配列および推定プロモーターを表す図である。上流プロモーター配列に下線を施し、5' UTR 配列を大文字で示し、イントロンを枠で囲み、CDS をイタリックで示し、3' - UTR (下線) および転写終結配列は TAA (翻訳終止コドン) の下流にある。

【図 3 6 - 2】ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 コード配列および推定プロモーターを表す図である。上流プロモーター配列に下線を施し、5' UTR 配列を大文字で示し、イントロンを枠で囲み、CDS をイタリックで示し、3' - UTR (下線) および転写終結配列は TAA (翻訳終止コドン) の下流にある。

【図 3 7 - 1】アワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 コード配列および推定プロモーターを表す図である。上流プロモーターに下線を施し、5' UTR 配列を大文字で示し、イントロンを枠で囲み、CDS をイタリックで示し、3' - UTR (下線) および転写終結配列は TAA (翻訳終止コドン) の下流にある。

【図 3 7 - 2】アワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 コード配列および推定プロモーターを表す図である。上流プロモーターに下線を施し、5' UTR 配列を大文字で示し、イントロンを枠で囲み、CDS をイタリックで示し、3' - UTR (下線) および転写終結配列は TAA (翻訳終止コドン) の下流にある。

【図 3 8 - 1】パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) (スイッチグラス) ユビキ

10

20

30

40

50

チン 1 コード配列および推定プロモーターを表す図である。上流プロモーターに下線を施し、5' UTR 配列を大文字で示し、イントロンを枠で囲み、CDS をイタリックで示し、3' - UTR (下線) および転写終結配列は TAA (翻訳終止コドン) の下流にある。

【図 38 - 2】パニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) (スイッチグラス) ユビキチン 1 コード配列および推定プロモーターを表す図である。上流プロモーターに下線を施し、5' UTR 配列を大文字で示し、イントロンを枠で囲み、CDS をイタリックで示し、3' - UTR (下線) および転写終結配列は TAA (翻訳終止コドン) の下流にある。

【発明を実施するための形態】

【0014】

定義

本発明を記載および主張する際、以下に示される定義にしたがって以下の専門用語を使用する。

【0015】

本明細書で使用される「約」という用語は、表示されている値または値の範囲より 10 % 大きいまたは小さいことを意味するが、値または値の範囲をこのより広い定義のみに指定することを意図していない。「約」という用語が前にある各値または値の範囲は、表示されている絶対値または値の範囲の実施形態を包含することも意図している。

【0016】

本明細書で使用する場合、「戻し交配」という用語は、育種家が雑種子孫を親の片方と交配する、例えば、第一世代雑種 F1 を F1 雑種の親遺伝子型の片方と交配する過程を指す。

【0017】

「プロモーター」は、細胞内の RNA ポリメラーゼと結合し、下流 (3' 方向) コード配列の転写を開始することができる DNA 調節領域である。プロモーターは、転写因子によって認識される特異的配列を含み得る。これらの因子は、プロモーター DNA 配列に結合することができ、これによって RNA ポリメラーゼの動員がもたらされる。本発明を定義する目的で、プロモーター配列は、その 3' 末端に、転写開始部位が結合し、バックグラウンドより上の検出可能なレベルで転写を開始するために必要な最小数の塩基またはエレメントを含むよう上流 (5' 方向) に広がる。プロモーター配列中には、(例えば、ヌクレアーゼ S1 によるマッピングによって好都合に定義される) 転写開始部位ならびに RNA ポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン (コンセンサス配列) が見られる。プロモーターは、エンハンサーおよびリプレッサー配列を含む他の発現制御配列と作動可能に結合していてもよい。

【0018】

本開示の目的で、「遺伝子」は、遺伝子産物 (下記参照) をコードする DNA 領域、ならびに遺伝子産物の産生を調節する全ての DNA 領域を含み、このような調節配列がコード配列および/または転写配列に隣接するかどうかは問わない。したがって、遺伝子は、必ずしもこれに限定されないが、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列、例えば、リボソーム結合部位および配列内リボソーム進入部位、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス結合部位および遺伝子座制御領域を含む。

【0019】

本明細書で使用する場合、「天然」または「自然」という用語は、自然に見られる状態を定義する。「天然 DNA 配列」は、自然な手段または伝統的な育種技術によって作製され、(例えば、分子生物学/形質転換技術を用いて) 遺伝子工学によって生成されていない自然に存在する DNA 配列である。

【0020】

本明細書で使用する場合、「導入遺伝子」は、例えば、それだけに限らないが、mRNA を含む遺伝子産物をコードする核酸配列と定義される。一実施形態では、導入遺伝子が外因性核酸であり、ここでは導入遺伝子配列が、遺伝子工学によって、導入遺伝子が通常

10

20

30

40

50

では見られない宿主細胞（またはその子孫）に導入されている。一例では、導入遺伝子が、産業的もしくは薬学的に有用な化合物、または所望の農業形質をコードする遺伝子（例えば、除草剤耐性遺伝子）をコードしている。さらに別の例では、導入遺伝子がアンチセンス核酸配列であり、アンチセンス核酸配列の発現によって標的核酸配列の発現が阻害される。一実施形態では、導入遺伝子が、内因性核酸の追加のゲノムコピーが望まれる内因性核酸、または宿主生物中の標的核酸の配列に対してアンチセンスの配向にある核酸である。

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用する場合、「非ユビキチン導入遺伝子」という用語は、トウモロコシ（*Zea mays*）ユビキチン 1 コード配列（配列番号 27）と 80% 未満の配列同一性を有する任意の導入遺伝子である。

10

【 0 0 2 2 】

本明細書で定義される「遺伝子発現」は、遺伝子に含まれる情報の遺伝子産物への変換である。

【 0 0 2 3 】

本明細書で定義される「遺伝子産物」は、遺伝子によって産生される任意の産物である。例えば、遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、干渉RNA、リボザイム、構造RNAもしくは任意の他の型のRNA）またはmRNAの翻訳によって産生されるタンパク質であり得る。遺伝子産物はまた、キャップ形成、ポリアダニル化、メチル化および編集などの工程によって修飾されたRNA、ならびに例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP-リボシル化、ミリスチル化およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質も含む。遺伝子発現は、外部シグナル、例えば、細胞、組織または生物の、遺伝子発現を増加または低下させる因子への曝露によって影響を受け得る。遺伝子の発現はまた、DNAからRNA、タンパク質までの経路のどこでも調節され得る。遺伝子発現の調節は、例えば、転写、翻訳、RNA輸送およびプロセシングに作用する制御、mRNAなどの中間分子の分解、または特定のタンパク質分子が産生された後のその分子の活性化、不活性化、区画化もしくは分解、あるいはこれらの組み合わせによって起こる。遺伝子発現は、限定されないが、ノーザンブロット、RT-PCR、ウエスタンブロット、またはインビトロ、インサイチュもしくはインビボタンパク質活性アッセイ（複数可）を含む当技術分野で既知の任意の方法によってRNAレベルまたはタンパク質レベルで測定することができる。

20

30

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用する場合、「イントロン」という用語は、転写されるが翻訳されない遺伝子（または対象となる発現したヌクレオチド配列）中に含まれる任意の核酸配列と定義される。イントロンは、DNAの発現した配列中の非翻訳核酸配列、ならびにそこから転写されたRNA分子の対応する配列を含む。本明細書に記載される構築物は、イントロンなどの翻訳および/またはmRNA安定性を増強する配列も含むことができる。1つのこのようなイントロンの例には、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）のヒストンH3変異体の遺伝子IIの第1のイントロンまたは任意の他の一般的に知られているイントロン配列がある。イントロンをプロモーター配列と組み合わせて使用して翻訳および/またはmRNA安定性を増強することができる。

40

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用する場合、「5' 非翻訳領域」または「5' - UTR」という用語は、プレmRNAまたは成熟mRNAの5' 末端の非翻訳セグメントと定義される。例えば、成熟mRNAでは、5' - UTRは、典型的にはその5' 末端に7 - メチルグアノシンキャップを持ち、スプライシング、ポリアダニル化、細胞質に向けたmRNA輸送、翻訳装置によるmRNAの5' 末端の同定、および分解からのmRNAの保護などの多くの過程に参与している。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用する場合、「転写ターミネーター」という用語は、プレmRNAまたは

50

成熟 mRNA の 3' 末端の転写セグメントと定義される。例えば、「ポリアデニル化シグナル」部位を越えたより長い長さの DNA が プレ mRNA として転写される。この DNA 配列は通常、プレ mRNA の成熟 mRNA への適切なプロセシングのための 1 つまたは複数の転写終結シグナルを含む。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用する場合、「3' 非翻訳領域」または「3' - UTR」という用語は、プレ mRNA または成熟 mRNA の 3' 末端の非翻訳セグメントと定義される。例えば、成熟 mRNA では、この領域はポリ (A) テールを持ち、mRNA 安定性、翻訳開始および mRNA 輸送において多くの役割を有することが知られている。

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用する場合、「ポリアデニル化シグナル」という用語は、ポリ (A) ポリメラーゼが存在する場合、転写産物が、例えば、ポリ (A) シグナルの 10 ~ 30 塩基下流に位置するポリアデニル化部位でポリアデニル化されることを可能にする、mRNA 転写産物中に存在する核酸配列を示す。多くのポリアデニル化シグナルが当技術分野で知られており、本発明に有用である。例示的な配列には、Loke J., et al., (2005) Plant Physiology 138 (3); 1457-1468 に記載されている AAUAAA およびその変異形が含まれる。

10

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用する「単離された」という用語は、自然環境から取り出されたまたは化合物が最初に形成された時に存在する他の化合物から取り出されたことを意味する。「単離された」という用語は、自然源から単離された材料ならびに宿主細胞中での組換え発現による調製後に回収された材料 (例えば、核酸およびタンパク質) または核酸分子、タンパク質およびペプチドなどの化学的に合成された化合物を包含する。

20

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用する「精製された」という用語は、天然または自然環境で分子または化合物と通常は会合している汚染物質を実質的に含まない、あるいは化合物が最初に形成された際に存在する他の化合物に対して実質的に高濃度の形態の分子または化合物の単離に関し、元の組成物の他の成分から分離された結果として純度が増加していることを意味する。「精製された核酸」という用語は、本明細書において、成分中の化学的または機能的変化をもたらしながら、それだけに限らないが、ポリペプチド、脂質および炭水化物を含む他の生物学的化合物から分離された、とは別に産生された、またはから精製された核酸配列を記載するために使用される (例えば、核酸は、タンパク質汚染物質を除去し、核酸と染色体中に残っている DNA を結合している化学結合を破壊することによって、染色体から精製され得る)。

30

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用する場合、「相同性ベースの遺伝子サイレンシング」または「HBGS」は、転写型遺伝子サイレンシングと転写後遺伝子サイレンシングの両方を含む総称用語である。非連結サイレンシング遺伝子座による標的遺伝子座のサイレンシングは、それぞれ、プロモーターまたは転写配列に対応する二本鎖 RNA (dsRNA) の産生による転写阻害 (転写型遺伝子サイレンシング; TGS) または mRNA 分解 (転写後遺伝子サイレンシング; PTGS) から生じ得る。各工程に別個の細胞成分が関与していることは、dsRNA 誘導 TGS および PTGS がおそらく古代の共通の機構の多様化から生じていることを示唆している。しかしながら、TGS と PTGS の厳密な比較は、一般的に別個のサイレンシング遺伝子座の分析によるので、達成が困難であった。単一の導入遺伝子座が、異なる標的遺伝子のプロモーターおよび転写配列に対応する dsRNA の産生により、TGS と PTGS の両方を誘因すると記載され得る。

40

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用する場合、「核酸分子」、「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語 (全 3 つの用語は互いに同義である) は、RNA、cDNA、ゲノム DNA および合成型ならびにこれらの混合ポリマーのセンス鎖とアンチセンス鎖の両方を含み得るヌクレ

50

オチドのポリマー型を指す。「ヌクレオチド」は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはいずれかの型のヌクレオチドの修飾型を指し得る。核酸分子は、特に指定しない限り、通常少なくとも10塩基長である。これらの用語は不定の長さのRNAまたはDNAの分子を指し得る。これらの用語はDNAの一本鎖型および二本鎖型を含む。核酸分子は、天然および/または非天然ヌクレオチド連結によって連結した天然および修飾ヌクレオチドのいずれかまたは両方を含み得る。

【0033】

核酸分子は、当業者によって容易に認識されるように、化学的もしくは生化学的に修飾されていてもよく、または非天然もしくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含んでいてもよい。このような修飾には、例えば、標識、メチル化、天然ヌクレオチドの1個または複数の類似体による置換、ヌクレオチド間修飾（例えば、非荷電連結：例えば、メチルホスホン酸、ホスホトリエステル、ホスホロアミド酸、カルバメート（carbamate）等；荷電連結：例えば、ホスホロチオエート（phosphorothioate）、ホスホロジチオエート（phosphorodithioate）等；ペンダント部分：例えばペプチド；インターカレーター：例えば、アクリジン、ソラレン等；キレート剤；アルキル化剤；および修飾連結：例えば、 α アノマー核酸等）が含まれる。「核酸分子」という用語はまた、一本鎖、二本鎖、部分二重鎖、三重鎖、ヘアピン型、円形、およびパドロック型（padlocked）立体配座を含む任意のトポロジー立体配座を含む。

10

【0034】

転写はDNA鎖に沿って5'から3'への様式で進行する。これは、（ピロリン酸の必須の除去とともに）リボヌクレオチド-5'-三リン酸が成長している鎖の3'末端に逐次付加することによってRNAが作製されることを意味する。鎖状または円形核酸分子のいずれにおいても、別個のエレメント（例えば、特定のヌクレオチド配列）が、さらなるエレメントから5'方向に同核酸に結合しているまたは結合する場合に、別個のエレメントをさらなるエレメントに対して「上流」と呼ぶことができる。同様に、別個のエレメントが、さらなるエレメントから3'方向に同核酸に結合しているまたは結合する場合に、さらなるエレメントに対して「下流」となり得る。

20

【0035】

本明細書で使用する場合、「塩基位置」という用語は、指定された核酸中の所与の塩基またはヌクレオチド残基の場所を指す。指定された核酸は、基準核酸とのアラインメントによって定義され得る。

30

【0036】

本明細書で使用する場合、「ハイブリダイゼーション」という用語は、相補的塩基間のワトソン-クリック、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型水素結合を含む水素結合によってオリゴヌクレオチドおよびその類似体がハイブリダイズする過程を指す。一般的に、核酸分子は、ピリミジン（シトシン（C）、ウラシル（U）およびチミン（T））またはプリン（アデニン（A）およびグアニン（G））のいずれかの窒素塩基からなる。これらの窒素塩基は、ピリミジンとプリンとの間で水素結合を形成し、ピリミジンとプリンの結合を「塩基対形成」と呼ぶ。より具体的には、AはTまたはUと水素結合し、GはCと結合する。「相補的」とは、2つの別個の核酸配列または同じ核酸配列の2つの別個の領域間で生じる塩基対形成を指す。

40

【0037】

本明細書で使用する場合、「特異的にハイブリダイズ可能」および「特異的に相補的」という用語は、オリゴヌクレオチドとDNAまたはRNA標的との間で、安定で特異的な結合が起こるような十分な程度の相補性を指す。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズするためにその標的配列と100%相補的である必要はない。オリゴヌクレオチドと標的DNAまたはRNA分子の結合が標的DNAまたはRNAの正常な機能を妨害し、特異的結合が望まれる条件下、例えば、インビボアッセイまたは系の場合に生理学的条件下で、オリゴヌクレオチドと非標的配列の非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性がある場合に、オリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能である。このよう

50

な結合を特異的ハイブリダイゼーションと呼ぶ。特定の程度のストリンジェンシーをもたらすハイブリダイゼーション条件は、選択されるハイブリダイゼーション法の性質ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに応じて変化する。一般的に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度（特に、 Na^+ および / または Mg^{2+} 濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに寄与するが、洗浄時間もストリンジェンシーに影響を及ぼす。特定の程度のストリンジェンシーを達成するのに要するハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, chs. 9 and 11に論じられている。

10

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する場合、「ストリンジェントな条件」という用語は、ハイブリダイゼーション分子とDNA標的との間でのミスマッチが50%未満である場合にのみハイブリダイゼーションが起こる条件を包含する。「ストリンジェントな条件」は、さらなる特定のレベルのストリンジェンシーを含む。したがって、本明細書で使用する場合、「中等度のストリンジェンシー」条件とは、50%超の配列ミスマッチを有する分子がハイブリダイズしない条件であり、「高いストリンジェンシー」の条件とは、20%超のミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件であり、「極めて高いストリンジェンシー」の条件とは、10%超のミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件である。特定の実施形態では、ストリンジェントな条件が、65 でのハイブリダイゼーション、引き

20

続いて65 で $0.1 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ による40分間の洗浄を含むことができる。以下が代表的で、非限定的なハイブリダイゼーション条件である。

- ・極めて高いストリンジェンシー： $5 \times \text{SSC}$ 緩衝液中65 で16時間のハイブリダイゼーション； $2 \times \text{SSC}$ 緩衝液中室温でそれぞれ15分間の2回の洗浄；および $0.5 \times \text{SSC}$ 緩衝液中65 でそれぞれ20分間の2回の洗浄。

- ・高いストリンジェンシー： $5 \sim 6 \times \text{SSC}$ 緩衝液中65 ~ 70 で16 ~ 20時間のハイブリダイゼーション； $2 \times \text{SSC}$ 緩衝液中室温でそれぞれ5 ~ 20分間の2回の洗浄；および $1 \times \text{SSC}$ 緩衝液中55 ~ 70 でそれぞれ30分間の2回の洗浄。

30

- ・中等度のストリンジェンシー： $6 \times \text{SSC}$ 緩衝液中室温 ~ 55 で16 ~ 20時間のハイブリダイゼーション； $2 \times \sim 3 \times \text{SSC}$ 緩衝液中室温 ~ 55 でそれぞれ20 ~ 30分間の少なくとも2回の洗浄。

実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子が、極めて高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で結合したままであることができる。実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子が、高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で結合したままであることができる。実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子が、中等度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で結合したままであることができる。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用する場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、短い核酸ポリマーを指す。オリゴヌクレオチドは、長い核酸セグメントの切断によって、または個々のヌクレオチド前駆体を重合することによって形成され得る。自動化合成装置によって、最大数百塩基対長のオリゴヌクレオチドの合成が可能になる。オリゴヌクレオチドは相補的ヌクレオチド配列に結合することができるので、DNAまたはRNAを検出するためのプローブとして使用することができる。DNAで構成されたオリゴヌクレオチド（オリゴデオキシリボヌクレオチド）を、PCR、小型DNA配列の増幅のための技術に使用することができる。PCRでは、オリゴヌクレオチドを典型的には「プライマー」と呼び、プライマーによってDNAポリメラーゼがオリゴヌクレオチドを伸長し、相補鎖を複製することが可能になる。

40

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する場合、「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」という用語は、

50

1987年7月28日に付与された米国特許第4683195号に記載されているように、微量の核酸、RNAおよび/またはDNAを増幅する手順または技術を定義する。一般的に、オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができるように、対象となる領域の末端からのまたはこれを超えた配列情報が入手可能である必要があり、これらのプライマーは増幅される鋳型の逆ストランドと配列が同一または類似である。2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは増幅される材料の末端と一致し得る。PCRを使用して特異的RNA配列、全ゲノムDNAからの特異的DNA配列および全細胞RNAから転写されたcDNA、バクテリオファージまたはプラスミド配列等を増幅することができる。一般的に、Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989) を参照されたい。

10

【0041】

本明細書で使用する場合、「プライマー」という用語は、条件がプライマー伸長産物の合成に適している場合に、相補鎖に沿って合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを指す。合成条件は、4つの異なるデオキシリボヌクレオチド三リン酸と逆転写酵素またはDNAポリメラーゼなどの少なくとも1種の重合誘導剤の存在を含む。これらは、補助因子であるまたは種々の適当な温度でpHなどの条件に影響を及ぼす構成成分を含んでもよい適当な緩衝液中に存在する。プライマーは、好ましくは増幅効率が最適化されるような一本鎖配列であるが、二本鎖配列を利用することもできる。

【0042】

本明細書で使用する場合、「プローブ」という用語は、標的配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを指す。TaqMan（登録商標）またはTaqMan（登録商標）-スタイルアッセイ手順では、プローブが2つのプライマーのアニリング部位間に位置する標的の部分にハイブリダイズする。プローブは、約8個のヌクレオチド、約10個のヌクレオチド、約15個のヌクレオチド、約20個のヌクレオチド、約30個のヌクレオチド、約40個のヌクレオチドまたは約50個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、プローブが約8個のヌクレオチド～約15個のヌクレオチドを含む。プローブは、検出可能な標識、例えば、蛍光体（Texas-Red（登録商標）、フルオレセインイソチオシアネート等）をさらに含むことができる。検出可能な標識は、例えば、プローブの5'末端またはプローブの3'末端に位置するプローブオリゴヌクレオチドに直接共有結合することができる。蛍光体を含むプローブは、消光剤、例えば、Black Hole Quencher（商標）、Iowa Black（商標）等をさらに含んでもよい。

20

30

【0043】

本明細書で使用する場合、「配列同一性」または「同一性」という用語は、互換的に使用され、指定された比較窓にわたって最大一致で整列させると同じである2つの配列中の核酸残基を指すことができる。

【0044】

本明細書で使用する場合、「配列同一性の百分率」という用語は、比較窓にわたって2つの最適に整列された配列（例えば、核酸配列またはアミノ酸配列）を比較することによって決定される値を指し、比較窓中の配列の部分は、2つの配列の最適アラインメントのために、基準配列（付加または欠失を含まない）と比べて付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。百分率は、同一核酸またはアミノ酸残基が両配列中で生じる位置の数を決定して一致した位置の数を得て、一致した位置の数を比較窓中の位置の総数で割り、結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることによって計算される。比較のために配列を整列する方法は周知である。種々のプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73: 237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5: 151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8: 155-65; Pearson et al. (1994) Meth

40

50

ods Mol. Biol. 24: 307-31; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174: 247-50に記載されている。

【0045】

国立生物工学情報センター (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST (商標); Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10) は、いくつかの配列解析プログラムと合わせて使用するために、国立生物工学情報センター (Bethesda, MD) を含むいくつかの供給源からおおよびインターネットで入手可能である。このプログラムを用いてどのように配列同一性を決定するのかについての説明は、BLAST (商標) の「ヘルプ」節においてインターネット上で入手可能である。核酸配列を比較するために、デフォルトパラメータを用いてBLAST (商標) (Blastn) プログラムの「Blast2配列」関数を使用することができる。基準配列とのさらに大きな類似性を有する核酸配列は、この方法で評価すると、増加する同一性百分率を示す。

10

【0046】

本明細書で使用する場合、「作動可能に連結している」という用語は、互いに機能的関係になっている2つの成分を指す。調節配列およびコード配列に関して使用する場合、「作動可能に連結している」という用語は、調節配列が、連結しているコード配列の発現に影響を及ぼすことを意味する。「調節配列」、「調節エレメント」または「制御エレメント」は、関連するコード配列の転写、RNAプロセッシングもしくは安定性、または翻訳のタイミングおよびレベル/量に影響を及ぼす核酸配列を指す。調節配列には、プロモーター；翻訳リーダー配列；5'および3'非翻訳領域、イントロン；エンハンサー；ステム-ループ構造；リプレッサー結合配列；終結配列；ポリアデニル化認識配列等が含まれ得る。特定の調節配列は、これと作動可能に連結しているコード配列の上流および/または下流に位置し得る。また、コード配列と作動可能に連結している特定の調節配列は、二本鎖核酸分子の関連する相補鎖上に位置し得る。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションによって達成され得る。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを慣用的実務にしたがって使用する。しかしながら、エレメントが作動可能に連結するように連続している必要はない。

20

【0047】

本明細書で使用する場合、「形質転換」という用語は、核酸分子をこのような細胞に導入することができる全ての技術を包含する。例としては、それだけに限らないが、ウイルスベクターによるトランスフェクション；プラスミドベクターによる形質転換；電気穿孔；リポフェクション；微量注入 (Mueller et al. (1978) Cell 15: 579-85)；アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介移入；直接DNA取り込み；ウィスカー媒介形質転換；および微粒子銃が挙げられる。

30

【0048】

本明細書で使用する場合、「形質導入する」という用語は、ウイルスが核酸を細胞内に移入する過程を指す。

【0049】

本明細書で使用される「ポリリンカー」または「マルチクローニング部位」という用語は、核酸配列上の互いに10ヌクレオチド以内に位置する3つ以上の2型制限酵素部位のクラスターを定義する。ポリリンカーを含む構築物は、遺伝子のコード領域などの核酸配列の挿入および/または切除に利用される。

40

【0050】

本明細書で使用する場合、「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」という用語は、その各々が特異的ヌクレオチド配列でまたはその近くで二本鎖DNAを切断する細菌酵素を指す。2型制限酵素は、同部位でDNAを認識および切断し、これらの酵素には、それだけに限らないが、XbaI、BamHI、HindIII、EcoRI、XhoI、SalI、KpnI、AvaI、PstIおよびSmaIが含まれる。

【0051】

50

「ベクター」という用語は、「構築物」、「クローニングベクター」および「発現ベクター」という用語と互換的に使用され、宿主を形質転換し、導入配列の発現（例えば、転写および翻訳）を促進するために、DNAまたはRNA配列（例えば、外来遺伝子）を宿主細胞に導入することができる媒体を意味する。「非ウイルスベクター」は、ウイルスまたはレトロウイルスを含まないベクターを意味することを意図している。いくつかの実施形態では、「ベクター」が、少なくとも1つのDNA複製起点と少なくとも1つの選択可能なマーカー遺伝子とを含むDNAの配列である。例としては、それだけに限らないが、外因性DNAを細胞内に運ぶプラスミド、コスミド、バクテリオファージ、細菌人工染色体（BAC）またはウイルスが挙げられる。ベクターは1つまたは複数の遺伝子、アンチセンス分子、および/または選択マーカー遺伝子ならびに当技術分野で既知の他の遺伝エレメントを含むこともできる。ベクターは、細胞に形質導入、細胞を形質転換または細胞に感染し、それによって細胞に、ベクターによってコードされた核酸分子および/またはタンパク質を発現させることができる。

【0052】

「プラスミド」という用語は、原核または真核宿主細胞中のいずれかで常染色体複製が可能な核酸の円形鎖を定義する。この用語は、DNAまたはRNAのいずれであってもよく、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい核酸を含む。定義のプラスミドは、細菌複製起点に相当する配列も含み得る。

【0053】

本明細書で使用される「選択マーカー遺伝子」という用語は、選択マーカー遺伝子が挿入された細胞の同定を容易にするタンパク質をコードする遺伝子または他の発現カセットを定義する。例えば、「選択マーカー遺伝子」は、レポーター遺伝子ならびに例えば、植物細胞を選択剤から保護するまたは選択剤に対する耐性/許容性を与えるために植物形質転換に使用される遺伝子を包含する。一実施形態では、機能的な選択マーカーを受容している細胞または植物のみが、選択剤を有する条件下で分裂または成長することができる。選択剤の例としては、例えば、スペクチノマイシン、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシンおよびハイグロマイシンを含む抗生物質が挙げられる。これらの選択マーカーには、抗生物質カナマイシンに対する耐性を与える酵素を発現するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（*neo^r*）、ならびに関連抗生物質ネオマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシンおよびG418に関する遺伝子、またはハイグロマイシンに対する耐性を与える酵素を発現するハイグロマイシントランスフェラーゼ（*hpt*）の遺伝子が含まれる。他の選択マーカー遺伝子には、*bar*または*pat*を含む除草剤耐性（グルホシネートアンモニウムまたはホスフィノトリシンに対する耐性）、アセト乳酸シンターゼ（*ALS*）、スルホニル尿素（*SU*）、イミダゾリノン（*IMI*）、トリアゾロピリミジン（*TP*）、ピリミジニルオキシベンゾエート（*POB*）および分岐鎖アミノ酸の合成の最初のステップを妨げるスルホニルアミノカルボニルトリアゾリノンなどの阻害剤に対する耐性）、グリホサート、2, 4-Dおよび金属耐性または感受性をコードする遺伝子が含まれ得る。選択マーカー遺伝子として使用することができる「レポーター遺伝子」の例としては、 β -グルクロニダーゼ（*GUS*）、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（*GFp*）、黄色蛍光タンパク質（*YFP*）、*DsRed*、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（*CAT*）、アルカリホスファターゼなどをコードするタンパク質などの発現したレポーター遺伝子タンパク質の目視観察が挙げられる。「マーカー陽性」という句は、選択マーカー遺伝子を含むよう形質転換された植物を指す。

【0054】

本明細書で使用する場合、「検出可能なマーカー」という用語は、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素などの検出を可能にする標識を指す。検出可能なマーカーの例としては、それだけに限らないが、以下が挙げられる：蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ

10

20

30

40

50

、アルカリホスファターゼ)、化学発光体、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)。実施形態では、検出可能なマーカーを種々の長さのスペーサーアームによって結合して潜在的な立体障害を減少させることができる。

【0055】

本明細書で使用する場合、「検出する」という用語は、特異的分子の定性的測定と定量的測定の両方、例えば、特異的ポリペプチドの測定を含むよう最も広義に使用される。

【0056】

本明細書で使用する場合、「カセット」、「発現カセット」および「遺伝子発現カセット」という用語は、特異的制限部位でまたは相同組換えによって核酸またはポリヌクレオチドに挿入することができるDNAのセグメントを指す。本明細書で使用する場合、DNAのセグメントは、対象となるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、カセットおよび制限部位が、確実にカセットを転写および翻訳のための適切な読み枠に挿入するように設計される。実施形態では、発現カセットが、対象となるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、ポリヌクレオチドに加えて、特定の宿主細胞の形質転換を促進するエレメントを有することができる。実施形態では、遺伝子発現カセットが、宿主細胞中での対象となるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現増強を可能にするエレメントも含み得る。これらのエレメントには、それだけに限らないが、プロモーター、ミニマルプロモーター、エンハンサー、応答エレメント、ターミネーター配列、ポリアダニル化配列などが含まれ得る。

10

20

【0057】

本明細書で使用する場合、「リンカー」または「スペーサー」は、2つの別々の実体を互いに結合する結合、分子または分子の群である。リンカーおよびスペーサーは、2つの実態の最適間隔を提供する、または2つの実態が互いに離れていることを可能にする不安定な連結をさらに提供することができる。不安定な連結には、光切断基、酸不安定部分、塩基不安定部分および酵素切断可能な基が含まれる。

【0058】

本明細書で使用する場合、「対照」という用語は、比較目的で分析手順に使用される試料を指す。対照は「陽性」であっても「陰性」であってもよい。例えば、分析手順の目的が、細胞または組織中で差次的に発現した転写産物またはポリペプチドを検出することである場合、所望の発現を示している既知の植物からの試料などの陽性対照、および所望の発現を欠いている既知の植物からの試料などの陰性対照を含めることが一般的に好ましい。

30

【0059】

本明細書で使用する場合、「植物」という用語は、全植物および植物の任意の子孫、細胞、組織または部分を含む。本発明に使用することができる植物のクラスは、一般的に被子植物(単子葉および双子葉植物)、裸子植物、シダおよび多細胞藻類を含む突然変異誘発で修正可能な高等および下等植物のクラスと同じくらい広い。したがって、「植物」には双子葉および単子葉植物が含まれる。「植物部分」という用語には、例えば、限定されないが、種子(成熟種子および未成熟種子を含む);植物挿穂;植物細胞;植物細胞培養物;植物器官(例えば、花粉、胚、花、果実、シュート、葉、根、茎および外植片)を含む植物の任意の部分(複数可)が含まれる。植物組織または植物器官は、種子、プロトプラスト、カルス、または構造もしくは機能単位に組織化される植物細胞の任意の他の群であり得る。植物細胞または組織培養物は、細胞または組織を得た植物の生理学的および形態学的特徴を有する植物を再生することができ、その植物と実質的に同じ遺伝子型を有する植物を再生することができるだろう。対照的に、いくつかの植物細胞は、植物を作製するために再生することができない。植物細胞または組織培養物に再生可能な細胞は、胚、プロトプラスト、分裂組織細胞、カルス、花粉、葉、葯、根、根端、ひげ、花、仁、穂、穂軸、殻または柄であり得る。

40

50

【 0 0 6 0 】

植物部分には、収穫可能な部分および子孫植物の繁殖に有用な部分が含まれる。繁殖に有用な植物部分には、例えば、限定されないが、種子；果実；挿穂；実生；塊茎および根茎が含まれる。植物の収穫可能な部分は、例えば、限定されないが、花；花粉；実生；塊茎；葉；茎；果実；種子；および根を含む植物の任意の有用な部分であり得る。

【 0 0 6 1 】

植物細胞は、プロトプラストおよび細胞壁を含む、植物の構造的および生理学的単位である。植物細胞は、単離された単一細胞であってもまたは細胞の集合体（例えば、もろいカルスおよび培養細胞）であってもよく、高次組織単位の一部（例えば、植物組織、植物器官および植物）であってもよい。したがって、植物細胞は、プロトプラスト、配偶子産生細胞、または全植物に再生することができる細胞もしくは細胞の集合であり得る。したがって、複数の植物細胞を含み、全植物に再生することができる種子は、本明細書の実施形態では「植物細胞」とみなされる。

10

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される「プロトプラスト」という用語は、その細胞壁が完全にまたは部分的に除去され、その脂質二重層膜がむき出しになっている植物細胞を指し、したがって、その細胞壁が完全に除去されたプロトプラスト、およびその細胞壁が部分的にのみ除去されたスフェロプラストを含むが、これらに限定されない。典型的には、プロトプラストは、細胞培養物または全植物に再生する能力を有する、細胞壁を有さない単離植物細胞である。

20

【 0 0 6 3 】

具体的に説明しない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学の共通語の定義は、例えば、Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9) ; Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) ; および Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) に見出すことができる。

【 0 0 6 4 】

実施形態

30

本明細書で開示されるように、パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) のユビキチン遺伝子の調節配列を用いて非ユビキチン導入遺伝子を発現させるための新規な組換え構築物が提供される。これらの構築物を使用して植物細胞を含む細胞を形質転換し、その細胞内で導入遺伝子産物を発現する完全な生物を作製することができる。

【 0 0 6 5 】

調節エレメント

基礎研究または生物工学用途に使用される植物プロモーターは、一般的に一方方向性であり、融合したただ1つの遺伝子をその3'末端（下流）に向ける。代謝工学および形質スタッキングのためには、通常、複数の遺伝子を植物に導入することが必要であるので、複数の遺伝子の発現を駆動するために、典型的には、複数のプロモーターがトランスジェニック作物に必要である。

40

【 0 0 6 6 】

トランスジェニック産物の開発は、ますます複雑になっており、複数の導入遺伝子を単一遺伝子座に積み重ねることが要求されている。伝統的には、各導入遺伝子が通常は発現のためのプロモーターを要し、1つの遺伝子スタック内で異なる導入遺伝子を発現させるために複数のプロモーターが要求される。これは、しばしば単一のポリジーン形質の発現のために類似のレベルの異なる遺伝子の発現パターンを得るために1つの導入遺伝子スタック内で同じプロモーターを繰り返し使用することにつながる。同じプロモーターによって駆動される多重遺伝子構築物は、この分野であまり有効でないトランスジェニック産物

50

をもたらす遺伝子サイレンシングを引き起こすことが知られている。プロモーター反復による過剰な転写因子（TF）-結合部位のために、転写不活性化につながる内因性TFの欠乏が引き起こされ得る。導入遺伝子のサイレンシングは、導入遺伝子を発現させるために作製されたトランスジェニック植物の性能におそらく望ましくない影響を及ぼす。導入遺伝子中の反復配列は、ポリヌクレオチド再配列をもたらす遺伝子の遺伝子座内相同組換えにつながり得る。

【0067】

遺伝子スタック内での異なる導入遺伝子の発現に様々なプロモーターを使用することが望ましい。実施形態では、異なる植物種から得られた様々な構成的ユビキチンが、RNAi、人工miRNAまたはヘアピン-ループRNA配列を含む複数の転写単位の転写を駆動することができる。

10

【0068】

植物中で非ユビキチン導入遺伝子を発現させるために構成的ユビキチン（Ubi1）プロモーターを使用する方法および構築物が提供される。実施形態では、プロモーターがミナトカモジグサ（*Brachypodium distachyon*）ユビキチン1C（Ubi1C）プロモーターであり得る。

CTGCTCTCGTTTCAGCCCCACAGTAAACACGCCCGTGCGACATGCA
GATGCCCTTCCACCCACGCCGACCAACCCCAAGTCCGCGCCGCG
CTCGTCTCACGGCGGCCATCCGCGATCCGCGCGTGCAACGTCAT
CCGGAGGAGGCGAGCGCGGATGTCTGACGGGCCACGGCGGGCGG
CGGACACGACGGCGGACGCCCCCGACTCCGCGCGCGCGTGCA
GGCTGCAAGTGGCGTCTGTGGTGGCCGTCCTCGCCTTGCAACGAGA
TCCCCCGCGTGGACGAGCGGCCCGCCTCCACCCAGCCCCCTATA
TCGAGAAATCAACGGTGGGCTCTGAGCTCTCTCAGCAACCTCTC
CCCCACCCCCCTTCCGACCAACGCTCTCCCTTCCCCCGTGCCCC
CTCTTCTCTCGTAACCCGAGCGCGCGAGAGAACAAACCAAC
GAAAGGGGCGAAGAGAAATCGGCCATAGAGAGGAGATGGGGCGG
AGGCGGATAGTTTTCAGCCATTTACGGAGAGAAATGGGGAGGGA
GAGAACACGACATCATACGGACGGCGACCCCTCTAGCTGGGCT
GGCTGTCTCTAAAGAAATCGAACGGGAATCGCTGCGGCCAGGAG
AAAACGAACGGTCTCTGAAGCATGTGCGGCCCGGTTCTTCTCA
AAACACTTATCTTTTAAGATTGAAGTAGTATATATGACTGA
AATTTTTCACAGGTTTTCCTCCATAAACAGGTGAGCTTTA
TCTCATCTCTTTTGTTTTAGGATGTACGTATTATATATGACT
GAATATTTTTCATTTGAATGAAGATTTTTCGACCC
CCAAAAATAAAAAACGGAGGGGAGTACCTTTGTGCGCGTGTA
TATGGACTAGAGCCATCGGGACGTTTCCGGAGACTGCGGTG
GTGGGGGCGATGGACGCAACAGACCGCATTTTTCGGTTTG
CGACTCGCGCGTTCGCACTCTGGTAGGCACGACTCGTCCGGGT
TCGGCTCTTTCGTGAGCCGTGACGTAAACAGACCCGTTCTC
TTCCCCCGTCTGGGCCATCCATAAATCCCCCTCCATCGGC
TTCCTTTTCCTCAATCCAGCACCCCTGATT（配列番号1）

20

30

40

実施形態では、プロモーターがミナトカモジグサ（*Brachypodium distachyon*）ユビキチン1（Ubi1）プロモーターであり得る。

GGCGTCAAGGACTGGCGAAGTCTGGACTCTGCAAGGGCCGA
CTGCTGAAGACGAAGCAGAGGAAGAGAAAGGGAAGTGTTTC
GACTTGTAATTTGTAGGGGTTTTCCTAGAGGAACCTTGTA
ATTTGTAGGTGGGCTGGCCCTCGTTGGAAACAGATGCTGG
CTGGTTGGGCTGGGCCGATGTACGCTTGCAAAACAACCTTGT
GGCGGGCCCGTTCTGGACGAGCAGGAGTTTCTTTTGTTC

50

T C A C T T T T C T G G T C T T C T T T A G T T A C G G A G T A C C T T T T G T
 T T T T T A A A G G A G T T A C C T T T T T T T A G G A A T T C T T T A G T T
 A C C T T T C G C T T G C T C T C A A A A A A T A T T T A A C T T T C G C T T T
 T T T T C A T T T T A A T T T T T G C A A C T A T T T A C G A G T T T C A T G A
 A T G C T T A T T T T C C A G C A T A T C A T T A T T T G C A A G T A T T T T T
 A T G C C G T A T G T A T T G G A C G A G A G C C A T C G G G A C T G T T C C A
 G A G A C T G C G T G G T G G G G A C G G C T C C C A A C C G C C T T T T C T A
 T C T C T G T T C G C A T C C G G T G G C C G A C T T G G C T C G C G C G T G A
 G C C G T G A C G T A A C A G A C T T G G T C T C T T C C C C A T C T G G C C A
 T C T A T A A A T T C C C C C A T C G A T C G A C C C T C C C T T T C C (配列番
 号 2)

10

実施形態では、プロモーターがアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 (U b i 2) プロモーターであり得る。

T G C G T C T G G A C G C A C A A G T C A T A G C A T T A T C G G C T A A A A T
 T T C T T A A T T T C T A A A T T A G T C A T A T C G G C T A A G A A A G T G G
 G G A G C A C T A T C A T T T C G T A G A A C A A G A A C A A G G T A T C A T A
 T A T A T A T A T A T A T A T A A T A T T T A A A C T T T G T T A A G T G G A A
 T C A A A G T G C T A G T A T T A A T G G A G T T T C A T G T G C A T T A A A T
 T T T A T G T C A C A T C A G C A A T T T T G T T G A C T T G G C A A G G T C A
 T T T A G G G T G T G T T T G G A A G A C A G G G G C T A T T A G G A G T A T T
 A A A C A T A G T C T A A T T A C A A A A C T A A T T G C A C A A C C G C T A A
 G C T G A A T C G C G A G A T G G A T C T A T T A A G C T T A A T T A G T C C A
 T G A T T T G A C A A T G T G G T G C T A C A A T A A C C A T T T G C T A A T G
 A T G G A T T A C T T A G G T T T A A T A G A T T C G T C T C G T G A T T T A G
 C C T A T G G G T T C T G C T A T T A A T T T T G T A A T T A G C T C A T A T T
 T A G T T C T T A T A A T T A G T A T C C G A A C A T C C A A T G T G A C A T G
 C T A A A G T T T A A C C C T G G T A T C C A A A T G A A G T C T T A T G A G A
 G T T T C A T C A C T C C G G T G G T A T A T G T A C T T A G G C T C C G T T T
 T C T T C C A C C G A C T T A T T T T T A G C A C C C G T C A C A T T G A A T G
 T T T A G A T A C T A A T T A G A A G T A T T A A A C G T A G A C T A T T T A C
 A A A A T C C A T T A C A T A A G A C G A A T C T A A A C G G C G A G A C G A A
 T C T A T T A A A C C T A A T T A G T C C A T G A T T T G A C A A T G T G T T G
 C T A C A G T A A A C A T T T T G C T A A T G A T G G A T T A A T T A G G C T T A
 A T A G A T T C G T C T C G C C G T T T A G C C T C C A C T T A T G T A A T G G
 G T T T T C T A A A C A A T C T A C G T T T A A T A C T C C T A A T T A G T A T
 C T A A A T A T T C A A T G T G A C A C G T G C T A A A A A T A A G T C A G T G
 G A A G G A A G A G A A C G T C C C C T T A G T T T T C C A T C T T A T T A A T
 T G T A C G A T G A A A C T G T G C A G C C A G A T G A T T G A C A A T C G C A
 A T A C T T C A A C T A G T G G G C C A T G C A C A T C A G C G A C G T G T A A
 C G T C G T G A G T T G C T G T T C C C G T A G (配列番号 3)

20

30

40

実施形態では、プロモーターがパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) (スイッチグラス) ユビキチン 1 プロモーターであり得る。

T T G A A T T T T A A T T T C A A A T T T T G C A G G G T A G T A G T G G A C A
 T C A C A A T A C A T A T T T A G A A A A A G T T T T A T A A T T T T C C T C C
 G T T A G T T T T C A T A T A A T T T T G A A C T C C A A C G A T T A A T C T A
 T T A T T A A A T A T C C C G A T C T A T C A A A A T A A T G A T A A A A A T T
 T A T G A T T A A T T T T T C T A A C A T G T G T T A T G G T G T G T A C T A T
 C G T C T T A T A A A A T T T C A A C T T A A A A C T C C A C C T A T A C A T G
 G A G A A A T G A A A A A G A C G A A T T A C A G T A G G G A G T A A T T T G A
 A C C A A A T G G A A T A G T T T G A G G G T A A A A T G A A C T A A A C A A T

50

A G T T T A G G A G G T T A T T C A G A T T T T A G T T A T A G T T G A G A G G
 A G T A A T T T A G A C T T T T T C C T A T C T T G A A T T G T T G A C G G C T
 C T C C T A T C G G A T A T C G G A T G G A G T C T T T C A G C C C A A C A T A
 A C T T C A T T C G G G C C C A A A C G T T C G T C C A T C C A G C C T A G G G
 A G A A C A T T T T T G C C C A T G A T A T C T G T T T T T C T T T T T T C T A
 T T T T C A C T G G T A T T A T A G G A G G G A A A T A T A C A A C G T G T T C
 A C C T T T G G T T T C A T T C T T G T T C C A T C T G A A T T T A T C T A A A
 A C T G T G T T T G A A C T T C G T A A G A A T T T T G T T C G A T C T G T C C
 G G T A C A T C G T G T T G A T A G G T G G C C T C C G A G A T T C T T C T T T
 T T A A C C G G C A A A G T A A A A T A A T C T C A G C T C C A G C C T A A C G
 T C A A T T A T C A G A G A G A G A A A A A A T A T T T T T T T A T G A T T G
 A T C G G A A A C C A A C C G C C T T A C G T G T C G A T C C T G G T T C C T G
 G C C G G C A C G G C G G A G G A A A G C G A C C G A C C T C G C A A C G C C G
 G C G C A C G G C G C C G C C G T G T T G G A C T T G G T C T C C C G C G A C T
 C C G T G G G C C T C G G C T T A T C G C C G C C G C T C C A T C T C A A C C G
 T C C G C T T G G A C A C G T G G A A G T T G A T C C G T C G C G C A C C A G C
 C T C G G A G G T A A C C T A A C T G C C C G T A C T A T A A A T C C G G G A T
 C C G G C C T C T C C A A T C C C C A T C G C C A (配列番号 3 5)

10

【 0 0 6 9 】

実施形態では、ユビキチンプロモーターを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、ユビキチンプロモーターがパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターである。実施形態では、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 3 5 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、9 9 . 8 % または 1 0 0 % 同一であるプロモーターを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、ポリリンカーと作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含む遺伝子発現カセットが提供される。一実施形態では、プロモーターが配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 3 5 からなる。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子の 5 ' 末端と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。

20

30

【 0 0 7 0 】

転写終結および mRNA のポリアデニル化のために、プロモーターに加えて、3 ' - 非翻訳遺伝子領域 (すなわち、3 ' U T R) またはターミネーターが必要である。適切な転写終結および mRNA のポリアデニル化が導入遺伝子の安定な発現にとって重要である。多重遺伝子スタックが次の導入遺伝子への転写リードスルーを回避するために、転写終結がより重要となる。同様に、非ポリアデニル化異常 RNA (a RNA) は、小型 RNA 産生および導入遺伝子サイレンシングにつながる二本鎖 RNA (d s RNA) に a RNA を変換する植物 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (R d R P) にとっての基質となる。そのため、強い転写ターミネーターが、単一遺伝子と複数遺伝子スタックの両方にとって極めて有用である。転写を駆動するためにプロモーターが必要である一方で、3 ' - U T R 遺伝子領域が転写を終結し、翻訳およびタンパク質合成のための得られた mRNA 転写産物のポリアデニル化を開始することができる。3 ' - U T R 遺伝子領域は、導入遺伝子の安定な発現を助ける。

40

【 0 0 7 1 】

一実施形態によると、ユビキチン転写ターミネーターを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、ユビキチン転写ターミネーターがパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virg*

50

atum)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン転写ターミネーターである。実施形態では、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号36と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%または100%同一である転写ターミネーターを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、ポリリンカーと作動可能に連結しているユビキチン転写ターミネーターを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、非ユビキチン導入遺伝子の3'末端と作動可能に連結しているユビキチン転写ターミネーターを含む遺伝子発現カセットが提供される。一実施形態では、転写ターミネーターが配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号36からなる。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン転写ターミネーターを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。一実施形態では、ポリリンカー配列、非ユビキチン導入遺伝子、または両方の組み合わせのいずれかと作動可能に連結している転写ターミネーターを含む核酸ベクターであって、転写ターミネーターが配列番号36または配列番号36と90%の配列同一性を有する配列を含む核酸ベクターが提供される。一実施形態では、転写ターミネーターが長さ1 kb未満であり、さらなる実施形態では、転写ターミネーターが配列番号36の3'UTR配列からなる。

10

20

30

40

50

【0072】

実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと3'-UTRとを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、核酸構築物がユビキチン3'-UTRを含む。実施形態では、ユビキチン3'-UTRがパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン3'-UTRである。実施形態では、3'-UTRがミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン1C (Ubi1C) 3'-UTRであり得る。

G T T T G T C A A A A A C T G G C C C T A C A G T C T G C T G C C C C C T G T T G G
T C T G C C C C C T T G G A A G T A G T C G T G T C T A T G G T T A T G T G A G A
A G T C G T T G T G T T C T T T C T A A T C C C G T A C T G T T T G T G T G A A
C A T C T G C T G C T G T C G T A T T G C A T C G T G A A G A A T C C T G T T A
T G A A T A A G T G A A C A T G A A C C T T G T T C T G T G A T T A C G G C T T
C G T G G T T A T G C G A A C G T T C T T A C A A A C G C A A T T G C A C C T G
A T G T A A A A T C G T T T T T G C T A G C T G T A T G G A A C A A G T G C T C
A T G A T G T T C A T G C A A G A T G C A A T T C C A G C T T T T G T T G G T T
T G T C A T C T T T G T A C T G T G C T T A C C G C A C A T A A A G A T T G C A
T C T T G C T T A T T G C T T T G T T G C T T T G G T G C T C G T C C G C T T C
T C C T T G C A C C T T A T C A A A C C T T T G T T T A G A T T C T C T T C T T
A T A G C A C T T G G T A A C T C T C A G C T T T A C A A C G C C A G T A C T G
T T T C T G A A A T T T C A T G A C T G A T A A A G C T G A T A G A T G G A G T
A C T A A T A T A T G A C A T C T T T C C A T A A A T G T T C G G G T G C A G A
G A T A T G G A G G C C C C A G G A T C C T A T T T A C A G G A T G A A C C T A
C C T G G G C C G C T G T A C G C A T G A C A T C C G C G A G C A A G T C T G A
G G T T C T C A A T G T A C A C A T G A A A T T G A T T T T T G C T G C G T T T
G G C T T G G C T G A T C G T T G C A T T T G T T C T G A T T C A T C A G A G T
T A A A T A A C G G A T A T A T C A G C A A A T A T C C G C A G C A T C C A C A
C C G A C C A C A C G T C C G G T T A A C A G A G T C C C C C T G C C T T G C T
T T A A T T A T T A C G G A G T A C T C C G C T A T T A A T C C T T A G A T A T
G T T T C G A A G G A A C T C A A A C C T T C C T C C A T C T G C A A A T C T C
A G T G C T T C A A A A C T G G A A T T A G A T A A T T G A A A C C T T C A T T
C G G T T G C A A T T C A C A A C T G C A A A T T G A A C A G C A C T G T C A A

TTTCAATTTCGGGTTTCACGATTCCACCGATAGGTTTGACAT
GATCCATGATCCACCCATTGTACAAC (配列番号4)

実施形態では、3' - UTRがミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン1 (Ubi1) 3' - UTRであり得る。

GCTTCTGCCGAACCTGGTTTCACAGTCTGCTGCCCTTGGTTGG
TCTGCCCCCTTAGTGGTTCATGCCCTTTTGTATTGTGTCTTGC
GTCCCAATCCTGTATCGTTTGTGTGAACATCTCTGCTGCT
GTATAGCAGCTTGAATCCTGTATTGAATTTGTGAACCTGA
ACCTTGTTCCTGTGAATCATGTTATGAATAAGTGAACCTGA
ACCTTGTTCCTGTGATTATTGTTTACAATCTGTTGTGCCGTA
TGGTTGGTTCGTGTGTGATTATTGTTTGAACCTGGAGAACCAA
GTTTCGTTCCAGGACATATTGCAACCTAAGCTAAACCATGT
AGAACTACTTGTTCCTGGGAGACATAAAACGTCATTTTAT
GCATTCGTAAACATTTAAGCATACTACAATAATTGTATTGT
CCTTTTCTCTACTCATCCTTGAAACCATATGCCCTCTTCTCA
GCGCCTCTACATGCAGTGTGCTCAGAACAAACAGGCCCTG
CCAGCTGCTTTTCAATTTTCCAATTAATAACCACAATAGT
CGGACTATGGCATCTGTGGGTGACTATGCAAGATGTTGCT
GTCAGGTCTCTGAAACCTTTTCCCATGTATCTGTTGAAATT
ACCCAGTAAATTCATGCCCTCTATTTAATCTGGCATGGTTG
ATTTTCAAAACAGAAATGTGTTTGTGTTTGTGTTCTGGAAGCTA
TATTGGTAAATAAATACAAAGCTGGAGTGTGATTATATTT
CCAACAGATATTCAAGAAATCTCAGTTGATTATTTACT
ACTGTAGTATATATATATATCTTACAGTTGACTTCTCATTA
TTTCAAACGACATGTGAGCACATTTGTTTCAGTTTCTTAGGA
TGTGTTGTGTGCTCAAAAGGTGTAAATTTTGCATTCCTGCCCT
CCGAGTAAACACTACACGTATTTTGTGAGTGGCAGTGCA
TTTGATTACAAGGCAACAAACAAACAAACAAACCTATGGCAAGA
TATCCTTCTTAGAGGCTGCCAGGATCATTTTGTACTGAACCT
ATGTAAGGCTGAAGAAAGAGG (配列番号5)

実施形態では、3' - UTRがアワ (*Setaria italica*) ユビキチン2 (Ubi2) 3' - UTRであり得る。

GCCCATCGGTCATGGATGCTTCTACTGTACCTGGGGTCTCTC
TGGTCTCTGCTGTGTACCTTTGAAGTACCTGTGTCTGGG
ATTGTGTTTGGTTCATGAACCTGCAGTTTGTCTTTGATGTTT
TTTTGTCTGGTCTTATGAACCTGGTTGTATCTGTATGTTTA
CTGTAAACTGTTGTGCGGTGCAGCAGTATGGCATCCGAA
TGAATAAATGATGTTTGGACTTAATACTGTACTCTGTTTG
TTTTTCGGTTATGCCAGTTCTATATTGCCCTGAGATCAGAA
GTTTAGCTTTTGAAGTTCTGTTTGGCTTGTGGTCTGACTCCT
GTTTCTTACTTGAAGGCGTAACCTCTGTTCTGGCAAACTCAA
ATGTCCTAACTGAATGTTTGAAGACTTAATTGTTGGACAGA
TTAACGTGTTTGGTTTGTCTTAGATTGTGATTCTGGGAAGG
CTTGTTAGTTGTGGAATCAAGGAGAGCAGCTAGGTCTGTG
CAGAACGTATTTTGGATTTAAGCCTTCTCAGATTATGCC
ATTACTCTAAACCTAATGATATCATATTTCACTCGGGGAT
GTTGGAGTAGTCTTTTCTTTCTCCTGCAGACAAATGATT
TTGCTTTCTGTGTGTGTACATGATTTTGTGCAACTGTTGCA
ACAACCTGAAGTAGACAAGTTTGTACCTCACCAAGAAATG
AAAAAGATTTTGGAAATTTGTTACATCGACAAACCATTTGTA

ACTTGGCCCCATCAGAAATGCACAGAAAGAGCGGGCTACAAATTT
GACATGCGTTTGCAAACTTTTGCAATAGTTTGATGCACATGTTT
TGCCATTGCGCTGCCAGTCTTAGGAAAAGTGTGTGGTTTCGA
GAAATCTAAGCATATGTGCTCTGCTCACATTTGCGTGGAAAC
CCACACAGCTTTTGTCCACACTCTTGTCCACTCCAGAAAGTCA
TTCCTGGCGCTGTTTACCCCTGGTAAAGGTAAACCGAAAAA
CTTCTCAAGGCTGTACCCAAAACTGGAAAGGAATAATTTGGAG
GAAATCTTTTGCTTTTGTATCGGCTCACCTCTTTTC (配列番号6)

実施形態では、3' - UTRがパニウム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) (スイッチグラス) ユビキチン1 3' - UTRであり得る。

10

GCCTAGTGTCTCCTGAGTTGCGCTTTTGTCTGTTATGGTCAAC
CTCTGGTTTAAAGTCTGTGTGAACCTCTCTGCAATTGCGTTGCT
AGTGTCTGGTTGTGGTTGTAAATAAGAAACATGAAGAACAATG
TTGCTGTGGATCACATGACTTTTTTTTTTTTGAACCGGAAGA
TCACATGACTTTTCATGGCTTTAAGTTCTCTGAACCTCTGAAA
TCTGGACCCCTTTTTTAAGCTCTGAACCTCATCATTTCTTGCA
TTTTACATCTGGTGTGTGATCTTATTGATGTGATGCAGTCCCT
GCTGAAATAGTCAATGTAGATTTCATGACTGACTGATTGCG
TTTTATGGTGTGTATGTTGTTAACAAGCTGAAGGTCTGTGTG
GTGTCTTTTCCAGTTAGACGAAGTGTGCTTTATTGTAGCGT
GTAGTGTCTGCTGGATGATTGATGAACCTGAACAACATTTCTGCA
TTTAGCAAACTAGCGAGCCAAAAGGTGATGACTGAGTTTCTG
TAGACCTGTTTTTTTTATGCCCATGGTCTCTTCAATTGCG
ACTTGTATTTTTCACATTTAGCTGGATCATATAATCTGAGCAGAC
TACTCAAAAAGTACAAAAGTTTCATCTTCGCTATGACGCTTTTG
CCACTAGGATTTTCTTTGTATGATTTGTTTTACAAAATCCTG
TAATCTAGTCAAAAAGAAAAAGCCAAAAATTTTCTTTGTATG
ATTTGTTTTACAAAATCCTCTAATCTAGTCAAAAAGAAAAAGCCA
AATTTATCCTCTCCTGGTCCCTACATCACGTAAGCTATGTG
GCCCGCAAGCAGATGAAAAGCAGCCCGCTCAGCCGACGCGCG
ACGCGGACGCGCAACACATCCTGCTCCTCCTCGCGCGCGCG
CGGCGCGCGGCGAGGCGCGCACCGCGCGCTGCCCGGTGGCGCG
AGGCACACGGTGGCGGCACTGGCGCGCGCGCGCGGTGGCGCGCAG
GCACACGGTGGCGGCACTGGCGCGCGCGCTCCCTTCCGGGCAT
TGCCGGACGGCTGGGCTACTGTCCCGCGCGCGCTTCCCAAT
(配列番号36)

20

30

40

50

【0073】

実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号36と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%または100%同一である3' - UTRとを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、3' - UTRとを含む核酸構築物であって、ユビキチンプロモーターおよび3' - UTRが共にポリリンカーの逆末端と作動可能に連結している、核酸構築物が提供される。実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、3' - UTRとを含む遺伝子発現カセットであって、ユビキチンプロモーターおよび3' - UTRが共に非ユビキチン導入遺伝子の逆末端と作動可能に連結している、遺伝子発現カセットが提供される。一実施形態では、3' - UTRが配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号36からなる。一実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、3' - UTRとを含む遺伝子発現カセットであって、ユビキチンプロモーターが配列番号35を含み、3' - UTRが配列番号3

6を含み、プロモーターおよび3'-UTRが非ユビキチン導入遺伝子の逆末端と作動可能に連結している、遺伝子発現カセットが提供される。一実施形態では、3'-UTRが配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号36からなる。一実施形態では、プロモーターが配列番号35、39または40からなり、3'-UTRが配列番号36からなる。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン3'-UTRを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。さらなる実施形態では、導入遺伝子が、パニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) から単離された同じユビキチン遺伝子からのユビキチンプロモーターおよび3'-UTRと作動可能に連結している。

10

【0074】

一実施形態では、第1の導入遺伝子および/またはポリリンカーと、第2の導入遺伝子および/またはポリリンカーとを含むベクターであって、第1の導入遺伝子および/またはポリリンカーが配列番号1、配列番号2、配列番号3および配列番号35からなる群から選択される配列を含むプロモーターと作動可能に連結しており、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号36からなる群から選択される配列を含む3'-UTRと作動可能に連結しており、第2の導入遺伝子および/またはポリリンカーが配列番号1、配列番号2、配列番号3および配列番号35からなる群から選択される配列を含むプロモーターと作動可能に連結しており、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号36からなる群から選択される配列を含む3'-UTRと作動可能に連結しており、さらに第1の導入遺伝子および/またはポリリンカーならびに第2の導入遺伝子および/またはポリリンカーのプロモーターが異なる植物種のUbi遺伝子に由来する、ベクターが提供される。さらなる実施形態では、第3の導入遺伝子および/またはポリリンカーを含むベクターであって、第3の導入遺伝子および/またはポリリンカーが配列番号1、配列番号2、配列番号3および配列番号35からなる群から選択される配列を含むプロモーターと作動可能に連結しており、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号36からなる群から選択される配列を含む3'-UTRと作動可能に連結しており、さらに第3の導入遺伝子および/またはポリリンカーのプロモーターが、第1および第2の導入遺伝子および/またはポリリンカーのプロモーターとは異なる植物種のUbi遺伝子に由来する、ベクターが提供される。

20

30

【0075】

導入遺伝子発現を、プロモーター配列の下流に位置するイントロン領域によって調節することもできる。プロモーターとイントロンの両方が導入遺伝子発現を調節することができる。転写を駆動するためにプロモーターが必要である一方で、イントロンの存在によって、翻訳およびタンパク質合成のためのmRNA転写産物をもたらす発現レベルを増加させることができる。イントロン遺伝子領域は導入遺伝子の安定な発現を助ける。

【0076】

実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、イントロンとを含む核酸構築物が提供される。一実施形態では、イントロンがプロモーターの3'末端と作動可能に連結している。実施形態では、パニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) から単離したユビキチンプロモーターまたはこのようなプロモーター配列の誘導体の3'末端と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、ユビキチンイントロンがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンイントロン、またはこのようなイントロン配列の誘導体である。

40

【0077】

実施形態では、イントロンがミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチ

50

ン 1 C イントロンであり得る。

G T A T G C A G C C T C G C T T C C T C C T C G C T A C C G T T T C A A T T C T
G G A G T A G G T C G T A G A G G A T A C C A T G T T G A T T T G A C A G A G G
G A G T A G A T T A G A T A C T T G T A G A T C G A A G T G C G G A T G T T C C
A T G G T A G A T G A T A C C A T G T T G A T T T C G A T T A G A T C G G A T T
A A A T C T T T G T A G A T C G A A G T G C G C A T G T T C C A T G A A T T G C
C T G T T A C C A G T A G A T T C A A G T T T T T C T G T G T T A T A G A G G T
G G G A T C T A C T C G T T G A G A T G A T T A G C T C C T A G A G G A C A C C
A T G C C G T T T T G G A A A A T A G A T C A G A A C C G T G T A G A T C G A T
G T G A G C A T G T G T T C C T G T A G A T C C A A G T T C T T T C G C A T G T
T A C T A G T T G T G A T C T A T T G T T T G T G T A A T A C G C T C T C G A T
C T A T C C G T G T A G A T T T C A C T C G A T T A C T G T T A C T G T G G C T
T G A T C G T T C A T A G T T G T T C G T T A G G T T T G A T C G A A C A G T G
T C T G A A C C T A A T T G G A T A T G T A T T C T T G A T C T A T C A A C G T
G T A G G T T T C A G T C A T G T A T T T A T G T A C T C C C T C C G T C C C A
A A T T A A C T G A C G T G G A T T T T G T A T A A G A A T C T A T A C A A A T
C C A T G T C A G T T A A T T C G G G A T G G A G T A C C A T A T T C A A T A A
T T T G T T T A T T G C T G T C C A C T T A T G T A C C A T A T G T T T G T T G
T T C C T C A T G T G G A T T C T A C T A A T T A T C A T T G A T T G G T G A T
C T T C T A T T T T G C T A G T T T C C T A G C T C A A T C T G G T T A T T C A
T G T A G A T G T G T T G T T G A A A T C G G A G A C C A T G C T T G T T A T T
A G A T A G T T T A T T G C T T A T C A G T T T C A T G T T C T G G T T G A T G
C A A C A C A T A T T C A T G T T C G C T A T C T G G T T G C T G C T T G A T A
T T C T C T G A T T T A C A T T C A T T A T A A G A A T A T A T T C T G C T C T
G G T T G T T G C T T C T C A T G A C T T T A C C T A C T C G G T A G G T G A C
T T A C C T T T T G G T T T A C A A T T G T C A A C T A T G C A G (配列番号 7)

実施形態では、イントロンがミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン
1 (U b i 1) イントロンであり得る。

G T A T G T A G C C T C T C G A T T C C T C C T C A G C C C T G C C C T C G A T
T T G G T G T A C G C G T T G A G A T G A T G A T C T C G T A G A T G T C T A G
A T G A C A C C A T G T C G A T T T G A A A T A G A T C A G A T C C G T G T A G
A T C G A T G A G C T C C T G T G T A C C T G T G G A T T C A A G T T A T T T T
C G C A T G C T A T T G T T G T G A T C T A C T A G A T C T A G T G T G T G T A
T T C T A T G C T A T C G A T T T C T C C G T G T A G A T T T C A C T C G A T T
A C T G T T A C T G T G G C T T G A T C G G C C A T A G A T G T T G G T T A A G
G T T T G A T C G G T T A G T G T T T G A A C C T G C G T G G A T A T C T A G C
A T C C A T C T A T T A T C G T G T A G G T T T C G A A C A A A C A A G C A C T
A T T A T T G T A C T G A T G G T T C G T C T A T G G T T G G T T T T G A C C G
T T T T A G T G T T G A A C G A G C C T T C T G T A T T T G T T T A T T G C T G
T C C A G T G A T G T A C C A T G T T C G T T G A G T G T C G G A T T A T A C T
A A T T A T T G T T G A T T G A T A A T C T T G T A G T T T G C T T T T C C T A
A T T T A T T T A T C G T A G T C C T G A T T T G C C T C A G C T G T G C C T C
A C C C G T G C G A T G G T C A A T C A A C T T G T T A G C C C A A T C T G C T
T A A T C A T G T A C A T T T G T T G T T A G A A T C A G A G A T C A A G C C A
A T T A G C T A T C T T A T T G C T T A T C T G T T C C A T G T T C T G A T C G
A T G T A A C A G T C T A C A C T T T T G C T C T G T G C T A C T T G A T T A A
A A C A T T C T G A C T T A A A T T C A T G A T T G G A A G T T T C A G A T C T
G A T T G T T G C C T T A C T T G A C T A A T A T C T A T T C A T G T G A C A C
C T C T C T G T C T T G G T A A C T T A C C G C T G T T T G T T T G T A A T T T
C T G A C T A T G C A G (配列番号 8)

10

20

30

40

50

実施形態では、イントロンがアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 (U b i 2) イントロン 1 であり得る。

G T C A C G G G T T C C T T C C C C A C C T C T C C T C T T C C C C A C C G C C
A T A A A T A G (配列番号 9)

実施形態では、イントロンがアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 (U b i 2) イントロン 2 であり得る。

G T A C G G C G A T C G T C T T C C T C C T C T A G A T C G G C G T G A T C T G
C A A G T A G T T G A T T T G G T A G A T G G T T A G G A T C T G T G C A C T G
A A G A A A T C A T G T T A G A T C C G C G A T G T T T C T G T T C G T A G A T
G G C T G G G A G G T G G A A T T T T T G T G T A G A T C T G A T A T G T T C T 10
C C T G T T T A T C T T G T C A C G C T C C T G C G A T T T G T G G G G A T T T
T A G G T C G T T G A T C T G G G A A T C G T G G G G T T G C T T C T A G G C T
G T T C G T A G A T G A G G T C G T T C T C A C G G T T T A C T G G A T C A T T
G C C T A G T A G A T C A G C T C G G G C T T T C G T C T T T G T A T A T G G T
G C C C A T A C T T G C A T C T A T G A T C T G G T T C C G T G G T G T T A C C
T A G G T T T C T G C G C C T G A T T C G T C C G A T C G A T T T T G T T A G C
A T G T G G T A A A C G T T T G G T C A T G G T C T G A T T T A G A T T A G A G
T C G A A T A G G A T G A T C T C G A T C T A G C T C T T G G G A T T A A T A T
G C A T G T G T C A C C A A T C T G T T C C G T G G T T A A G A T G A T G A A T
C T A T G C T T A G T T A A T G G G T G T A G A T A T A T A T G C T G C T G T T 20
C C T C A A T G A T G C C G T A G C T T T T A C C T G A G C A G C A T G G A T C
C T C C T G T T A C T T A G G T A G A T G C A C A T G C T T A T A G A T C A A G
A T A T G T A C T G C T A C T G T T G G A A T T C T T T A G T A T A C C T G A T
G A T C A T C C A T G C T C T T G T T A C T T G T T T T G G T A T A C T T G G A
T G A T G G C A T G C T G C T G C T T T T T G T T G A T T T G A G C C C A T C C
A T A T C T G C A T A T G T C A C A T G A T T A A G A T G A T T A C G C T G T T
T C T G T A T G A T G C C A T A G C T T T T A T G T G A G C A A C A T G C A T C
C T C C T G G T T A T A T G C A T T A A T A G A T G G A A G A T A T C T A T T G
C T A C A A T T T G A T G A T T A T T T T G T A C A T A C G A T G A T C A A G C
A T G C T C T T C A T A C T T T G T T G A T A T A C T T G G A T A A T G A A A T 30
G C T G C T G C A C G T T C A T T C T A T A G C A C T A A T G A T G T G A T G A
A C A C G C A C G A C C T G T T T G T G G C A T C T G T T T G A A T G T G T T G
T T G C T G T T C A C T A G A G A C T G T T T T A T T A A C C T A C T G C T A G
A T A C T T A C C C T T C T G T C T G T T T A T T C T T T T G C A G (配列番号 1
0)

実施形態では、イントロンがパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) (スイッチグラス) ユビキチンイントロンであり得る。

G T A C T C C T A C C T A A T C C T C C T T A A C T G A T C T C T C C T C T A T
C A C G T T G G T A A T C T T C G A A T G A T C T G C T G C C T G G C T C G C T
G T T C C C C C T C G T T A T G C A C T G T T T C C A T C A C G A G T T T T T T 40
T T T T C A T C A T C T A A T C T A T G C G G T T G C G G A A G A A T T G T G G
C T A G T G G A G T A G T T T T C T G T G C T T G A T C G G T A G A T T C G A T
G T G T G G G T G T A T G G A T G T T T T C T G A A A A G T T G C T G G A T T A
G T T T A C G C T T T C A G G C C G C A G G T C T G T T C G A A A T T G A T T A
T G A A G T C T A T A T G C T T T G G A T C T A T C G A T T T C C A G T T T T A
T T C A G A T G T A G G C C A A A A A A T T G T C G G C A T T T G T G T G G A A
T T A G T T G G C C T T T A G G T C T G C A C A T T C A T G G T G A C G G C A C
A G T T G C T G C T G G C T G T T G C G T G G G A C G A G T T A T T A T A G T T
G T T T T T G T T T T T C C C T G A T T G A T T C A C A T T T T C A A T G A T A
A C T A G C C T T T G T C A C C T A A C C A A G T C C A G G T T G A T C C T A T 50

CTGTGTTCTTTCAGCTACCCAGTTTTCATAGATGATGGTGTAT
TTCGATTGCTTTTAGTAGGCCCTTCTGATTTTCACATCTAATT
CTGTCATGAATATAGATAACTTTTACATGCTTTTGTATATAC
TTTATATTTGAACCTGTTTCACTGTCCAGCCCTATTTTGGATA
ATTGAGTGCATTTGGCTTTTGTATGCCCTGAATTATTCACATG
TTCCTGGATAATTGACCTGTGTTCACCTAGTTTGACTGTTTT
TTGAGGTGCCACCCGTCCTGTTCAGCTGATTTGTGTATTTCG
ATTGCTCTAGTTAATCTTTTGTATTATGCAGCTAGTGCCTTT
GTCATATGTAGCTTTTATAGGCTTCTGTATGTCCTTTGGATA
AGTTTCAGTCTACTTTGTCAAGTTTGCTTTTACAAGTAGTAGCT
CTGATTTCTATTTGGCTTTCCTGAGTTCAGAGCTTTTGCAAAAT
GCTTTGTTGTTACATTACATCATATTACTTTGAATTGCAGTT
ATTTAATGGTTTGGATTGTTGCTGTTTACTTCTACATTTTT
TGCTGTTTTTATATTATATACTAAATGTTTTGTGTTGCTGCTT
TTCAG (配列番号 37)

10

【0078】

実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 または配列番号 37 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一であるイントロンとを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、イントロン配列と、ポリリンカーとを含む核酸構築物であって、プロモーターおよびイントロンがポリリンカーと作動可能に連結している、核酸構築物が提供される。実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、イントロン配列と、非ユビキチン導入遺伝子とを含む遺伝子発現カセットであって、プロモーターおよびイントロンが導入遺伝子の 5' 末端と作動可能に連結している、遺伝子発現カセットが提供される。場合により、構築物が非ユビキチン導入遺伝子の 3' 末端またはポリリンカーと作動可能に連結している 3' - UTR をさらに含む。一実施形態では、プロモーターおよび 3' - UTR 配列が本明細書に記載されるものから選択され、イントロン配列が配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 または配列番号 37 からなる。実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含み、プロモーターがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーター、または植物 (例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーター)、ウイルス (例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター) もしくは細菌 (例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) *delta mas*) に由来するプロモーターである。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。

20

30

40

【0079】

導入遺伝子発現を、プロモーター配列の下流に位置する 5' - UTR 領域によって調節することもできる。プロモーターと 5' - UTR の両方が導入遺伝子発現を調節することができる。転写を駆動するためにプロモーターが必要である一方で、5' - UTR の存在によって、翻訳およびタンパク質合成のための mRNA 転写産物をもたらす発現レベルを増加させることができる。5' - UTR 遺伝子領域は導入遺伝子の安定な発現を助ける。

【0080】

実施形態では、本明細書に記載されるユビキチンプロモーターと、5' - UTR とを含む核酸構築物が提供される。一実施形態では、5' - UTR がプロモーターの 3' 末端と作動可能に連結している。実施形態では、パニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)

50

、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) から単離されたユビキチンプロモーターまたはこのようなプロモーター配列の誘導体の 3' 末端と作動可能に連結しているユビキチン 5' - UTR を含む核酸構築物が提供される。さらなる実施形態では、5' - UTR の 3' 末端が、本明細書に記載されるパニウム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) のユビキチンイントロンの 5' 末端と作動可能に連結している。

【 0 0 8 1 】

実施形態では、5' - UTR がミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 C (U b i 1 C) 5' - UTR であり得る。

10

CCGATCGA A A A G T C C C C G C A A G A G C A A G C G A C C G A T C T C G
T G A A T C T C C G T C A A G (配列番号 1 1)

【 0 0 8 2 】

実施形態では、5' - UTR がミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン 1 (U b i 1) 5' - UTR であり得る。

C C A A T C C A G C A C C C C C G A T C C C G A T C G A A A A T T C T C C G C A
A C A G C A A G C G A T C G A T C T A G C G A A T C C C C G T C A A G (配列番号
1 2)

【 0 0 8 3 】

実施形態では、5' - UTR がアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 (U b i 2) 5' - UTR 1 であり得る。

20

A G A A A T A T C A A C T G G T G G G C C A C G C A C A T C A G C G T C G T G T
A A C G T G G A C G G A G G A G C C C C G T G A C G G C G T C G A C A T C G A A
C G G C C A C C A A C C A C G G A A C C A C C C G T C C C C A C C T C T C G G A
A G C T C C G C T C C A C G G C G T C G A C A T C T A A C G G C T A C C A G C A
G G C G T A C G G G T T G G A G T G G A C T C C T T G C C T C T T T G C G C T G
G C G G C T T C C G G A A A T T G C G T G G C G G A G A C G A G G C G G G C T C
G T C T C A C A C G G C A C G G A A G A C (配列番号 1 3)

【 0 0 8 4 】

実施形態では、5' - UTR がアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 2 (U b i 2) 5' - UTR 2 であり得る。

30

C C G A C C C C C T C G C C T T T C T C C C C A A T C T C A T C T C G T C T C G
T G T T G T T C G G A G C A C A C C A C C C G C C C C A A A T C G T T C T T C C
C G C A A G C C T C G G C G A T C C T T C A C C C G C T T C A A G (配列番号 1 4
)

【 0 0 8 5 】

実施形態では、5' - UTR がパニウム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) (スイッチグラス) ユビキチン 5' - UTR であり得る。

40

C A A G T T C G C G A T C T C T C G A T T T C A C A A A T C G C C G A G A A G A
C C C G A G C A G A G A A G T T C C C T C C G A T C G C C T T G C C A A G (配列
番号 3 8) 。

【 0 0 8 6 】

実施形態では、本明細書に開示されるユビキチンプロモーターと、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4 または配列番号 3 8 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、9 9 . 8 % または 1 0 0 % 同一である 5' - UTR とを含む核酸構築物が提供される。実施形態では、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 3 5 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、9 9 . 8 % または 1 0 0 % 同一であるユビキチンプロモーターと、ポリリンカーと作動可能に連結している 5' - UTR とを含む核酸構

50

築物が提供される。実施形態では、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 35 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一であるユビキチンプロモーターと、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結している 5' - UTR とを含む遺伝子発現カセットが提供される。場合により、構築物が 5' - UTR の 3' 末端および非ユビキチン導入遺伝子の 5' 末端と作動可能に連結しており、場合により非ユビキチン導入遺伝子の 3' 末端と作動可能に連結している 3' - UTR をさらに含む本明細書に開示されるユビキチンイントロンをさらに含むことができる。一実施形態では、プロモーター、イントロンおよび 3' - UTR 配列が本明細書に記載されるものから選択され、5' - UTR 配列が配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14 または配列番号 38 からなる。一実施形態では、3' - UTR が配列番号 38 からなる。

10

【0087】

実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと作動可能に連結しているユビキチン 5' - UTR を含み、プロモーターがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーター、または植物 (例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーター)、ウイルス (例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター) もしくは細菌 (例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) *deltamass*) に由来するプロモーターである。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン 5' - UTR を含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。

20

【0088】

一実施形態では、プロモーターと、ポリリンカーと、場合により、以下のエレメント：

- a) 5' 非翻訳領域；
- b) イントロン；および
- c) 3' 非翻訳領域

の 1 つまたは複数とを含む核酸構築物であって、

プロモーターが配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 もしくは配列番号 35 または配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 もしくは配列番号 35 と 98% の配列同一性を有する配列からなり；

30

5' 非翻訳領域が配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14 もしくは配列番号 38 または配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14 もしくは配列番号 38 と 98% の配列同一性を有する配列からなり；

イントロンが配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 もしくは配列番号 37 または配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 もしくは配列番号 37 と 98% の配列同一性を有する配列からなり；

3' 非翻訳領域が配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 もしくは配列番号 36 または配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 もしくは配列番号 36 と 98% の配列同一性を有する配列からなり；

40

さらに前記プロモーターが前記ポリリンカーと作動可能に連結しており、存在する場合、各任意のエレメントもプロモーターとポリリンカーの両方と作動可能に連結している、核酸構築物が提供される。

【0089】

一実施形態では、プロモーターと、非ユビキチン導入遺伝子と、場合により、以下のエレメント：

- a) 5' 非翻訳領域；
- b) イントロン；および
- c) 3' 非翻訳領域

50

の１つまたは複数とを含む核酸構築物であって、

プロモーターが配列番号１、配列番号２、配列番号３もしくは配列番号３５または配列番号１、配列番号２、配列番号３もしくは配列番号３５と９８％の配列同一性を有する配列からなり；

５′非翻訳領域が配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４もしくは配列番号３８または配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４もしくは配列番号３８と９８％の配列同一性を有する配列からなり；

イントロンが配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０もしくは配列番号３７または配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０もしくは配列番号３７と９８％の配列同一性を有する配列からなり；

３′非翻訳領域が配列番号４、配列番号５、配列番号６もしくは配列番号３６または配列番号４、配列番号５、配列番号６もしくは配列番号３６と９８％の配列同一性を有する配列からなり；

さらに前記プロモーターが前記導入遺伝子と作動可能に連結しており、存在する場合、各任意のエLEMENTもプロモーターと導入遺伝子の両方と作動可能に連結している、核酸構築物が提供される。さらなる実施形態では、真上に開示される核酸構築物を含むトランスジェニック細胞が提供される。一実施形態では、トランスジェニック細胞が植物細胞であり、さらなる実施形態では、前記トランスジェニック細胞を含む植物が提供される。

【００９０】

一実施形態によると、導入遺伝子発現が、イントロンおよび５′-UTR領域と作動可能に連結しているプロモーターによって調節され、イントロンおよび５′-UTR領域がプロモーター配列の下流に位置している。イントロンおよび５′-UTR領域と作動可能に連結しているプロモーターを使用して導入遺伝子発現を駆動することができる。転写を駆動するためにプロモーターが必要である一方で、イントロンおよび５′-UTRの存在によって、翻訳およびタンパク質合成のためのmRNA転写産物をもたらす発現レベルを増加させることができる。

【００９１】

実施形態では、遺伝子発現カセットが、５′-UTRおよびイントロン領域と作動可能に連結しているプロモーターを含む。実施形態では、遺伝子発現カセットが、ユビキチン５′-UTRおよびユビキチンイントロンと作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含む。実施形態では、５′-UTRおよびイントロン領域と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターが、イントロンおよび５′-UTRと作動可能に連結しているパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターである。

【００９２】

実施形態では、５′-UTRおよびイントロンと作動可能に連結しているプロモーターが、イントロンおよび５′-UTRと作動可能に連結しているミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン１C (Ubi1C) プロモーターであり得る。一実施形態では、プロモーターが配列番号１５：

CTGCTCGTTTCAGCCCCACAGTAAACACGCCCGTGCGACATGCA
GATGCCCTCCACCCACGCCCGACCAACCCCAAGTCCGCGCCGCG
CTCGTCCACGGCGGCCATCCGCGATCCGCGCGGTCAACGTCTAT
CCGGAGGAGGCGAGCGCGGATGTCTGACGGGCCACGGCGCGCGGTCA
CGGACACGACGGCGGACGGCCCCGACTCCGCGCGCGCGGTCAAA
GGCTGCAGTGGCGTCTGTGGTGGCCGTCTCCGCGCTGCAAGAGA
TCCCCCGCGTGGAGGAGCGCGCCGTCTCCACCCAGCCCCCTATA
TCGAGAAATCAACGGGTGGGCTCTGAGCTCTCTCAGCAACCTCT
CCCCACCCCCCTTCCGACCAACGCTCTCCCTTCCCCCGTGGCC
CTCTTCTCCGTAACCCGAGCGCGCGAGAGAACAAACCAAC
GAAAGGGCGAGAGAGATCGCCATAAGAGAGAGAGATGGGCGG

A G G C G G A T A G T T T C A G C C A T T C A C G G A G A A A T G G G G A G G A
 G A G A A C A C G A C A T C A T A C G G A C G C G A C C C T C T A G C T G G C T
 G G C T G T C C T A A A G A A T C G A A C G G A A T C G C T G C G C C A G G A G
 A A A A C G A A C G G T C C T G A A G C A T G T G C G C C C G G T T C T T C C A
 A A A C A C T T A T C T T T A A G A T T G A A G T A G T A T A T A T G A C T G A
 A A T T T T T A C A A G G T T T T T C C C C A T A A A A C A G G T G A G C T T A
 T C T C A T C C T T T T G T T T A G G A T G T A C G T A T T A T A T A T G A C T
 G A A T A T T T T T T A T T T T C A T T G A A T G A A G A T T T T T C G A C C C C
 C C A A A A A T A A A A A A C G G A G G G A G T A C C T T T T G T G C C G T G T A
 T A T G G A C T A G A G C C A T C G G G A C G T T T C C G G A G A C T G C G T G
 G T G G G G G C G A T G G A C G C A C A A C G A C C G C A T T T T C G G T T G C
 C G A C T C G C C G T T C G C A T C T G G T A G G C A C G A C T C G T C G G G T
 T C G G C T C T T G C G T G A G C C G T G A C G T A A C A G A C C C G T T C T C
 T T C C C C C G T C T G G C C A T C C A T A A A T C C C C C C T C C A T C G G C
 T T C C C T T T C C T C A A T C C A G C A C C C T G A T T C C G A T C G A A A A
 G T C C C C G C A A G A G C A A G C G A C C G A T C T C G T G A A T C T C C G T
 C A A G G T A T G C A G C C T C G C T T C C T C C T C G C T A C C G T T T C A A
 T T C T G G A G T A G G T C G T A G A G G A T A C C A T G T T G A T T T G A C A
 G A G G G A G T A G A T T A G A T A C T T G T A G A T C G A A G T G C G G A T G
 T T C C A T G G T A G A T G A T A C C A T G T T G A T T T C G A T T A G A T C G
 G A T T A A A T C T T T G T A G A T C G A A G T G C G C A T G T T C C A T G A A
 T T G C C T G T T A C C A G T A G A T T C A A G T T T T T C T G T G T T A T A G
 A G G T G G G A T C T A C T C G T T G A G A T G A T T A G C T C C T A G A G G A
 C A C C A T G C C G T T T T G G A A A A T A G A T C A G A A C C G T G T A G A T
 C G A T G T G A G C A T G T G T T C C T G T A G A T C C A A G T T C T T T C G C
 A T G T T A C T A G T T G T G A T C T A T T G T T T G T G T A A T A C G C T C T
 C G A T C T A T C C G T G T A G A T T T C A C T C G A T T A C T G T T A C T G T
 G G C T T G A T C G T T C A T A G T T G T T C G T T A G G T T T G A T C G A A C
 A G T G T C T G A A C C T A A T T G G A T A T G T A T T C T T G A T C T A T C A
 A C G T G T A G G T T T C A G T C A T G T A T T T A T G T A C T C C C T C C G T
 C C C A A A T T A A C T G A C G T G G A T T T T G T A T A A G A A T C T A T A C
 A A A T C C A T G T C A G T T A A T T C G G G A T G G A G T A C C A T A T T C A
 A T A A T T T G T T T A T T G C T G T C C A C T T A T G T A C C A T A T G T T T
 G T T G T T C C T C A T G T G G A T T C T A C T A A T T A T C A T T G A T T G G
 T G A T C T T C T A T T T T G C T A G T T T C C T A G C T C A A T C T G G T T A
 T T C A T G T A G A T G T G T T G T T G A A A T C G G A G A C C A T G C T T G T
 T A T T A G A T A G T T T A T T G C T T A T C A G T T T C A T G T T C T G G T T
 G A T G C A A C A C A T A T T C A T G T T C G C T A T C T G G T T G C T G C T T
 G A T A T T C T C T G A T T T A C A T T C A T T A T A A G A A T A T A T T C T G
 C T C T G G T T G T T G C T T C T C A T G A C T T T A C C T A C T C G G T A G G
 T G A C T T A C C T T T T G G T T T A C A A T T G T C A A C T A T G C A G (配列
 番号 1 5)

の配列を含むまたはからなる。

【 0 0 9 3 】

実施形態では、5' - UTRおよびイントロンと作動可能に連結しているプロモーターが、5' - UTRおよびイントロンと作動可能に連結しているミナトカモジグサ (Brachypodium distachyon) ユビキチン 1 (Ubi1) プロモーターであり得る。一実施形態では、プロモーターが配列番号 1 6 :

G G C G T C A G G A C T G G C G A A G T C T G G A C T C T G C A G G G C C G A A
 C T G C T G A A G A C G A A G C A G A G G A A G A G A A A G G G A A G T G T T C

G A C T T G T A A T T T G T A G G G G T T T T T T T A G A G G A A C T T G T A
 A T T T G T A G G T G G G C T G G C C T C G T T G G A A A A C G A T G C T G G
 C T G G T T G G G C T G G G C C G A T G T A C G C T T G C A A A C A A C T T G T
 G G C G G C C C G T T C T G G A C G A G C A G G A G T T T C T T T T T T G T T C
 T C A C T T T T C T G G T C T T C T T T A G T T A C G G A G T A C C T T T T G T
 T T T T T A A A G G A G T T A C C T T T T T T T A G G A A T T C T T T A G T T
 A C C T T T C G C T T G C T C T C A A A A A A T A T T T A A C T T T C G C T T T
 T T T T C A T T T T A A T T T T T G C A A C T A T T T A C G A G T T T C A T G A
 A T G C T T A T T T T C C A G C A T A T C A T T A T T T G C A A G T A T T T T T
 A T G C C G T A T G T A T T G G A C G A G A G C C A T C G G G A C T G T T C C A
 G A G A C T G C G T G G T G G G G A C G G C T C C C A A C C G C C T T T T C T A
 T C T C T G T T C G C A T C C G G T G G C C G A C T T G G C T C G C G C G T G A
 G C C G T G A C G T A A C A G A C T T G G T C T C T T C C C C A T C T G G C C A
 T C T A T A A A T T C C C C C A T C G A T C G A C C C T C C C T T T C C C C A A
 T C C A G C A C C C C C G A T C C C G A T C G A A A A T T C T C C G C A A C A G
 C A A G C G A T C G A T C T A G C G A A T C C C C G T C A A G G T A T G T A G C
 C T C T C G A T T C C T C C T C A G C C C T G C C C T C G A T T T G G T G T A C
 G C G T T G A G A T G A T G A T C T C G T A G A T G T C T A G A T G A C A C C A
 T G T C G A T T T G A A A T A G A T C A G A T C C G T G T A G A T C G A T G A G
 C T C C T G T G T A C C T G T G G A T T C A A G T T A T T T T C G C A T G C T A
 T T G T T G T G A T C T A C T A G A T C T A G T G T G T G T A T T C T A T G C T
 A T C G A T T T C T C C G T G T A G A T T T C A C T C G A T T A C T G T T A C T
 G T G G C T T G A T C G G C C A T A G A T G T T G G T T A A G G T T T G A T C G
 G T T A G T G T T T G A A C C T G C G T G G A T A T C T A G C A T C C A T C T A
 T T A T C G T G T A G G T T T C G A A C A A A C A A G C A C T A T T A T T G T A
 C T G A T G G T T C G T C T A T G G T T G G T T T T G A C C G T T T T A G T G T
 T G A A C G A G C C T T C T G T A T T T G T T T A T T G C T G T C C A G T G A T
 G T A C C A T G T T C G T T G A G T G T C G G A T T A T A C T A A T T A T T G T
 T G A T T G A T A A T C T T G T A G T T T G C T T T T C C T A A T T T A T T T A
 T C G T A G T C C T G A T T T G C C T C A G C T G T G C C T C A C C C G T G C G
 A T G G T C A A T C A A C T T G T T A G C C C A A T C T G C T T A A T C A T G T
 A C A T T T G T T G T T A G A A T C A G A G A T C A A G C C A A T T A G C T A T
 C T T A T T G C T T A T C T G T T C C A T G T T C T G A T C G A T G T A A C A G
 T C T A C A C T T T T G C T C T G T G C T A C T T G A T T A A A A C A T T C T G
 A C T T A A A T T C A T G A T T G G A A G T T T C A G A T C T G A T T G T T G C
 C T T A C T T G A C T A A T A T C T A T T C A T G T G A C A C C T C T C T G T C
 T T G G T A A C T T A C C G C T G T T T G T T T G T A A T T T C T G A C T A T G
 C A G (配列番号 16)

の配列を含むまたはからなる。

【 0094 】

実施形態では、5' - UTRおよびイントロンと作動可能に連結しているプロモーター
 が、5' - UTRおよびイントロンと作動可能に連結しているアワ (*Setaria italica*)
 ユビキチン2 (Ubi2) プロモーターであり得る。一実施形態では、プロモーターが配
 列番号17：

T G C G T C T G G A C G C A C A A G T C A T A G C A T T A T C G G C T A A A A T
 T T C T T A A T T T C T A A A T T A G T C A T A T C G G C T A A G A A A G T G G
 G G A G C A C T A T C A T T T C G T A G A A C A A G A A C A A G G T A T C A T A
 T A T A T A T A T A T A T A A T A T T T A A A C T T T G T T A A G T G G A A
 T C A A A G T G C T A G T A T T A A T G G A G T T T C A T G T G C A T T A A A T
 T T T A T G T C A C A T C A G C A A T T T T G T T G A C T T G G C A A G G T C A

TTTAGGGTGTGTTTGGAAAGACAGGGGCTATTAGGAGTATTA
AAACATAGTCTAATTACAAAACCTAATTGCACAACCGCTAA
GCTGAATCGCGAGATGGATCTATTAAAGCTTAATTAGTCCA
TGATTTTGACAATGTGGTGCTACAATAAACCAATTTGCTAATG
ATGGATTACTTAGGTTTAAATAGATTTCGTCTCGTGATTTTAG
CCTATGGGTTCTGCTATTAAATTTTGTAAATTAGCTCATATT
TAGTTCTTATAAATTAGTATCCGAACATCCAATGTGACATG
CTAAAGTTTTAAACCCCTGGTATCCAAATGAAGTCTTATGAGA
GTTTTCATCACTCCGGTGGTATATGTACTTAGGGCTCCGTTT
TCTTCCACCGACTTATTTTTTAGCACCCGTCACATTTGAATG 10
TTTAGATACTAATTAGAAGTATTAAACGTAGACTATTTAC
AAAATCCATTACATAAGACGAATCTAAACGGCGAGACGA
TCTATTAAACCTAATTAGTCCATGATTTGACAATGTGTTG
CTACAGTAACAATTTGCTAATGATGGATTAAATTAGGGCTTA
ATAGATTTCGTCTCGCCGTTTTAGCCTCCACTTATGTAAATGG
GTTTTCTAAACAATCTACGTTTTAATACTCCTAATTAGTAT
CTAAATATTCAATGTGACACGTGCTAAAAATAAGTCAAGTG
GAAGGAAGAGAAACGTCCCCCTTAGTTTTCCATCTTATTAAT
TGTAACGATGAAACTGTGCAAGCCAGATGATTGACAATCGCA
ATACTTCAACTAGTGGGCCATGCACATCAGCGACGTGTAA 20
CGTCGTGAGTTGCTGTTCCCGTAGAGAAATATCAACTGGT
GGGCCACGCACATCAGCGTCGTGTAAACGTGGACGGAGGAG
CCCCGTGACGGCGTCGACATCGAAACGGCCACCAACCAACGG
AACCAACCCGTCCCCACCTCTCGGAAGCTCCGCTCCACGGC
GTCGACATCTAAACGGCTACCAAGCAGGCGTACGGGGTTGGAG
TGGACTCCTTGCCCTCTTTGCGCTGGCGGGCTTCCGGAAATT
GCGTGGCGGAGACGAGGCGGGCTCGTCTCACACGGCACGG
AAGACGTCACGGGTTCCTTCCCCACCTCTCCTCTTCCCCA
CCGCCATAAATAGCCGACCCCCCTCGCCTTTCTCCCCAATC
TCATCTCGTCTCGTGTGTTGTTGCGGAGCACACCACCCGCCCC 30
AAATCGTTCTTCCCCGCAAGCCTCGGCATCCTTCAACCCGC
TTCAAGGTACGGCGATCGTCTTCTCTCTCTAGATCGGCGT
GATCTGCAAGTAGTTGATTTGGTAGATGGTTAGGATCTGT
GCACTGAAGAAATCATGTTAGATCCGCGATGTTTTCTGTTT
GTAGATGGCTGGGAGGTGGAATTTTTTGTGTAGATCTGATA
TGTTCTCCTGTTTTATCTTGTCAACGCTCCTGCGATTTGTGG
GGATTTTAGGTCGTGATCTGGGAATCGTGGGGTTGCTTC
TAGGCTGTTCGTAGATGAGGTCGTTCACAGGTTTACTGG
ATCATTTGCCCTAGTAGATCAGCTCGGGCTTTCGTCTTTGTA
TATGGTGCCCATACTTGCATCTATGATCTGGTTCCGTGGT 40
GTTACCTAGGTTTTCTGCGCCCTGATTCGTCCGATCGATTTT
GTTAGCATGTGGTAACAAGTTTGGTCAATGGTCTGATTTAGA
TTAGAGTTCGAATAGGATGATCTCGATCTAGCTCTTGGGAT
TAATATGCATGTGTCAACCAATCTGTTCCGTGGTTAAGATG
ATGAATCTATGCTTAGTTAATGGGTGTAGATATATATGCT
GCTGTTCTCTCAATGATGCCGTAGCTTTTACCTGAGCAGCA
TGGATCCTCCTGTTACTTAGGTAGATGCACATGCTTATAG
ATCAAGATATGTACTGCTACTGTTGGAATTTCTTTAGTATA
CCTGATGATCATCCATGCTCTTGTGTTACTTGTTTTGGTATA
CTTGGATGATGGCATGCTGCTGCTTTTTTGTGATTGAGC 50

C C A T C C A T A T C T G C A T A T G T C A C A T G A T T A A G A T G A T T A C
 G C T G T T T C T G T A T G A T G C C A T A G C T T T T A T G T G A G C A A C A
 T G C A T C C T C C T G G T T A T A T G C A T T A A T A G A T G G A A G A T A T
 C T A T T G C T A C A A T T T G A T G A T T A T T T T G T A C A T A C G A T G A
 T C A A G C A T G C T C T T C A T A C T T T G T T G A T A T A C T T G G A T A A
 T G A A A T G C T G C T G C A C G T T C A T T C T A T A G C A C T A A T G A T G
 T G A T G A A C A C G C A C G A C C T G T T T G T G G C A T C T G T T T G A A T
 G T G T T G T T G C T G T T C A C T A G A G A C T G T T T T A T T A A C C T A C
 T G C T A G A T A C T T A C C C T T C T G T C T G T T T A T T C T T T T G C A G
 (配列番号 17)

10

の配列を含むまたはからなる。

【 0095 】

実施形態では、5' - UTRおよびイントロンと作動可能に連結しているプロモーター
 が、5' - UTRおよびイントロンと作動可能に連結しているパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) (スイッチグラス) ユビキチンプロモーターであり得る。一実施形態
 では、プロモーターが配列番号39：

T T G A A T T T T A A T T T C A A A T T T T G C A G G G T A G T A G T G G A C A
 T C A C A A T A C A T A T T T A G A A A A A G T T T T A T A A T T T T C C T C C
 G T T A G T T T T C A T A T A A T T T T G A A C T C C A A C G A T T A A T C T A
 T T A T T A A A T A T C C C G A T C T A T C A A A A T A A T G A T A A A A A T T
 T A T G A T T A A T T T T T C T A A C A T G T G T T A T G G T G T G T A C T A T
 C G T C T T A T A A A A T T T C A A C T T A A A A C T C C A C C T A T A C A T G
 G A G A A A T G A A A A A G A C G A A T T A C A G T A G G G A G T A A T T T G A
 A C C A A A T G G A A T A G T T T G A G G G T A A A A T G A A C T A A A C A A T
 A G T T T A G G A G G T T A T T C A G A T T T T A G T T A T A G T T G A G A G G
 A G T A A T T T A G A C T T T T T C C T A T C T T G A A T T G T T G A C G G C T
 C T C C T A T C G G A T A T C G G A T G G A G T C T T T C A G C C C A A C A T A
 A C T T C A T T C G G G C C C A A A C G T T C G T C C A T C C A G C C T A G G G
 A G A A C A T T T T T G C C C A T G A T A T C T G T T T T T C T T T T T T T C T A
 T T T T C A C T G G T A T T A T A G G A G G G A A A T A T A C A A C G T G T T C
 A C C T T T G G T T T C A T T C T T G T T C C A T C T G A A T T T A T C T A A A
 A C T G T G T T T G A A C T T C G T A A G A A T T T T G T T C G A T C T G T C C
 G G T A C A T C G T G T T G A T A G G T G G C C T C C G A G A T T C T T C T T T
 T T A A C C G G C A A A G T A A A A T A A T C T C A G C T C C A G C C T A A C G
 T C A A T T A T C A G A G A G A G A A A A A A T A T T T T T T T A T G A T T G
 A T C G G A A A C C A A C C G C C T T A C G T G T C G A T C C T G G T T C C T G
 G C C G G C A C G G C G G A G G A A A G C G A C C G A C C T C G C A A C G C C G
 G C G C A C G G C G C C G C C G T G T T G G A C T T G G T C T C C C G C G A C T
 C C G T G G G C C T C G G C T T A T C G C C G C C G C T C C A T C T C A A C C G
 T C C G C T T G G A C A C G T G G A A G T T G A T C C G T C G C G C A C C A G C
 C T C G G A G G T A A C C T A A C T G C C C G T A C T A T A A A T C C G G G A T
 C C G G C C T C T C C A A T C C C C A T C G C C A C A A G T T C G C G A T C T C
 T C G A T T T C A C A A A T C G C C G A G A A G A C C C G A G C A G A G A A G T
 T C C C T C C G A T C G C C T T G C C A A G G T A C T C C T A C C T A A T C C T
 C C T T A A C T G A T C T C T C C T C T A T C A C G T T G G T A A T C T T C G A
 A T G A T C T G C T G C C T G G C T C G C T G T T C C C C C T C G T T A T G C A
 C T G T T T C C A T C A C G A G T T T T T T T T T T C A T C A T C T A A T C T A
 T G C G G T T G C G G A A G A A T T G T G G C T A G T G G A G T A G T T T T C T
 G T G C T T G A T C G G T A G A T T C G A T G T G T G G G T G T A T G G A T G T
 T T T C T G A A A A G T T G C T G G A T T A G T T T A C G C T T T C A G G C C G

20

30

40

50

C A G G T C T G T T C G A A A T T G A T T A T G A A G T C T A T A T G C T T T G
 G A T C T A T C G A T T T C C A G T T T T A T T C A G A T G T A G G C C A A A A
 A A T T G T C G G C A T T T G T G T G G A A T T A G T T G G C C T T T A G G T C
 T G C A C A T T C A T G G T G A C G G C A C A G T T G C T G C T G G C T G T T G
 C G T G G G A C G A G T T A T T A T A G T T G T T T T T G T T T T T C C C T G A
 T T G A T T C A C A T T T T C A A T G A T A A C T A G C C T T T G T C A C C T A
 A C C A A G T C C A G G T T G A T C C T A T C T G T G T T C T T C A G C T A C C
 A G T T T G C A T A G A T G A T G G T G T A T T C G A T T G C T T T A G T A G G
 C C T T C T G A T T T C A C A T C T A A T T C T G T C A T G A A T A T A G A T A
 A C T T T A C A T G C T T T T G A T A T A C T T T A T A T T T G A A C T G T T C
 A C T G T C C A G C C T A T T T T G G A T A A T T G A G T G C A T T G G C T T T
 T G A T G C C T G A A T T A T T C A C A T G T T C C T G G A T A A T T G A C C T
 G T G T C A C C T A G T T G A C T G T T T T T T G A G G T G C C A C C C G T C T
 G T T C A G C T G A T T T G T G T A T T C G A T T G C T C T A G T T A A T C T T
 T T G A T T A T G C A G C T A G T G C T T T G T C A T A T G T A G C T T T A T A
 G G C T T C T G A T G T C C T T G G A T A T A G T T C A G T C T A C T T G T C A
 A G T T G C T T T A C A A G T A G T A G C T C T G A T T C T A T T T G G C T T C
 C T G A G T C A G A G C T T T G C A A A T T G C T T G T T G T T A C A T T A C A
 T C A T A T T A C T T G A A T T G C A G T T A T T T A A T G G T T G G A T T G T
 T G C T G T T T A C T T C T A C A T T T T T T G C T G T T T T A T A T T A T A C
 T A A A A T G T T T G T G T T G C T G C T T T T C A G (配列番号 3 9)

の配列を含むまたはからなる。

【 0 0 9 6 】

実施形態では、イントロンおよび 5' - UTR と作動可能に連結しているプロモーター
 を含む核酸構築物が提供される。一実施形態では、構築物が、配列番号 1 5、配列番号 1
 6、配列番号 1 7 または配列番号 3 9 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9
 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、9 9 .
 8 % または 1 0 0 % 同一である配列を含む。一実施形態では、ポリリンカーと作動可能に
 連結している配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7 または配列番号 3 9 と少なくと
 も 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %
 、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、9 9 . 8 % または 1 0 0 % 同一である配列を含むまたは
 からなるユビキチンプロモーター配列を含む核酸構築物が提供される。場合により、構築
 物がポリリンカーの 3' 末端と作動可能に連結している 3' - UTR をさらに含むことが
 できる。実施形態では、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結している配列番号 1 5
 、配列番号 1 6、配列番号 1 7 または配列番号 3 9 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %
 、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 .
 5 %、9 9 . 8 % または 1 0 0 % 同一である配列を含むまたはからなるユビキチンプロモ
 ーター配列を含む遺伝子発現カセットが提供される。場合により、構築物が非ユビキチン
 導入遺伝子の 3' 末端と作動可能に連結している 3' - UTR をさらに含むことができる
 。一実施形態では、3' - UTR 配列が配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 または配列
 番号 3 6 からなる。例示的实施形態では、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐
 性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、D
 N A 結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。一
 実施形態では、導入遺伝子が除草剤耐性遺伝子である。一実施形態では、配列番号 4、配
 列番号 5、配列番号 6 または配列番号 3 6 からなる群から独立に選択される 1 個、2 個、
 3 個または 4 個のプロモーター配列を含むベクターが提供される。

【 0 0 9 7 】

実施形態では、遺伝子発現カセットがユビキチンプロモーターと、ユビキチン 5' - U
 TR と、ユビキチンイントロンと、ユビキチン 3' - UTR とを含む。実施形態では、ユ
 ビキチンプロモーター、ユビキチン 5' - UTR、ユビキチンイントロンおよびユビキチ

ン 3' - UTR がそれぞれ独立に、パニウム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーター；パニウム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 5' - UTR；パニウム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン 3' - UTR であり得る。実施形態では、遺伝子発現カセットが a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 36 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一であるプロモーターと；b) 配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 または配列番号 37 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一である 3' - UTR と；c) 配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14 または配列番号 38 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一である 5' - UTR と；d) 配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 または配列番号 39 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一であるイントロンとを含む。

10

20

【0098】

例えば、遺伝子発現カセットがプロモーター、イントロンおよび 5' - UTR のいずれも含んでもよく、プロモーターが配列番号 35 のポリヌクレオチドであり、イントロンが配列番号 37 のポリヌクレオチドであり、5' - UTR が配列番号 38 のポリヌクレオチドである。同様に、遺伝子発現カセットがプロモーター、イントロンおよび 5' - UTR のいずれも含んでもよく、プロモーターが配列番号 2 のポリヌクレオチドであり、イントロンが配列番号 8 のポリヌクレオチドであり、5' - UTR が配列番号 12 のポリヌクレオチドである。さらに、遺伝子発現カセットがプロモーター、イントロンおよび 5' - UTR のいずれも含んでもよく、プロモーターが配列番号 3 のポリヌクレオチドであり、イントロンが配列番号 9 および / または配列番号 10 のポリヌクレオチドであり、5' - UTR が配列番号 13 のポリヌクレオチドである。さらに、遺伝子発現カセットがプロモーター、イントロンおよび 5' - UTR のいずれも含んでもよく、プロモーターが配列番号 35 のポリヌクレオチドであり、イントロンが配列番号 37 のポリヌクレオチドであり、5' - UTR が配列番号 38 のポリヌクレオチドである。

30

【0099】

例えば、遺伝子発現カセットがプロモーター、イントロン、5' - UTR および 3' - UTR のいずれも含んでもよく、プロモーターが配列番号 35 のポリヌクレオチドであり、イントロンが配列番号 37 のポリヌクレオチドであり、5' - UTR が配列番号 38 のポリヌクレオチドであり、3' - UTR が配列番号 36 のポリヌクレオチドである。同様に、遺伝子発現カセットがプロモーター、イントロン、5' - UTR および 3' - UTR のいずれも含んでもよく、プロモーターが配列番号 2 のポリヌクレオチドであり、イントロンが配列番号 8 のポリヌクレオチドであり、5' - UTR が配列番号 12 のポリヌクレオチドであり、3' - UTR が配列番号 5 のポリヌクレオチドである。さらに、遺伝子発現カセットがプロモーター、イントロン、5' - UTR および 3' - UTR のいずれも含んでもよく、プロモーターが配列番号 3 のポリヌクレオチドであり、イントロンが配列番号 9 および / または配列番号 10 のポリヌクレオチドであり、5' - UTR が配列番号 13 または 14 のポリヌクレオチドであり、3' - UTR が配列番号 6 のポリヌクレオチドである。さらに、遺伝子発現カセットがプロモーター、イントロン、5' - UTR および 3' - UTR のいずれも含んでもよく、プロモーターが配列番号 35 のポリヌクレオチドであり、イントロンが配列番号 37 のポリヌクレオチドであり、5' - UTR が配列番号

40

50

38のポリヌクレオチドであり、3'-UTRが配列番号36のポリヌクレオチドである。

【0100】

さらに、遺伝子発現カセットがプロモーターと3'-UTRの両方を含んでもよく、プロモーターが配列番号35のポリヌクレオチドであり、3'-UTRが配列番号6のポリヌクレオチドである。実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと3'-UTRの両方を含んでもよく、プロモーターが配列番号35のポリヌクレオチドであり、3'-UTRが配列番号5のポリヌクレオチドである。実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと3'-UTRの両方を含んでもよく、プロモーターが配列番号35のポリヌクレオチドであり、3'-UTRが配列番号36のポリヌクレオチドである。実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと3'-UTRの両方を含んでもよく、プロモーターが配列番号35のポリヌクレオチドであり、3'-UTRが配列番号36のポリヌクレオチドである。

10

【0101】

実施形態では、遺伝子発現カセットが、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーター、ユビキチン5'-UTRおよびユビキチン3'-UTRを含む。実施形態では、遺伝子発現カセットが、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーター、ユビキチンイントロン、ユビキチン5'-UTRおよびユビキチン3'-UTRを含む。

【0102】

遺伝子発現カセットが1つまたは複数の導入遺伝子を含む場合、プロモーター、イントロン、5'-UTRおよび3'-UTRが遺伝子発現カセット内の異なる導入遺伝子と作動可能に連結していてもよい。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーター、イントロンおよび5'-UTRを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン3'-UTRを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性、除草剤耐性、窒素利用効率、水利用効率、栄養価またはこれらの組み合わせを増強する遺伝子産物をコードする。

20

30

【0103】

ユビキチンイントロンおよび5'-UTRが遺伝子発現カセット内の異なるプロモーターと作動可能に連結していてもよい。例示的实施形態では、プロモーターが植物（例えば、トウモロコシ（*Zea mays*）ユビキチン1プロモーター）、ウイルス（例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター）または細菌（例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）*del t a m a s*）に由来する。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。

40

【0104】

実施形態では、ベクターが本明細書に開示される遺伝子発現カセットを含む。実施形態では、ベクターがプラスミド、コスミド、細菌人工染色体（BAC）、バクテリオファージ、ウイルス、またはドナーDNAなどの直接形質転換もしくは遺伝子標的化に使用するための切除ポリヌクレオチドフラグメントであり得る。

【0105】

50

一実施形態によると、組換え遺伝子カセットを含む核酸ベクターであって、組換え遺伝子カセットがポリリンカー配列、非ユビキチン導入遺伝子またはこれらの組み合わせと作動可能に連結しているユビキチンベースプロモーターを含む、核酸ベクターが提供される。一実施形態では、組換え遺伝子カセットが非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンベースプロモーターを含む。一実施形態では、組換え遺伝子カセットがポリリンカー配列と作動可能に連結している本明細書に開示されるユビキチンベースプロモーターを含む。コード配列をポリリンカーの制限部位の1つに挿入することによって、コード配列を作動可能に連結して、ベクターを宿主細胞にトランスフェクトした場合にコード配列の発現を可能にするように、ポリリンカーがユビキチンベースプロモーターと作動可能に連結している。

10

【0106】

一実施形態によると、ユビキチンベースプロモーターが配列番号35または配列番号35と90、95もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態によると、プロモーター配列が1.5、2、2.5、3または4 kb以下の全長を有する。一実施形態によると、ユビキチンベースプロモーターが配列番号35または配列番号35と90、95もしくは99%の配列同一性を有する1025 bp配列からなる。

【0107】

一実施形態によると、配列番号39と、非ユビキチン導入遺伝子と、3'-UTRとからなる遺伝子カセットを含む核酸ベクターであって、配列番号39が非ユビキチン導入遺伝子の5'末端と作動可能に連結しており、3'-UTRが非ユビキチン導入遺伝子の3'末端と作動可能に連結している、核酸ベクターが提供される。さらなる実施形態では、3'非翻訳配列が配列番号36または配列番号36と90、95、99もしくは100%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態によると、配列番号39または配列番号39と90、95もしくは99%の配列同一性を有する2087 bp配列と、非ユビキチン導入遺伝子と、3'-UTRとからなる遺伝子カセットを含む核酸ベクターであって、配列番号39が非ユビキチン導入遺伝子の5'末端と作動可能に連結しており、3'-UTRが非ユビキチン導入遺伝子の3'末端と作動可能に連結している、核酸ベクターが提供される。さらなる実施形態では、3'非翻訳配列が配列番号36または配列番号36と90、95、99もしくは100%の配列同一性を有する配列を含む。さらなる実施形態では、3'非翻訳配列が配列番号36または配列番号36と90、95もしくは99%の配列同一性を有する1000 bp配列からなる。

20

30

【0108】

一実施形態によると、核酸ベクターが、選択マーカーをコードする配列をさらに含む。一実施形態によると、組換え遺伝子カセットがアグロバクテリウム (Agrobacterium) T-DNA境界と作動可能に連結している。一実施形態によると、組換え遺伝子カセットが第1および第2のT-DNA境界をさらに含み、第1のT-DNA境界が遺伝子構築物の一端と作動可能に連結しており、前記第2のT-DNA境界が遺伝子構築物の他端と作動可能に連結している。第1および第2のアグロバクテリウム (Agrobacterium) T-DNA境界は、ノパリン合成アグロバクテリウム (Agrobacterium) T-DNA境界、オクトピン合成アグロバクテリウム (Agrobacterium) T-DNA境界、スクシナモピン合成アグロバクテリウム (Agrobacterium) T-DNA境界またはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される細菌株に由来するT-DNA境界配列から独立に選択され得る。一実施形態では、ノパリン合成株、マンノピン合成株、スクシナモピン合成株またはオクトピン合成株からなる群から選択されるアグロバクテリウム (Agrobacterium) 株であって、配列番号35、配列番号39、または配列番号35もしくは配列番号39と90、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列から選択される配列と作動可能に連結している導入遺伝子を含むプラスミドを含む株が提供される。

40

【0109】

対象となるおよび本開示の構築物に使用するのに適した導入遺伝子には、それだけに限らないが、(1)耐有害生物性または耐病性、(2)除草剤耐性、ならびに(3)その開

50

示が本明細書に組み込まれるWO2013116700(DGT-28)、US20110107455(DSM-2)、米国特許第8283522号(AAD-12);第7838733号(AAD-1);第5188960号;第5691308号;第6096708号;および第6573240号(Cry1F);米国特許第6114138号;第5710020号;および第6251656号(Cry1Ac);米国特許第6127180号;第6624145号および第6340593号(Cry34Ab1);米国特許第6083499号;第6548291号および第6340593号(Cry35Ab1)に開示されている価値付加形質を付与するコード配列が含まれる。一実施形態によると、導入遺伝子が殺虫剤耐性、除草剤耐性、窒素利用効率、水利用効率または栄養価を付与する選択マーカーまたは遺伝子産物をコードする。

10

【0110】

一実施形態によると、遺伝子カセットを含む核酸ベクターであって、遺伝子カセットが導入遺伝子の5'末端と作動可能に連結しているプロモーター領域を含み、導入遺伝子の3'末端が3'非翻訳領域と連結している、核酸ベクターが提供される。一実施形態では、プロモーター領域が配列番号35または配列番号35と90、95もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態によると、プロモーター領域が配列番号35または配列番号39からなる。一実施形態では、3'非翻訳配列が配列番号36または配列番号36と90、95もしくは99%の配列同一性を有する配列を含み、一実施形態では、3'非翻訳配列が配列番号36または配列番号36と90、95もしくは99%の配列同一性を有する1000bp配列からなる。

20

【0111】

一実施形態によると、遺伝子カセットを含む核酸ベクターであって、遺伝子カセットが5'非翻訳配列の5'末端と作動可能に連結しているプロモーター領域を含み、5'非翻訳配列の3'末端が導入遺伝子の5'末端と作動可能に連結しており、導入遺伝子の3'末端が3'非翻訳領域と連結している、核酸ベクターが提供される。一実施形態では、プロモーター領域が配列番号35または配列番号35と90、95もしくは99%の配列同一性を有する配列を含むまたはからなる。一実施形態では、プロモーター領域が配列番号35または配列番号35と90、95もしくは99%の配列同一性を有する1025bp配列からなる。一実施形態によると、5'非翻訳配列が配列番号38または配列番号38と90%の配列同一性を有する配列を含むまたはからなる。一実施形態によると、5'非翻訳配列が配列番号38または配列番号38と90%の配列同一性を有する77bp配列からなる。一実施形態では、3'非翻訳配列が配列番号36または配列番号36と90、95もしくは99%の配列同一性を有する配列を含むまたはからなる。一実施形態では、3'非翻訳配列が配列番号36または配列番号36と90、95もしくは99%の配列同一性を有する1000bp配列からなる。さらなる実施形態では、核酸ベクターが、5'非翻訳領域と導入遺伝子との間に挿入され、プロモーターおよび導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンをさらに含む。一実施形態では、ユビキチンイントロンが配列番号37、または配列番号37と90、95もしくは99%の配列同一性を有する配列を含むまたはからなる。一実施形態では、ユビキチンイントロンが配列番号37または配列番号37と90、95もしくは99%の配列同一性を有する1085bp配列からなる。

30

40

【0112】

一実施形態によると、遺伝子カセットを含む核酸ベクターであって、遺伝子カセットが導入遺伝子の5'末端と作動可能に連結しているプロモーター領域を含み、導入遺伝子の3'末端が3'非翻訳領域と連結している、核酸ベクターが提供される。一実施形態では、プロモーター領域が配列番号40または配列番号40と90、95もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

TTGAATTTTAAATTTTCAAAATTTTGCAGGGTAGTAGTGGAACA
TCACAATAACATAATTTAGAAAAAGTTTTATAATTTTCTCTCC
GTTAGTTTTTCATATAATTTTGAACCTCCAACGATTATAATCTA

50

TTATTAAATATCCCGATCTATCAAAATTAATGATAAAAAATT
TATGATTAAATTTTCTAACATGTGTGTTATGGTGTGTACTAT
CGTCTTATAAAAAATTTCAACTTTAAAACTCCACCTATACATG
GAGAAATGA AAAAGACGAATTACAGTAGGGAGTAATTTGA
ACCAAAATGGAATAGTTTGTAGGGTAA AATGAACATAAACAAAT
AGTTTATAGGAGGTTATTTCAAGATTTTATAGTTATAGTTGAGAGG
AGTAATTTATGACTTTTCTCTATCTTGAATTGTGTGACGGCT
CTCCTATTCGGATATTCGGATGGAGTCTTTTCAGCCCCAACATA
ACTTTCATTCGGGCCCAAAACGTTTCGTCCATCCAGCCTAGGG
AGAACATTTTGTCCCATGATATCTGTTTTCTTTTCTTA
TTTTTCACTGGTATTATAGGAGGGGAAATATACAACGTGTTCT
ACCTTTTGGTTTTCATTCCTTGTTC CATCTGAATTTATCTAAA
ACTGTGTTTTGAACCTTCGTAAAGAAATTTTGTTCGATCTGTCC
GGTACATCTGTGTGTGATAGGTGGCCTCCGAGATTCTTCTTT
TTAAACCGGCAAAAGTA AAAATTAATCTCAGCTCCAGCCTAACG
TCAATTATCAGAGAGAGAA AAAAAATATTTTTTTTATGATTG
ATCGGA AACCAACCGCCTTACGTGTCTGATCCTGGTTCTCTG
GCCGGCACGGCGGAGGA AAGCGACCGACCTCGCAACGCCG
GCGCACGGCGCGCGCGTGTGTGGA CTGTCTCCCGCGACT
CCGTGGGCTCTCGGCTTATCGCCGCGCTCCATCTCAACCG
TCCGCTTGGACACGTGGAAAGTTGATCCGTCTCGCGCACCAAGC
CTCGGAGGTAAACCTAACTGCCCGTACTATAAATCCGGGAT
CCGGGCTCTCCAATCCCCATCGCCACAAGTTCTCGCGATCTC
TCGATTTTCACAAATCGCCGAGGAAGACCCGAGCAGAGAAAGT
TCCCTCTCGATCGCCCTTGCCAAAG (配列番号40)

10

20

30

40

50

【0113】

一実施形態によると、プロモーター領域が配列番号40または配列番号40と90、95もしくは99%の配列同一性を有する1102bp配列からなる。一実施形態によると、プロモーター領域が配列番号40からなる。一実施形態によると、3'非翻訳配列が配列番号36または配列番号36と90、95もしくは99%の配列同一性を有する1000bp配列からなり、一実施形態では、3'非翻訳配列が配列番号36からなる。

【0114】

実施形態では、本明細書に開示される遺伝子発現カセットを含む細胞または植物が提供される。実施形態では、細胞または植物が本明細書に開示される遺伝子発現カセットを含むベクターを含む。実施形態では、ベクターがプラスミド、コスミド、細菌人工染色体(BAC)、バクテリオファージまたはウイルスであり得る。それによって、本明細書に開示される遺伝子発現カセットを含む細胞または植物がそれぞれ、トランスジェニック細胞またはトランスジェニック植物となる。実施形態では、トランスジェニック植物が単子葉植物であり得る。実施形態では、トランスジェニック単子葉植物が、それだけに限らないが、トウモロコシ、コムギ、イネ、ソルガム、エンバク、ライムギ、バナナ、サトウキビおよびキビであり得る。実施形態では、トランスジェニック植物が双子葉植物であり得る。実施形態では、トランスジェニック双子葉植物が、それだけに限らないが、ダイズ、ワタ、ヒマワリおよびセイヨウアブラナであり得る。実施形態には、本明細書に開示されるトランスジェニック植物のトランスジェニック種子も含まれる。

【0115】

実施形態では、遺伝子発現カセットが2つ以上の導入遺伝子を含む。2つ以上の導入遺伝子は、本明細書に開示される同じプロモーター、イントロンまたは5'-UTRまたは3'-UTRと作動可能に連結していなくてもよい。実施形態では、遺伝子発現カセットが1つまたは複数の導入遺伝子を含む。1つまたは複数の導入遺伝子の実施形態では、少なくとも1つの導入遺伝子がプロモーター、イントロン、5'-UTRもしくは3'-U

T Rまたは本開示と作動可能に連結している。

【0116】

選択マーカー

レポーター遺伝子としても記載されている種々の選択マーカーを、選択された発現ベクターに組み込んで形質転換した植物（「形質転換体」）の同定および選択を可能にすることができる。例えば、DNA配列決定およびPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、サザンブロット法、RNAブロット法、ベクターから発現したタンパク質、例えば、ホスフィノトリシン耐性を媒介する沈殿タンパク質を検出するための免疫学的方法、またはβ-グルクロニダーゼ（GUS）、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、DsRed、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、アルカリホスファターゼなどをコードするレポーター遺伝子などの他のタンパク質の目視観察を含む多くの方法が、形質転換した植物中の選択マーカーの発現を確認するために利用可能である（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, N. Y., 2001参照）。

10

【0117】

選択マーカー遺伝子は、形質転換細胞または組織の選択に利用される。選択マーカー遺伝子には、抗生物質耐性をコードする遺伝子、例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（NEO）およびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（HPT）をコードするもの、ならびに除草剤化合物に対する耐性を付与する遺伝子が含まれる。除草剤耐性遺伝子は、一般的に除草剤に非感受性の修飾標的タンパク質または除草剤が作用し得る前に植物中の除草剤を分解もしくは解毒する酵素をコードする。例えば、グリホサート耐性は、変異標的酵素、5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ（5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase）（EPSPS）をコードする遺伝子を用いることによって得られた。EPSPSについての遺伝子および変異体は周知であり、以下にさらに記載される。グルホシネートアンモニウム、プロモキシニルおよび2,4-ジクロロフェノキシアセテート（2,4-D）耐性は、それぞれの除草剤を解毒するpatもしくはDSM-2をコードする細菌遺伝子、ニトリラーゼ、aad-1またはaad-12遺伝子を用いることによって得られた。

20

【0118】

実施形態では、イミダゾリノンまたはスルホニル尿素を含む除草剤が成長点または分裂組織を阻害することができ、これらの除草剤のためのアセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHAS）およびアセト乳酸シンターゼ（ALS）の耐性/許容性の遺伝子は周知である。グリホサート耐性遺伝子には、変異5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ（5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase）（EPSP）およびdgt-28遺伝子（組換え核酸の導入および/または天然EPSP遺伝子のインビボ突然変異誘発の種々の形態を介して）、aroA遺伝子およびグリホサートアセチルトランスフェラーゼ（GAT）遺伝子がそれぞれ含まれる。他のホスホノ化合物の耐性遺伝子には、ストレプトマイセス・ハイグロスコピクス（*Streptomyces hygroscopicus*）およびストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス（*Streptomyces viridichromogenes*）を含むストレプトマイセス属（*Streptomyces*）の種のbar遺伝子、ならびにピリジノキシまたはフェノキシプロピオン酸およびシクロヘキソン（ACCase阻害剤コード遺伝子）が含まれる。シクロヘキサジオンおよび/またはアリーロキシフェノキシプロパン酸（Haloxypop、Diclofop、Fenoxypop、Fluazifop、Quizalofopを含む）に対する耐性を付与する例示的な遺伝子には、アセチル補酵素Aカルボキシラーゼ（ACCase）-ACC1-S1、ACC1-S2およびACC1-S3の遺伝子が含まれる。実施形態では、トリアジン（psbAおよび1s+遺伝子）またはベンゾニトリル（ニトリラーゼ遺伝子）を含む除草剤が光合成を阻害することができる。

30

40

【0119】

50

実施形態では、選択マーカー遺伝子には、それだけに限らないが、ネオマイシンホストトランスフェラーゼ I I ; シアナミドヒドラターゼ ; アスパラギン酸キナーゼ ; ジヒドロジピコリン酸シンターゼ ; トリプロファンデカルボキシラーゼ ; ジヒドロジピコリン酸シンターゼおよび脱感作アスパラギン酸キナーゼ ; b a r 遺伝子 ; トリプトファンデカルボキシラーゼ ; ネオマイシンホストトランスフェラーゼ (N E O) ; ハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ (H P T または H Y G) ; ジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) ; ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ ; 2 , 2 - ジクロロプロピオン酸デハロゲナーゼ ; アセトヒドロキシ酸シンターゼ ; 5 - エノールピルビル - シキメート - ホスフェートシンターゼ (a r o A) ; ハロアリアルニトリラーゼ ; アセチル補酵素 A カルボキシラーゼ ; ジヒドロプテロイン酸シンターゼ (s u l I) ; および 3 2 k D 光化学系 I I ポリペプチド (p s b A) をコードする遺伝子が含まれる。

10

【 0 1 2 0 】

実施形態には、クロラムフェニコール ; メトトレキサート ; ハイグロマイシン ; スペクチノマイシン ; プロモキシニル ; グリホサート ; およびホスフィノトリシンに対する耐性をコードする遺伝子も含まれる。

【 0 1 2 1 】

選択マーカー遺伝子の上記リストは限定的であることを意図していない。いずれのレポーターまたは選択マーカー遺伝子も本発明に包含される。

【 0 1 2 2 】

選択マーカー遺伝子は、植物中での最適発現のために合成される。例えば、実施形態では、遺伝子のコード配列が、植物中での発現を増強するためのコドン最適化によって修飾されている。選択マーカー遺伝子を、特定の植物種中での発現のために最適化することができる、あるいは双子葉または単子葉植物中での最適発現のために修飾することができる。植物に好ましいコドンは、対象となる特定の植物種中で、最大量で発現しているタンパク質中の最高頻度のコドンから決定することができる。実施形態では、選択マーカー遺伝子を、植物中最高レベルで発現してより高い形質転換効率をもたらすよう設計する。植物遺伝子最適化の方法は周知である。合成 D N A 配列の最適化および作製に関する手引きは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 3 0 1 6 5 4 6 、 W O 2 0 1 1 1 4 6 5 2 4 、 W O 1 9 9 7 0 1 3 4 0 2 、 米国特許第 6 1 6 6 3 0 2 号および米国特許第 5 3 8 0 8 3 1 号に見出すことができる。

20

30

【 0 1 2 3 】

形質転換

適当な植物の形質転換方法には、D N A を細胞に導入することができる任意の方法、例えば、限定されないが、電気穿孔（例えば、米国特許第 5 3 8 4 2 5 3 号参照）；微粒子銃（例えば、米国特許第 5 0 1 5 5 8 0 号、第 5 5 5 0 3 1 8 号、第 5 5 3 8 8 8 0 号、第 6 1 6 0 2 0 8 号、第 6 3 9 9 8 6 1 号および第 6 4 0 3 8 6 5 号参照）；アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）媒介形質転換（例えば、米国特許第 5 6 3 5 0 5 5 号、第 5 8 2 4 8 7 7 号、第 5 5 9 1 6 1 6 号、第 5 9 8 1 8 4 0 号および第 6 3 8 4 3 0 1 号参照）；およびプロトプラスト形質転換（例えば、米国特許第 5 5 0 8 1 8 4 号参照）が含まれる。

40

【 0 1 2 4 】

D N A 構築物を、炭化ケイ素繊維による攪拌などの技術を用いて植物細胞のゲノム D N A に直接導入することができる（例えば、米国特許第 5 3 0 2 5 2 3 号および第 5 4 6 4 7 6 5 号参照）、または D N A 構築物を、D N A 粒子銃などの微粒子銃法を用いて植物組織に直接導入することができる（例えば、Klein et al. (1987) Nature 327: 70-73 参照）。あるいは、D N A 構築物を、ナノ粒子形質転換を介して植物に導入することができる（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第 2 0 0 9 0 1 0 4 7 0 0 号参照）。

【 0 1 2 5 】

さらに、根粒菌属（*Rhizobium*）の種 N G R 2 3 4 、 アルファルファ根粒菌（*Sinorhizo*

50

boium meliloti)、メソリゾビウム・ロティ(Mesorhizobium loti)、ジャガイモウイルスX、カリフラワーモザイクウイルスおよびキャッサバ葉脈モザイクウイルスおよび/またはタバコモザイクウイルスなどの非アグロバクテリウム属(Agrobacterium)細菌またはウイルスを用いて遺伝子導入を達成することができる。例えば、Chung et al. (2006) Trends Plant Sci. 11 (1): 1-4を参照されたい。

【0126】

形質転換技術の適用を通して、事実上いかなる植物種の細胞も安定に形質転換することができ、これらの細胞を周知の技術によってトランスジェニック植物に発達させることができる。例えば、ワタ形質転換の文脈で特に有用となり得る技術は、米国特許第5846797号、第5159135号、第5004863号および第6624344号に記載されており；アブラナ属(Brassica)植物を形質転換するための技術は特に、例えば、米国特許第5750871号に記載されており；ダイズを形質転換するための技術は、例えば、米国特許第6384301号に記載されており；トウモロコシを形質転換するための技術は、例えば、米国特許第7060876号および第5591616号ならびにPCT公開WO95/06722に記載されている。

10

【0127】

外因性核酸のレシピエント細胞への送達を行った後、一般的には形質転換細胞をさらなる培養および植物再生のために同定する。形質転換を同定する能力を改善するために、形質転換体を生成するために使用した形質転換ベクターと共に選択マーカー遺伝子を使用することが望ましいだろう。例示的实施形態では、形質転換細胞集団を選択剤(複数可)に曝露することによってアッセイすることができる、または細胞を所望のマーカー遺伝子形質についてスクリーニングすることができる。

20

【0128】

選択剤への曝露に生き延びた細胞、またはスクリーニングアッセイで陽性とスコア化された細胞を、植物の再生を支持する培地で培養することができる。実施形態では、成長調節剤などのさらなる物質を含めることによって任意の適当な植物組織培養培地を修飾することができる。組織を、植物再生の努力を開始するために十分な組織が利用可能となるまで成長調節剤を含めた基礎培地で維持し、または組織の形態が再生に適するまで(例えば、少なくとも2週間)の繰り返しの手動選択後、シュート形成を招く培地に移すことができる。十分なシュート形成が起こるまで、培養物を定期的に移す。いったんシュートが形成したら、これらを、根形成を招く培地に移す。いったん十分な根が形成したら、植物をさらなる成長および成熟のために土壌に移すことができる。

30

【0129】

再生植物中に提供される構築物を含む所望の核酸の存在を確認するために、種々のアッセイを行うことができる。このようなアッセイには、分子生物学的アッセイ、例えば、サザンブロットおよびノーザンブロット法ならびにPCR；生化学的アッセイ、例えば、免疫学的手段(ELISA、ウエスタンブロット法および/またはLC-MS MS分光光度法)または酵素機能によって、タンパク質産物の存在を検出する；植物部分アッセイ、例えば、葉または根アッセイ；ならびに/あるいは全再生植物の表現型の分析が含まれる。

40

【0130】

トランスジェニックイベントを、例えば、対象となる核酸分子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR増幅によってスクリーニングすることができる。PCR遺伝子型判定は、それだけに限らないが、ゲノムに組み込まれる対象となる核酸分子を含むことが予想される単離宿主細胞カルス組織に由来するゲノムDNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、引き続いて標準的なクローニングおよびPCR増幅産物の配列解析を含むと理解される。PCR遺伝子型判定の方法は十分に記載されており(例えば、Rios et al. (2002) Plant J. 32: 243-53参照)、細胞培養物を含む、任意の植物種または組織型に由来するゲノムDNAに適用することができる。標的配列と導入配列の両方に結合するオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを順次使用する、またはPCR増幅反応

50

で多重化することができる。標的部位、導入された核酸配列および/または2つの組み合わせにアニーリングするよう設計したオリゴヌクレオチドプライマーを作製することができる。したがって、PCR遺伝子型判定戦略は、例えば、限定されないが、植物ゲノム中の特異的配列の増幅；植物ゲノム中の複数の特異的配列の増幅；植物ゲノム中の非特異的配列の増幅；および前記のいずれかの組み合わせを含み得る。当業者であれば、ゲノムを調べるためのプライマーおよび増幅反応のさらなる組み合わせを考案することができるだろう。例えば、順方向および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーのセットを、導入された核酸配列の境界の外側の標的に特異的な核酸配列（複数可能）にアニーリングするよう設計することができる。

【0131】

順方向および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーを、導入された核酸分子に、例えば、そこに含まれる対象となるヌクレオチド配列中のコード領域に相当する配列で、または核酸分子の他の部分に特異的にアニーリングするよう設計することができる。プライマーを本明細書に記載されるプライマーと合わせて使用することができる。オリゴヌクレオチドプライマーは、所望の配列にしたがって合成することができ、商業的に入手可能である（例えば、Integrated DNA Technologies, Inc.、Coralville, IA製）。増幅に、クローニングもしくは配列決定、または増幅産物の直接配列解析が続くことができる。実施形態では、遺伝子標的に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーをPCR増幅に使用する。

【0132】

導入遺伝子を発現させる方法

実施形態では、植物中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含む植物を成長させるステップを含む。実施形態では、植物中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン5'-UTRを含む植物を成長させるステップを含む。実施形態では、植物中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含む植物を成長させるステップを含む。実施形態では、植物中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン3'-UTRを含む植物を成長させるステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン5'-UTRを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン3'-UTRを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。

【0133】

実施形態では、植物中で少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも1つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含む遺伝子発現力

10

20

30

40

50

セットを含む植物を成長させるステップを含む。一実施形態では、ユビキチンプロモーターが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 35、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 39 から選択される配列、または配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 35、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 39 から選択される配列と 90、95 もしくは 99.5% の配列同一性を有する配列からなる。実施形態では、植物中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含む遺伝子発現カセットを含む植物を成長させるステップを含む。実施形態では、植物中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン 5' - UTR を含む遺伝子発現カセットを含む植物を成長させるステップを含む。実施形態では、植物中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーター、ユビキチン 5' - UTR およびユビキチンイントロンを含む遺伝子発現カセットを含む植物を成長させるステップを含む。実施形態では、植物中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン 3' - UTR を含む遺伝子発現カセットを含む植物を成長させるステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含む遺伝子発現カセットを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含む遺伝子発現カセットを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーター、ユビキチン 5' - UTR およびユビキチンイントロンを含む遺伝子発現カセットを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーター、ユビキチン 5' - UTR およびユビキチンイントロンを含む遺伝子発現カセットを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。実施形態では、植物組織または植物細胞中で少なくとも 1 つの導入遺伝子を発現させる方法が、少なくとも 1 つの導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン 3' - UTR を含む遺伝子発現カセットを含む植物組織または植物細胞を培養するステップを含む。

【0134】

トランスジェニック植物

実施形態では、植物、植物組織または植物細胞がユビキチンプロモーターを含む。実施形態では、ユビキチンプロモーターがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターであり得る。実施形態では、植物、植物組織または植物細胞がプロモーターを含む遺伝子発現カセットを含み、プロモーターが配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 35 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一であり、プロモーターが非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結している。実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結している配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 35、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 39 から選択される配列、または配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 35、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 39 から選択される配列と 90、95 もしくは 99.5% の配列同一性を有する配列を含む遺伝子発現カセットを含む。例示的实施形態では、植物、植物組織または植物細胞が導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含む遺伝子発現カセットを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率

導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。

【0135】

実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が3'-UTRを含む遺伝子発現カセットを含む。実施形態では、植物、植物組織または植物細胞がユビキチン3'-UTRを含む遺伝子発現カセットを含む。実施形態では、ユビキチン3'-UTRがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン3'-UTRである。実施形態では、3'-UTRがミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン1C (Ubi1C) 3'-UTR、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ユビキチン1 3'-UTRまたはアワ (*Setaria italica*) ユビキチン3'-UTRであり得る。

10

【0136】

実施形態では、植物、植物組織または植物細胞がイントロンを含む遺伝子発現カセットを含み、イントロンが配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10または配列番号37と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%または100%同一である。実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含み、プロモーターがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーター、または植物 (例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン1プロモーター)、ウイルス (例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター) もしくは細菌 (例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) *delta mas*) に由来するプロモーターである。実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含む遺伝子発現カセットを含む。例示的实施形態では、植物、植物組織または植物細胞が導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含む遺伝子発現カセットを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。

20

【0137】

実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が5'-UTRを含む遺伝子発現カセットを含み、5'-UTRが配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14または配列番号38と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%または100%同一である。実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含み、プロモーターがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーター、または植物 (例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン1プロモーター)、ウイルス (例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター) もしくは細菌 (例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) *delta mas*) に由来するプロモーターである。実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン5'-UTRを含む遺伝子発現カセットを含む。例示的实施形態では、植物、植物組織または植物細胞が導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン5'-UTRを含む遺伝子発現カセットを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。

30

40

【0138】

実施形態では、植物、植物組織または植物細胞がユビキチンプロモーターおよびユビキチン3'-UTRを含む遺伝子発現カセットを含む。実施形態では、植物、植物組織また

50

は植物細胞が、それぞれ独立に、パニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターおよびパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーターであり得るユビキチンプロモーターおよび 3' - UTR を含む。実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 35 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一であるプロモーターと、b) 配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 または配列番号 36 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8% または 100% 同一である 3' - UTR とを含む遺伝子発現カセットを含む。

【0139】

実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーター、ユビキチン 5' - UTR、ユビキチンイントロンおよびユビキチン 3' - UTR を含む遺伝子発現カセットを含む。遺伝子発現カセットが 2 つ以上の導入遺伝子を含む場合、プロモーター、イントロン、5' - UTR および 3' - UTR が遺伝子発現カセット内の異なる導入遺伝子と作動可能に連結していてもよい。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンプロモーターを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと作動可能に連結しているユビキチンイントロンを含み、プロモーターがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーター、または植物 (例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーター)、ウイルス (例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター) もしくは細菌 (例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) *delta mas*) に由来するプロモーターである。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン 5' - UTR を含み、導入遺伝子が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。実施形態では、遺伝子発現カセットがプロモーターと作動可能に連結しているユビキチン 5' - UTR を含み、プロモーターがパニカム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) もしくはアワ (*Setaria italica*) ユビキチンプロモーター、または植物 (例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーター)、ウイルス (例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター) もしくは細菌 (例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) *delta mas*) に由来するプロモーターである。例示的实施形態では、遺伝子発現カセットが導入遺伝子と作動可能に連結しているユビキチン 3' - UTR を含み、3' - UTR が殺虫剤耐性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養価導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択マーカー導入遺伝子またはこれらの組み合わせであり得る。

【0140】

実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、本明細書に開示されるユビキチンプロモーター、5' - UTR、イントロンおよび / または 3' - UTR を含むベクターを含

む。実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結している本明細書に開示されるユビキチンプロモーター、5' - UTR、イントロンおよび/または3' - UTRを含むベクターを含む。実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、本明細書に開示される遺伝子発現カセットを含むベクターを含む。実施形態では、ベクターがプラスミド、コスミド、細菌人工染色体 (BAC)、バクテリオファージまたはウイルスであり得る。

【0141】

一実施形態によると、導入遺伝子と作動可能に連結している非内因性ユビキチン由来プロモーター配列を含む植物、植物組織または植物細胞であって、ユビキチン由来プロモーター配列が配列番号1、配列番号2、配列番号3もしくは配列番号35の配列、または配列番号1、配列番号2、配列番号3もしくは配列番号35と90、95、98もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む、植物、植物組織または植物細胞が提供される。一実施形態では、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結している配列番号35または配列番号35と90%の配列同一性を有する配列を含む植物、植物組織または植物細胞が提供される。一実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が双子葉もしくは単子葉植物、または双子葉もしくは単子葉植物に由来する細胞もしくは組織である。一実施形態では、植物がトウモロコシ、コムギ、イネ、ソルガム、エンバク、ライムギ、バナナ、サトウキビ、ダイズ、ワタ、ヒマワリおよびセイヨウアブラナからなる群から選択される。一実施形態では、植物がトウモロコシ (*Zea mays*) である。一実施形態によると、植物、植物組織または植物細胞が、非ユビキチン導入遺伝子と作動可能に連結している配列番号35、配列番号39、または配列番号35もしくは配列番号39と90、95、98もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が導入遺伝子と作動可能に連結しているプロモーターを含み、プロモーターが配列番号35、配列番号39、または配列番号35もしくは配列番号39と90、95、98もしくは99%の配列同一性を有する配列からなる。一実施形態によると、導入遺伝子と作動可能に連結している非内因性ユビキチン由来プロモーター配列を含む遺伝子構築物が植物、植物組織または植物細胞のゲノムに組み込まれる。

【0142】

一実施形態では、導入遺伝子と作動可能に連結している配列番号35、または配列番号35と90、95、98もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む非パニクム属 (*Panicum*) 植物 (すなわち、*Panicum*科の一員ではない)、植物組織または植物細胞が提供される。一実施形態によると、非パニクム属 (*Panicum*) 植物、植物組織または植物細胞が双子葉もしくは単子葉植物、または双子葉もしくは単子葉植物に由来する植物細胞もしくは組織である。一実施形態では、植物がトウモロコシ、コムギ、イネ、ソルガム、エンバク、ライムギ、バナナ、サトウキビ、ダイズ、ワタ、ヒマワリおよびセイヨウアブラナからなる群から選択される。一実施形態では、植物がトウモロコシ (*Zea mays*) である。一実施形態によると、導入遺伝子と作動可能に連結しているプロモーター配列が植物、植物組織または植物細胞のゲノムに組み込まれる。一実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、配列番号38または配列番号38と90%の配列同一性を有する配列を含む5' 非翻訳配列をさらに含み、5' 非翻訳配列が前記プロモーターと前記導入遺伝子との間に挿入されており、これらと作動可能に連結している。さらなる実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、5' 非翻訳配列の後に挿入されたイントロン配列をさらに含む。一実施形態では、イントロン配列がパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) のユビキチン遺伝子から単離されたイントロン配列である。一実施形態では、配列が配列番号37を含むまたはからなる。

【0143】

一実施形態では、導入遺伝子の5' 末端と作動可能に連結している配列番号35、または配列番号35と90、95、98もしくは99%の配列同一性を有する配列と、配列番号36または配列番号36と90%の配列同一性を有する配列を含む3' 非翻訳配列とを

含む非パニクム属 (*Panicum*) 植物、植物組織または植物細胞であって、3' 非翻訳配列が前記導入遺伝子と作動可能に連結している植物、植物組織または植物細胞が提供される。一実施形態によると、非パニクム属 (*Panicum*) 植物、植物組織または植物細胞が双子葉もしくは単子葉植物である、または双子葉もしくは単子葉植物に由来する植物組織もしくは細胞である。一実施形態では、植物がトウモロコシ、コムギ、イネ、ソルガム、エンバク、ライムギ、バナナ、サトウキビ、ダイズ、ワタ、ヒマワリおよびセイヨウアブラナからなる群から選択される。一実施形態では、植物がトウモロコシ (*Zea mays*) である。一実施形態によると、導入遺伝子と作動可能に連結しているプロモーター配列が植物、植物組織または植物細胞のゲノムに組み込まれる。一実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が、配列番号 38 または配列番号 38 と 90% の配列同一性を有する配列を含む 5' 非翻訳配列をさらに含み、5' 非翻訳配列が前記プロモーターと前記導入遺伝子との間に挿入されており、これらと作動可能に連結している。さらなる実施形態では、植物、植物組織または植物細胞が 5' 非翻訳配列の後に挿入されたイントロン配列をさらに含む。一実施形態では、イントロン配列がパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) のユビキチン遺伝子から単離されたイントロン配列である。一実施形態では、5' 非翻訳配列が配列番号 38 からなる。

10

【0144】

一実施形態では、導入遺伝子と作動可能に連結している配列番号 39 または配列番号 39 と 90% の配列同一性を有する配列を含む非パニクム属 (*Panicum*) 植物、植物組織または植物細胞が提供される。一実施形態では、導入遺伝子と作動可能に連結しているプロモーターを含む非パニクム属 (*Panicum*) 植物、植物組織または植物細胞であって、プロモーターが配列番号 39 または配列番号 39 と 90% の配列同一性を有する配列からなる植物、植物組織または植物細胞が提供される。さらなる実施形態では、非パニクム属 (*Panicum*) 植物、植物組織または植物細胞がパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) またはアワ (*Setaria italica*) のユビキチン遺伝子の 3' 非翻訳配列をさらに含む。一実施形態では、3' 非翻訳配列が、配列番号 36 または配列番号 36 と 90% の配列同一性を有する配列を含むまたはからなり、3' 非翻訳配列が導入遺伝子の 3' 末端と作動可能に連結している。

20

【0145】

実施形態では、本明細書に開示される方法による植物、植物組織または植物細胞が単子葉植物であり得る。単子葉植物、植物組織または植物細胞は、それだけに限らないが、イネ、コムギ、サトウキビ、オオムギ、ライムギ、ソルガム、ラン、タケ、バナナ、ガマ、ユリ、エンバク、タマネギ、キビおよびライコムギであり得る。

30

【0146】

実施形態では、本明細書に開示される方法による植物、植物組織または植物細胞が双子葉植物であり得る。双子葉植物、植物組織または植物細胞は、それだけに限らないが、ナタネ、セイヨウアブラナ、カラシナ、エチオピアマスタード (*ethiopian mustard*)、ダイズ、ヒマワリおよびワタであり得る。

【0147】

遺伝子組換え植物の作製に関しては、植物の遺伝子工学の方法が当技術分野で周知である。例えば、双子葉植物ならびに単子葉植物のための生物学および物理学の形質転換プロトコルを含む多数の植物形質転換方法が開発されている (例えば、Goto-Fumiyuki et al., *Nature Biotech* 17: 282-286 (1999); Miki et al., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993) 参照)。さらに、植物細胞もしくは組織の形質転換および植物の再生のためのベクターおよびインビトロ培養法は、例えば、Gruber et al., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 89-119 (1993) で入手可能である。

40

【0148】

50

当業者であれば、外因性配列がトランスジェニック植物に安定に組み込まれ、作動可能であることが確認された後、これを有性交雑によって他の植物に導入することができることを認識するだろう。交雑する種に応じて、いくつかの標準的な育種技術のいずれかを使用することができる。

【 0 1 4 9 】

形質転換した植物細胞、カルス、組織または植物は、形質転換 DNA 上に存在するマーカー遺伝子によってコードされる形質について操作した植物材料を選択またはスクリーニングすることによって同定および単離することができる。例えば、操作した植物材料を、形質転換遺伝子構築物が耐性を付与する阻害量の抗生物質または除草剤を含む培地で成長させることによって、選択を行うことができる。さらに、組換え核酸構築物上に存在する任意の目に見えるマーカー遺伝子（例えば、yfp、gfp、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼまたはBもしくはC1遺伝子）の活性についてスクリーニングすることによって、形質転換細胞を同定することもできる。このような選択およびスクリーニング方法論は当業者に周知である。

10

【 0 1 5 0 】

物理的および生化学的方法を使用して挿入された遺伝子構築物を含む植物または植物細胞形質転換体を同定することもできる。これらの方法には、それだけに限らないが、1) 組換えDNAインサートの構造を検出および決定するためのサザン解析またはPCR増幅；2) 遺伝子構築物のRNA転写産物を検出および調査するためのノーザンブロット法、S1 RNアーゼ保護、プライマー伸長または逆転写酵素PCR増幅；3) 酵素またはリボザイム活性（このような遺伝子産物が遺伝子構築物によってコードされている）を検出するための酵素的アッセイ；4) 次世代シーケンシング解析；5) 遺伝子構築物産物がタンパク質である、タンパク質ゲル電気泳動、ウエスタンブロット技術、免疫沈降法または酵素結合免疫測定法（ELISA）が含まれる。インサイチュハイブリダイゼーション、酵素染色および免疫染色などのさらなる技術を使用して、特定の植物器官および組織中の組換え構築物の存在または発現を検出することもできる。これら全てのアッセイを行う方法は当業者に周知である。

20

【 0 1 5 1 】

本明細書に開示される方法を用いた遺伝子操作の効果は、例えば、対象となる組織から単離したRNA（例えば、mRNA）のノーザンブロット法によって観察することができる。典型的には、mRNAが存在するまたはmRNAの量が増加した場合、対応する導入遺伝子が発現していると仮定することができる。遺伝子および/またはコードされるポリペプチド活性を測定する他の方法を使用することができる。使用する基質、および反応産物もしくは副産物の増加もしくは減少を検出する方法に応じて、異なる種類の酵素的アッセイを使用することができる。さらに、発現しているポリペプチドのレベルを、免疫化学的に、すなわち、ELISA、RIA、EIAおよび当業者に周知の他の抗体ベースのアッセイ、例えば、電気泳動検出アッセイ（染色またはウエスタンブロット法のいずれかを用いる）によって測定することができる。1つの非限定的な例として、ELISAアッセイを用いたAAD-1（アリアルオキシアルカノエートジオキシゲナーゼ；WO2005/107437参照）およびPAT（ホスフィノトリシン-N-アセチル-トランスフェラーゼ）、EC2.3.1.183）タンパク質の検出が、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第20090093366号に記載されている。導入遺伝子は植物のいくつかの細胞型もしくは組織中でまたはいくつかの発育段階で選択的に発現され得る、または導入遺伝子は実質的にその全ての生活環に沿って実質的に全ての植物組織中で発現され得る。しかしながら、いずれの組み合わせ発現様式も適用可能である。

30

40

【 0 1 5 2 】

本開示は、上記トランスジェニック植物の種子であって、導入遺伝子または遺伝子構築物を有する種子も包含する。本開示は、上記トランスジェニック植物の子孫、クローン、細胞株または細胞であって、導入遺伝子または遺伝子構築物を有する子孫、クローン、細胞株または細胞をさらに包含する。

50

【 0 1 5 3 】

本発明を具体的な方法および実施形態を参照して記載してきたが、本発明から逸脱することなく種々の修正および変更を行うことができることが認識されるだろう。

【実施例 1】

【 0 1 5 4 】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) の形質転換

バイナリー発現ベクターを、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 D A t 1 3 1 9 2 (R e c A マイナス三元菌株) (国際特許公開番号 W O 2 0 1 2 0 1 6 2 2 2) に形質転換した。細菌コロニーを単離し、バイナリープラスミド D N A を単離し、制限酵素消化を介して確認した。

10

【 0 1 5 5 】

トウモロコシの形質転換

アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 培養開始。アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 培養液をグリセロールストックからアグロバクテリウム (A B) 最少培地 (その開示が参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 3 0 9 0 7 3 4 に開示されている) 上に面線接種し、暗所中 2 0 で 3 日間インキュベートした。次いで、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 培養液を Y E P (W O 2 0 1 3 0 9 0 7 3 4 参照) 培地のプレート上に面線接種し、暗所中 2 0 で 1 日間インキュベートした。

【 0 1 5 6 】

実験日に、接種培地 (W O 2 0 1 3 0 9 0 7 3 4 参照) とアセトシリンゴンの混合物を、実験において植物形質転換構築物を含む細菌株の数に適した体積で調製した。接種培地を滅菌使い捨て 2 5 0 m l フラスコにピペットで入れた。次に、アセトシリンゴンの 1 0 0 % ジメチルスルホキシド中 1 M ストック溶液を、 2 0 0 μ M の最終アセトシリンゴン濃度を作るのに適した体積で接種培地を含むフラスコに添加した。接種培地および 1 M アセトシリンゴンストック溶液の要求される体積を表 1 に列挙する。

20

【 0 1 5 7 】

【表 1】

表 1: 調製している構築物の数にしたがって作製する接種培地/アセトシリンゴン混合物の量

調製する構築物の数	接種培地 (mL)	1M アセトシリンゴン ストック (μ L)
1	50	10
2	100	20
3	150	30
4	200	40
5	250	50

30

【 0 1 5 8 】

各構築物について、Y E P プレートからの 1 ~ 2 ループのアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) を滅菌使い捨て 5 0 m l 遠心管の内側の接種培地 / アセトシリンゴン混合物 1 5 m l に懸濁し、6 0 0 n m の溶液の光学濃度 (O D ₆₀₀) を分光光度計で測定した。次いで、追加の接種培地 / アセトシリンゴン混合物を用いて、懸濁液を 0 . 2 5 ~ 0 . 3 5 O D ₆₀₀ に希釈した。次いで、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 懸濁液の管を室温で約 7 5 r p m に設定したプラットホームシェーカー上に水平に置き、使用前に 1 ~ 4 時間の間インキュベートした。

40

【 0 1 5 9 】

穂殺菌および胚単離。トウモロコシ (*Zea mays*) 栽培品種 B 1 0 4 の穂を受粉 1 0 ~ 1

50

2日後に収穫した。収穫した穂から殻を取り (de-husk)、市販の漂白剤 (Ultra Chlorox (登録商標) Germicidal Bleach、6.15%次亜塩素酸ナトリウム) の20%溶液およびTween (登録商標) 20 2滴に20分間浸漬し、引き続いてラミナーフード中滅菌脱イオン水で3回すすいで表面殺菌した。未熟な接合体胚 (1.8~2.2mm長) を各穂から無菌的に切除し、10% Break-Thru (登録商標) S233界面活性剤2 μ lを添加したアグロバクテリウム (Agrobacterium) 懸濁液2.0mlを含む1本または複数の微量遠心管に分配した。

【0160】

アグロバクテリウム (Agrobacterium) 共培養。胚単離活動が完了したら、胚の管を閉じて、ロッカープラットホームに5分間置いた。次いで、管の内容物を共培養培地のプレートに注ぎ出し、液体アグロバクテリウム (Agrobacterium) 懸濁液を滅菌使い捨てホールピペットで取り出した。胚を含む共培養プレートを30分間、蓋を半開きにしてラミナーフードの後ろに置き、この時間の後、顕微鏡を用いて、胚を胚盤が上を向くように配向した。次いで、胚を含む共培養プレートをさらに15分間、蓋を半開きにしてラミナーフードの後ろに戻した。次いで、プレートを閉じ、3M (登録商標) Micro pore (登録商標) テープで密閉し、24時間/昼光の約60 μ mol $m^{-2}s^{-1}$ 光強度を用いる25のインキュベーターに入れた。

【0161】

トランスジェニックイベントのカルス選択および再生。共培養期間後、胚を静止培地 (WO2013090734参照) に移した。36個以下の胚を各プレートに移動させた。プレートを透明な箱に入れ、24時間/昼光の約50 μ mol $m^{-2}s^{-1}$ 光強度を用いて27で7~10日間インキュベートした。次いで、カルス化した胚を選択I培地 (WO2013090734参照) に移した。18個以下のカルス化した胚を選択Iの各プレートに移動させた。プレートを透明な箱に入れ、24時間/昼光の約50 μ mol $m^{-2}s^{-1}$ 光強度を用いて27で7日間インキュベートした。次いで、カルス化した胚を選択II培地 (WO2013090734参照) に移した。12個以下のカルス化した胚を選択II培地の各プレートに移動させた。プレートを透明な箱に入れ、24時間/昼光の約50 μ mol $m^{-2}s^{-1}$ 光強度を用いて27で14日間インキュベートした。

【0162】

この段階で、耐性カルスをプレ再生培地 (WO2013090734参照) に移動させた。9個以下のカルスをプレ再生培地の各プレートに移動させた。プレートを透明な箱に入れ、24時間/昼光の約50 μ mol $m^{-2}s^{-1}$ 光強度を用いて27で7日間インキュベートした。次いで、再生カルスをPhytatrays (商標) 中の再生培地に移し (WO2013090734参照)、1日当たり16時間光/8時間暗の約150 μ mol $m^{-2}s^{-1}$ 光強度を用いて28で7~14日間またはシュートが発達するまでインキュベートした。5個以下のカルスを各Phytatrays (商標) に入れた。次いで、一次根を有する小さなシュートを単離し、シュート伸長培地 (WO2013090734参照) に移した。約6cm以上の根づいた小植物を土壌に移植し、慣れさせるために生育チャンバーに移転させた。

【0163】

YFP一過性発現。一過性YFP発現が、形質転換胚およびアグロバクテリウム (Agrobacterium) との共培養の3日後で観察された。胚をYFPフィルタおよび500nm光源を用いて実体顕微鏡 (Leica Microsystems、Buffalo Grove、IL) で観察した。

【0164】

温室内でのT₀植物の移動および確立。トランスジェニック植物を温室に定期的に移した。植物を、Phytatrays (商標) から成長培地 (Premier Tech Horticulture、ProMix BX、0581P) を充填した小型ポット (T.O. Plastics、3.5'' SVD、700022C) へ移植し、ヒュミドーム (humidome) で覆って植物を順応させるのを助けた。植物を、V3~V4期に達するま

10

20

30

40

50

で、Conviron生育チャンバー（28 / 24、16時間光周期、50～70%相対湿度、200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光強度）に入れた。これは、植物を土壌およびより厳しい温度に順応させるのを助けた。次いで、植物を温室（露光型：光または同化；ハイトライト限界：1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光合成有効放射（PAR）；16時間日長；27 昼 / 24 夜）に移動させ、小型ポットから5.5インチのポットへ移植した。大きなポットに移植した約1～2週間後、植物をバイオアッセイのためにサンプリングした。1イベント当たり1つの植物を分析した。

【実施例2】

【0165】

プロモーターの同定

トウモロコシユビキチンコード配列を、標的ゲノムとしてミナトカモジグサ（*Brachypodium distachyon*）およびアワ（*Setaria italica*）を用いて、Phytozome（Goodstein et al., 2012）データベースでBLASTx検索した。

トウモロコシユビキチン（ZM Ubi1）コード配列

A T G C A G A T C T T T G T G A A A A C C C T G A C T G G C A A G A C T A T C A
 C C C T C G A G G T G G A G T C G T C T G A C A C C A T T G A C A A C G T T A A
 G G C C A A G A T C C A G G A C A A G G A G G G C A T C C C C C C A G A C C A G
 C A G C G G C T C A T C T T T G C T G G C A A A C A G C T T G A G G A C G G G C
 G C A C G C T T G C T G A C T A C A A C A T C C A G A A G G A G A G C A C C C T
 C C A C C T T G T G C T C C G T C T C A G G G G A G G C A T G C A G A T C T T T
 G T G A A A A C C C T G A C C G G C A A G A C T A T C A C C C T C G A G G T G G
 A G T C C T C T G A C A C C A T T G A C A A C G T C A A G G C C A A G A T C C A
 G G A C A A G G A G G G C A T C C C T C C A G A C C A G C A G C G G C T C A T C
 T T T G C T G G G A A G C A G C T T G A G G A C G G G C G C A C G C T T G C C G
 A C T A C A A C A T C C A G A A G G A G A G C A C C C T C C A C T T G G T G C T
 G C G C C T C A G G G G A G G C A T G C A G A T C T T C G T G A A G A C C C T G
 A C C G G C A A G A C T A T C A C C C T C G A G G T G G A G T C T T C A G A C A
 C C A T C G A C A A C G T C A A G G C C A A G A T C C A G G A C A A G G A G G G
 C A T T C C C C C A G A C C A G C A G C G G C T C A T C T T T G C T G G A A A G
 C A G C T T G A G G A C G G G C G C A C G C T T G C C G A C T A C A A C A T C C
 A G A A G G A G A G C A C C C T C C A C T T G G T G C T G C G C C T C A G G G G
 A G G C A T G C A G A T C T T C G T G A A G A C C C T G A C C G G C A A G A C T
 A T C A C C C T C G A G G T G G A G T C T T C A G A C A C C A T C G A C A A T G
 T C A A G G C C A A G A T C C A G G A C A A G G A G G G C A T C C C A C C G G A
 C C A G C A G C G T T T G A T C T T C G C T G G C A A G C A G C T G G A G G A T
 G G C C G C A C C C T T G C G G A T T A C A A C A T C C A G A A G G A G A G C A
 C C C T C C A C C T G G T G C T C C G T C T C A G G G G T G G T A T G C A G A T
 C T T T G T G A A G A C A C T C A C T G G C A A G A C A A T C A C C C T T G A G
 G T G G A G T C T T C G G A T A C C A T T G A C A A T G T C A A G G C C A A G A
 T C C A G G A C A A G G A G G G C A T C C C A C C C G A C C A G C A G C G C C T
 C A T C T T C G C C G G C A A G C A G C T G G A G G A T G G C C G C A C C C T G
 G C G G A T T A C A A C A T C C A G A A G G A G A G C A C T C T C C A C C T G G
 T G C T C C G C C T C A G G G G T G G C A T G C A G A T T T T T G T G A A G A C
 A T T G A C T G G C A A G A C C A T C A C C T T G G A G G T G G A G A G C T C T
 G A C A C C A T T G A C A A T G T G A A G G C C A A G A T C C A G G A C A A G G
 A G G G C A T T C C C C C A G A C C A G C A G C G T C T G A T C T T T G C G G G
 C A A G C A G C T G G A G G A T G G C C G C A C T C T C G C G G A C T A C A A C
 A T C C A G A A G G A G A G C A C C C T T C A C C T T G T T C T C C G C C T C A
 G A G G T G G T A T G C A G A T C T T T G T A A A G A C C C T G A C T G G A A A
 A A C C A T A A C C C T G G A G G T T G A G A G C T C G G A C A C C A T C G A C

A A T G T G A A G G C G A A G A T C C A G G A C A A G G A G G G C A T C C C C C
 C G G A C C A G C A G C G T C T G A T C T T C G C C G G C A A A C A G C T G G A
 G G A T G G C C G C A C C C T A G C A G A C T A C A A C A T C C A A A A G G A G
 A G C A C C C T C C A C C T T G T G C T C C G T C T C C G T G G T G G T C A G T
 A A (配列番号 1 8)

【 0 1 6 6 】

タンパク質アラインメントを図 1 に示す。トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 タン
 パク質と整列した 2 つの配列をミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) から同定
 した。トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 タンパク質と整列したただ 1 つの配列をア
 ワ (*Setaria italica*) およびパニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*) からそれぞ
 れ同定した。予想された翻訳開始部位 (A T G) から上流の約 2 k b D N A 配列を推定
 プロモーター配列の始まりと決定し、発現特性評価に使用した。パニクム・ヴィルガツム
 (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) およびアワ (*Seta*
ria italica) から単離された新規なプロモーターのポリヌクレオチド配列アラインメン
 トを、Z M U b i 1 プロモーターに整列し、2 k b D N A 領域にわたって低レベルの
 配列類似性を共有していることを見出した (図 2 A ~ 図 2 C)。

10

【 0 1 6 7 】

パニクム・ヴィルガツム (*Panicum virgatum*)、ミナトカモジグサ (*Brachypodium dis*
tachyon) およびアワ (*Setaria italica*) ユビキチン遺伝子についての U B I コード配列
 および推定プロモーターを図 3 5 ~ 図 3 8 に示す。

20

【 実施例 3 】

【 0 1 6 8 】

ベクター構築

4 つのプロモーター配列を商業的に合成し、図 3 (p D A B 1 1 3 0 9 1)、図 4 (p
 D A B 1 1 3 0 9 2)、図 5 (p D A B 1 1 3 0 6 6) および図 2 2 (p D A B 1 1 8 2
 3 8) に示されるプラスミドベクターに組み込んだ。同様に、4 つの 3 ' U T R / 転写終
 結配列を商業的に合成し、図 2 3 (p D A B 1 1 8 2 3 7)、図 2 4 (p D A B 1 1 8 2
 0 7)、図 2 5 (p D A B 1 1 8 2 0 8) および図 2 6 (p D A B 1 1 8 2 0 9) に示さ
 れるプラスミドベクターに組み込んだ。配列に、シームレスクローニング (seamless clo
 ning) (G e n e A r t (登録商標) S e a m l e s s C l o n i n g a n d A s
 s e m b l y K i t、I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A) およびプロモ
 ーターフラグメントの単離用に挿入される I I 型制限酵素部位のために、両端に 1 5 ~ 1
 8 個のヌクレオチド相同フラグメントを隣接させた。シームレスクローニング適合性トウ
 モロコシ (*Zea mays*) U b i 1 プロモーター (Christensen and Quail (1996) Transgeni
 c Research. 5; 213-218; Christensen et al., (1992) Plant Molecular Biology. 18;
 675-689) またはイネ (*Oryzae sativa*) アクチンプロモーター (McElroy et al., (1990)
 Plant Cell. 2; 163-71)、および S T - L S 1 イントロン (Vancanneyt et al., (1990)
) Mol Gen Genet. 220; 245-50) を含む P h i Y F P (Shagin et al., (2004) Mol Biol
 Evol. 21; 841-50) コード配列、および S t P i n I I または天然 3 ' - U T R (An et
 al., 1989 Plant Cell. 1; 115-22.) フラグメントを、P C R または I I 型制限酵素を
 用いて得た。最後に、プロモーター : : P h i Y F P : : S t P i n I I 3 ' - U T R
 フラグメントを、シームレスクローニングを用いて組み立てて、一過性発現試験のための
 一過性発現ベクター (図 6、p D A B 1 1 3 1 0 3 ; 図 7、p D A B 1 1 3 1 0 4 ; 図 8
 、p D A B 1 1 3 1 0 5 ; 図 9、p D A B 1 1 3 1 0 6 ; および図 1 0、p D A B 1 1 3
 1 0 7 ; 図 2 7、p D A B 1 2 0 4 3 ; 図 2 8、p D A B 1 1 8 2 3 4、図 2 9、p D A
 B 1 1 8 2 3 5 ; および図 3 0、p D A B 1 1 8 2 3 6) を創製した。これらの一過性発
 現ベクターを、Z m U b i 1 プロモーターおよび A A D - 1 コード配列 (国際特許公開
 第 2 0 0 5 1 0 7 4 3 7 号) ならびに Z m L i p 3 ' U T R (Paek et al., (1998)
 Molecules and Cells, 8(3): 336-342) を含むバイナリーベクターに組み込んだ。得られ
 たバイナリーを、制限酵素消化および配列決定反応を介して確認した (図 1 2、p D A B

30

40

50

1 1 3 1 1 7 ; 図 1 3 、 p D A B 1 1 3 1 1 8 ; 図 1 4 、 p D A B 1 1 3 1 1 9 ; 図 1 5 、 p D A B 1 1 3 1 2 0 ; 図 1 6 、 p D A B 1 1 3 1 2 1 ; 図 3 1 、 p D A B 1 2 0 4 0 0 ; 図 3 2 、 p D A B 1 2 0 4 0 4 ; 図 3 3 、 p D A B 1 2 0 4 0 1 ; および図 3 4 、 p D A B 1 2 0 4 0 2) 。

【実施例 4】

【0169】

一過性発現試験

未成熟トウモロコシ (B 1 0 4) 胚の微粒子銃を用いて一過性発現を試験した。銃のために、ペトリ皿で 1 処理当たり、40 個の胚を使用した。微粒子銃の一晩のインキュベーションの後、YFP 像分析を行った。図 1 9 は、新規なプロモーターから得られた YFP 発現レベルを示している。データは、新規なプロモーター (p D A B 1 1 3 1 0 3 、 p D A B 1 1 3 1 0 4 および p D A B 1 1 3 1 0 5) から得られた YFP 発現レベルが、顕微鏡下で目視により観察されるように Z M U b i 1 プロモーター (p D A B 1 1 3 1 0 6) および O S A c t 1 プロモーター (p D A B 1 1 3 1 0 7) から得られた YFP 発現レベルに匹敵することを示している。植物組織を L e i c a E L 6 0 0 0 - 水銀メタルハライド (商標) 顕微鏡で画像化した。共焦点および微分干渉 (D I C) 像を C h r o m a 4 2 0 0 3 - Z s Y e l l o w 1 (商標) フィルタを用いて取り込んだ。

10

【実施例 5】

【0170】

リアルタイム T a q M a n (登録商標) P C R を用いた導入遺伝子コピー数推定

20

加水分解プローブアッセイを介して、トランスジェニックトウモロコシ (Z. mays) 植物のゲノム内への y f p 導入遺伝子の安定な取り込みを確認した。カルスから発達した安定に形質転換されたトランスジェニックトウモロコシ (Z. mays) 小植物を得て、分析して低コピー数 (1 ~ 2 コピー) の全長 T 鎖インサートを含むイベントを同定した。同定した小植物を温室に進め、成長させた。

【0171】

R o c h e L i g h t C y c l e r 4 8 0 (商標) システムを使用して導入遺伝子コピー数を測定した。この方法は、単一アッセイで y f p 遺伝子および内因性トウモロコシ (Z. mays) 参照遺伝子、インベルターゼ (G e n B a n k 登録番号 U 1 6 1 2 3 . 1) に特異的なオリゴヌクレオチドを使用する二重 T a q M a n (登録商標) 反応を利用した。既知のコピー数標準物質と比べて、インベルターゼ特異的蛍光に対する y f p 特異的蛍光の強度を測定することによって、コピー数および接合状態を決定した。

30

【0172】

y f p 遺伝子特異的 D N A フラグメントを、F A M (商標) 蛍光色素で標識したプローブを含む 1 つの T a q M a n (登録商標) プライマー / プローブセットを用いて増幅し、インベルターゼを、H E X (商標) 蛍光で標識したプローブを含む第 2 の T a q M a n (登録商標) プライマー / プローブセットを用いて増幅した (表 2) 。 P C R 反応混合物を表 3 に示されるように調製し、遺伝子特異的 D N A フラグメントを表 4 に示される条件にしたがって増幅した。既知のコピー数標準物質と比べて、参照遺伝子、インベルターゼに特異的な蛍光に対するレポーター遺伝子、y f p に特異的な蛍光の相対強度を測定することによって、試料のコピー数および接合状態を決定した。

40

【0173】

【表 2】

表 2: 順方向および逆方向ヌクレオチドプライマーならびに蛍光プローブ

	プライマー/プローブ	配列
PhiYFP v3	順方向プライマー	(配列番号 28) CGTGTTGGGAAAGAACTTGGA
PhiYFP v3	逆方向プライマー	(配列番号 29) CCGTGGTTGGCTTGGTCT
PhiYFP v3	プローブ	(配列番号 30) 5'FAM/ CACTCCCCACTGCCT /MGB_BHQ_1/3'
インベルターゼ	順方向プライマー	(配列番号 31) TGGCGGACGACGACTTGT
インベルターゼ	逆方向プライマー	(配列番号 32) AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
インベルターゼ	プローブ	(配列番号 33) 5'HEX/ CGAGCAGACCGCCGTGTACTT /3BHQ_1/3'

10

(Integrated DNA Technologies、Coralville、IA により合成された)

【0174】

【表 3】

表 3: Taqman(登録商標)PCR 反応混合物

成分	作用濃度	最終濃度	体積(μl)
水	-	-	0.5
Roche LightCycler480 プローブマスター ミックス	2X	1X	5
PhiYFP v3 F	10 μM	400nM	0.4
PhiYFP v3 R	10 μM	400nM	0.4
PhiYFP v3 プローブ FAM	5 μM	200nM	0.4
インベルターゼ F	10 μM	400nM	0.4
インベルターゼ R	10 μM	400nM	0.4
インベルターゼプ ローブ Hex	5 μM	200nM	0.4
ポリビニルピロリ ドン(PVP)	10%	0.1%	0.1
ゲノム DNA 鋳型	希釈した BioCel DNA(約 5ng μl)	約 10ng/μL	2
総反応体積	-	-	10.0

20

30

【0175】

40

【表 4】

表 4: PCR 増幅のためのサーモサイクラー条件

PCR ステップ	温度(℃)	時間	サイクル数
ステップ 1	95	10 分	1
ステップ 2	95	10 秒	40
	58	35 秒	
	72	1 秒	
ステップ 3	40	秒	1

10

【0176】

ベクター、pDAB108706をトウモロコシ(Z. mays) B104ゲノムDNA(gDNA)に希釈して既知の関係のpDAB108706:gDNAを有する標準物質を得ることによって標準物質を創製した。例えば、トウモロコシ(Z. mays) B104 gDNA 1コピー当たり1、2および4コピーのベクターDNAを有する試料を調製した。トウモロコシ(Z. mays) B104 gDNA標準物質と混合したpDAB108706の1および2コピー希釈を、半接合性であることが知られている対照トウモロコシ(Z. mays) イベントおよびホモ接合性であることが知られている対照トウモロコシ(Z. mays) イベント(トウモロコシ(Z. mays) イベント278; PCT国際特許公開番号WO2011/022469A2参照)に対して検証した。AAD1についてはFAM蛍光色素で標識したプローブを含む1つのTaqMan(登録商標)プライマー/プローブセットを用いて遺伝子特異的DNAフラグメントを増幅および検出することによって、またインペルターゼについてはHEX(商標)蛍光で標識したプローブを含む第2のTaqMan(登録商標)プライマー/プローブセットを用いて遺伝子特異的DNAフラグメントを増幅および検出することによって、AAD1遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドおよび内因性トウモロコシ(Z. mays) 参照遺伝子、インペルターゼに特異的なオリゴヌクレオチドを利用するTaqMan(登録商標)二重アッセイを行った(表2)。AAD1 TaqMan(登録商標)反応混合物を表3に示されるように調製し、特異的フラグメントを表4に示される条件にしたがって増幅した。

20

30

【0177】

各反応について生成した蛍光レベルを、製造業者の指示にしたがってRoche LightCycler(登録商標)480サーモサイクラーを用いて分析した。FAM(商標)蛍光部分を465/510nmの光学濃度で励起し、HEX(商標)蛍光部分を533/580nmの光学濃度で励起した。未知の試料についての標的/基準値(LightCycler(登録商標)480による出力)を、4つの既知のコピー数標準物質の標的/基準値(ゼロ、1コピー(半)、2コピー(ホモ)および4コピー)と比較することによって、コピー数を決定した。異なるプロモーター構築物による形質転換を介して得られたトランスジェニック植物の導入遺伝子コピー数分析の結果を表5に示す。1~2コピーのyfp導入遺伝子を有する植物のみをさらなる発現解析のために温室に移した。

40

【0178】

【表 5】

表 5: 本明細書に記載されるプロモーター構築物および対照構築物から得られたトランスジェニック植物の導入遺伝子コピー数の推定

構築物	陽性イベント数	1~2 コピーの yfp
pDAB113117	32	17
pDAB113118	26	13
pDAB113119	30	16
pDAB113120	43	10
pDAB113121	36	19

10

【実施例 6】

【0179】

ユビキチンプロモーターと作動可能に連結している遺伝子の発現タンパク質抽出

葉 ELISA アッセイを用いて、 T_0 植物を V4 ~ 5 でサンプリングした。試料を 96 ウェル収集管プレートに回収し、4 枚の葉ディスク（紙の穴あけ器のサイズ）を各試料について取った。2 つの 4.5 mm BB および 200 μ L 抽出緩衝液 [0.05% Tween（登録商標）- 20 および 0.05% BSA（Millipore Probumin（登録商標）、EMD Millipore Corp.、Billerica、MA）を補充した 1 $\times$ PBS] を各管に添加した。AAD1 抽出のために、BSA の濃度を 0.5% に増加させた。プレートを、全速力で 3 分間、KLECO ビーズミルで処理した。抽出緩衝液をさらに 200 μ L を各管に添加し、引き続いて反転させて混合した。プレートを 3000 rpm で 5 分間回転させた。上清を氷上で保管したディーブウェル 96 の対応するウェルに移した。

20

【0180】

YFP および AAD1 ELISA 手順

Nunc（登録商標）96 ウェル Maxi-Sorp Plate（Thermo Fisher Scientific Inc.、Rockford、IL）を ELISA に使用した。プレートをマウスモノクローナル抗 YFP 捕捉抗体（OriGene Technologies Inc.、Rockville、MD）で被覆した。抗体を PBS に希釈し（1 μ g/mL）、1 ウェル当たり希釈 PBS 150 μ L を添加した。プレートを 4 で一晩インキュベートした。洗浄緩衝液 [0.05% Tween（登録商標）- 20（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）を補充した 1 $\times$ PBS] 350 μ L で 4 回洗浄する前に、一晩プレートを室温で 20 ~ 30 分間維持した。プレートを 1 ウェル当たりブロッキング緩衝液 [0.05% Tween（登録商標）- 20 + 0.5% BSA（Millipore Probumin（登録商標））を補充した 1 $\times$ PBS] 200 μ L を用いて +37 で最小 1 時間ブロッキングし、引き続いて洗浄緩衝液（Tomtec QuadraWash（商標）2、Tomtec, Inc.、Hamden、CT）350 μ L で 4 回洗浄した。

30

40

【0181】

YFP ELISA のために、Evrogen 組換え Phi-YFP 1 mg/mL（Axxora LLC、Farmingdale、NY）を標準物質として使用した。5 パラメータ当てはめ標準曲線（1 ng/mL ~ 0.125 ng/mL の間の標準物質）を使用して全てのデータが曲線の直線部に入ることを保証した。標準物質または試料 100 μ L をウェルに添加した。試料のアッセイ緩衝液への最小 1 : 4 希釈を使用した。プレートをプレートシェーカー（250 rpm; Titer Plate シェーカー）上室温で 1 時間インキュベートし、引き続いて洗浄緩衝液（Tomtec QuadraWash（商標）2）350 μ L で 4 回洗浄した。1 μ g/mL の Evrogen ウサギポリクロ

50

ーナル抗 P h i Y F P 一次抗体 (A x x o r a) 約 1 0 0 μ L を各ウェルに添加した。プレート を 2 5 0 r p m のプレートシェーカー上室温で 1 時間インキュベートし、引き続いて洗浄緩衝液 (T o m t e c Q u a d r a W a s h (商標) 2) 3 5 0 μ L で 4 回洗浄した。次に、ブロッキング / アッセイ緩衝液に 1 : 5 0 0 0 希釈した抗ウサギ I g G H R P 二次抗体 (T h e r m o S c i e n t i f i c) 1 0 0 μ L を各ウェルに添加した。プレート を 2 5 0 r p m のプレートシェーカー上室温で 1 時間インキュベートし、引き続いて洗浄緩衝液 (T o m t e c Q u a d r a W a s h (商標) 2) 3 5 0 μ L で 4 回洗浄した。P i e r c e 1 ステップ U l t r a T M B E L I S A (T h e r m o S c i e n t i f i c) 基質 1 0 0 μ L を穏やかに振盪しながら 1 0 分間ウェルに添加した。0 . 4 N H ₂ S O ₄ 5 0 μ L を添加することによって、反応を停止した。6 5 0 n m 基準フィルタを用いて 4 5 0 n m で吸光度を読み取った。 10

【 0 1 8 2 】

A c a d i a B i o S c i e n c e s (P o r t l a n d , M E) のキットを用いて、E L I S A によって A A D 1 発現レベルを測定した。抽出物の複数希釈を用いて、また供給業者によって提供される試薬および指示を用いて、E L I S A を行った。T h e r m o S c i e n t i f i c によって供給された 6 6 0 n m タンパク質アッセイ試薬を用いておよび供給業者の指示にしたがって行った全可溶性タンパク質アッセイを用いて、タンパク質レベルを正規化した。

【 実施例 7 】

【 0 1 8 3 】

ユビキチンプロモーターと作動可能に連結している遺伝子の安定発現を例示する全植物 Y F P 画像解析 20

低コピー数のバイナリープラスミドを含む全植物を温室で育てた。植物組織を L e i c a E L 6 0 0 0 - 水銀メタルハライド (商標) 顕微鏡で画像化した。共焦点および微分干渉 (D I C) 像を C h r o m a 4 2 0 0 3 - Z s Y e l l o w 1 (商標) フィルタを用いて取り込んだ。本明細書に記載されるミナトカモジグサ (Brachypodium distachyon) ユビキチン 1 C 、ミナトカモジグサ (Brachypodium distachyon) ユビキチン 1 およびアワ (Setaria italica) ユビキチン 2 プロモーターで形質転換したトウモロコシ (Z . m a y s) 胚から得たトランスジェニック T₀ トウモロコシ植物のカルスおよび根組織中での Y F P の安定な発現の代表的な例を、図 2 0 および図 2 1 にそれぞれ提示する。プロモーターは、カルス (図 2 0) と根 (図 2 1) 植物組織の両方で y f p コード配列の強い発現を駆動した。 30

【 実施例 8 】

【 0 1 8 4 】

ユビキチンプロモーターと作動可能に連結している遺伝子の全植物 T₀ 安定発現

発現した Y F P タンパク質の E L I S A 解析から、追加のデータを作成した。E L I S A 解析により、新規なプロモーターが導入遺伝子の強い発現を駆動することがさらに確認された。新規なプロモーター構築物を含むトランスジェニック植物から得られた Y F P タンパク質の定量的測定を図 1 7 および表 6 に示す。データは、新規なプロモーター (p D A B 1 1 3 1 1 7 、 p D A B 1 1 3 1 1 8 および p D A B 1 1 3 1 1 9) を含む植物中での Y F P タンパク質の発現が、O s A c t 1 (イネアクチン 1) プロモーター (p D A B 1 1 3 1 2 0) から得られた Y F P 発現よりも数倍高いことを示している。比較してみると、図 1 8 および表 7 は、類似のレベルの A A D 1 発現が全ての構築物から得られたことを示している。これは、A A D 1 が構築物の全てについて Z m U b i 1 プロモーターによって駆動されているためと予想される。 40

【 0 1 8 5 】

【表 6】

表 6: 異種間ユビキチンプロモーターT₀葉 YFP 発現

構築物	平均値(ng/mg TSP)	統計的有意性
pDAB113121	144.00173	A
pDAB113118	92.37256	AB
pDAB113119	65.30393	B
pDAB113117	55.24345	B
pDAB113120	12.77181	B

10

同じ文字で連結されていないレベルは有意に異なる

【0186】

【表 7】

表 7: 異種間ユビキチンプロモーターT₀葉 AAD1 発現

構築物	平均値(ng/mg TSP)	統計的有意性
pDAB113121	119.06932	A
pDAB113118	109.19796	A
pDAB113119	96.29021	A
pDAB113117	85.40412	A
pDAB113120	83.81594	A

20

同じ文字で連結されていないレベルは有意に異なる

【実施例 9】

【0187】

ユビキチンプロモーターおよび 3' UTR と作動可能に連結している遺伝子の全植物 T₁ 安定発現

30

T₀ 単一導入遺伝子コピー植物を、野生型 B104 トウモロコシ植物と戻し交雑して T₁ 種子を得た。半接合性 T₁ 植物を分析に使用した。V4 および V12 葉発現について 1 構築物当たり 5 つのイベントおよび 1 イベント当たり 5 ~ 10 個の植物を使用した。他の組織型発現については、1 構築物当たり 3 つのイベントおよび 1 イベント当たり 3 個の植物を使用した。接合状態分析を AAD1 / YFP について行った。

【0188】

新規なプロモーター構築物を含む T₁ トランスジェニック植物の葉組織から得られた YFP タンパク質の定量的測定を表 8 に示す。データにより、T₀ 葉発現結果が確認され、YFP タンパク質の一貫して高い発現が新規なプロモーター (pDAB113117、pDAB113118 および pDAB113119) を含む植物の V4、V12 および R3 葉組織で得られることがさらに示された。表 8 はまた、この新規なプロモーターを、PinII 3' UTR (pDAB113117、pDAB113118 および pDAB113119) の代わりに、その天然 3' UTR (pDAB120400、pDAB12401 および pDAB120402) と組み合わせて使用すると、YFP タンパク質の発現が数倍増加したことを示している。YFP タンパク質発現は、構築物 pDAB120404 を含む植物から検出され、この構築物に使用されている新規なプロモーターおよび 3' UTR が導入遺伝子の発現を駆動することを確認している。

40

【0189】

【表 8】

表 8: 異種間ユビキチンプロモーターおよび 3'UTR T ₁ 葉発現				
構築物	イベント	平均値 YFP (ng/mg TSP)		
		V4 葉	V12 葉	R3 葉
pDAB113117	pDAB113117[1]-006	44.0	169.4	2108.3
pDAB113117	pDAB113117[1]-007	44.8	181.4	2582.7
pDAB113117	pDAB113117[1]-008	79.6	322.8	4096.3
pDAB113117	pDAB113117[1]-019	74.3	369.1	3420.3
pDAB113117	pDAB113117[1]-028	34.2	168.2	2164.1
pDAB113118	pDAB113118[1]-005	33.6	148.8	2094.7
pDAB113118	pDAB113118[1]-007	54.9	180.1	2171.4
pDAB113118	pDAB113118[1]-010		138.0	2748.2
pDAB113118	pDAB113118[1]-023	46.2	156.6	2216.8
pDAB113118	pDAB113118[1]-025	41.7	132.9	2071.4
pDAB113119	pDAB113119[1]-001	133.1	436.0	6744.0
pDAB113119	pDAB113119[1]-005	49.2	138.6	1772.9
pDAB113119	pDAB113119[1]-011	54.6	133.9	1415.5
pDAB113119	pDAB113119[1]-013		129.1	1807.7
pDAB113119	pDAB113119[1]-028	38.5	129.9	1632.8
pDAB113120	pDAB113120[1]-005	9.8	69.6	493.5
pDAB113120	pDAB113120[1]-010	24.3	74.5	638.3
pDAB113120	pDAB113120[1]-014	17.2	79.7	552.4
pDAB113120	pDAB113120[1]-023	13.2	55.4	372.2
pDAB113120	pDAB113120[1]-032	12.5	69.6	233.7
pDAB113121	pDAB113121[1]-008	327.9		
pDAB113121	pDAB113121[1]-011	166.2	271.2	4472.6
pDAB113121	pDAB113121[1]-018	128.2	362.0	7116.3
pDAB113121	pDAB113121[1]-023	112.2	309.1	6813.7
pDAB113121	pDAB113121[1]-026	118.7	311.7	6300.7
pDAB120400	pDAB120400[1]-001	640.8182		
pDAB120400	pDAB120400[1]-002	339.24463		
pDAB120400	pDAB120400[1]-004	943.96511		
pDAB120400	pDAB120400[1]-007	1653.7402		
pDAB120400	pDAB120400[1]-024	466.01906		
pDAB120401	pDAB120401[1]-001	833.04373		
pDAB120401	pDAB120401[1]-011	471.9103		
pDAB120401	pDAB120401[1]-019	795.08285		
pDAB120401	pDAB120401[1]-022	721.58288		
pDAB120401	pDAB120401[1]-025	696.94286		
pDAB120402	pDAB120402[1]-010	750.82185		
pDAB120402	pDAB120402[1]-011	619.38603		
pDAB120402	pDAB120402[1]-014	618.98144		
pDAB120402	pDAB120402[1]-030	625.84385		
pDAB120404	pDAB120404[1]-003	44.088479		
pDAB120404	pDAB120404[1]-013	47.464389		
pDAB120404	pDAB120404[1]-014	52.204801		
pDAB120404	pDAB120404[1]-016	45.397854		
pDAB120404	pDAB120404[1]-020	46.913279		

10

20

30

40

【 0 1 9 0 】

Y F P を駆動する新規なユビキチンプロモーターを含むトランスジェニックトウモロコ

50

シ植物から採取した穂軸、殻、仁、花粉、根、ひげおよび茎を含む種々の組織型で、高い YFP タンパク質発現が見られた (表 9)。これらのデータは、ここで請求される新規なプロモーターおよび 3' UTR が植物における導入遺伝子の高い構成的発現を駆動し、生物工学用途に有用となることを証明している。

【 0 1 9 1 】

【 表 9 】

表 9: 異なる組織型における異種間ユビキチンプロモーターT1 発現

構築物	イベント	平均値 YFP (ng/mg TSP)						
		穂軸	殻	仁	花粉	V12 根	ひげ	茎
pDAB113117	pDAB113117[1]-006	3452.1	1164.3	1341.2	397.1	2292.7	1405.0	7279.8
pDAB113117	pDAB113117[1]-007	2519.6	954.7	1410.9	414.3	2245.6	1974.3	6179.0
pDAB113117	pDAB113117[1]-019	8362.3	2280.8	2829.6	749.5	7112.4	4790.2	13044.1
pDAB113118	pDAB113118[1]-005	2801.6	620.9	886.3	782.2	1136.1	636.7	1953.6
pDAB113118	pDAB113118[1]-007	2339.2	524.9	725.1	376.1	1495.6	1271.0	2806.9
pDAB113118	pDAB113118[1]-023	1302.1	491.8	716.8	435.3	1193.0	829.1	1522.9
pDAB113119	pDAB113119[1]-011				399.7	1025.9	942.2	2475.6
pDAB113119	pDAB113119[1]-013	2238.1	572.0	1050.5	438.1	1311.2	539.7	2235.2
pDAB113119	pDAB113119[1]-028	2013.9	536.4	1061.4	450.0	1166.3	826.9	1912.5
pDAB113120	pDAB113120[1]-005	1166.8	310.5	514.0	1704.1	169.7	322.1	739.3
pDAB113120	pDAB113120[1]-023	1096.4	531.9	845.8	1433.9	268.4	572.2	877.9
pDAB113120	pDAB113120[1]-032	1344.1	587.8	985.1	1252.3	187.6	472.4	694.0
pDAB113121	pDAB113121[1]-011	6779.1	2942.3	3452.6	2022.6	5834.0	2881.7	7445.5
pDAB113121	pDAB113121[1]-023	4830.0	2689.8	1913.7	1641.8	2547.7	2453.8	8295.9
pDAB113121	pDAB113121[1]-026	8186.2	3889.3	4432.3	1432.0	2521.9	2182.5	7760.7

10

20

30

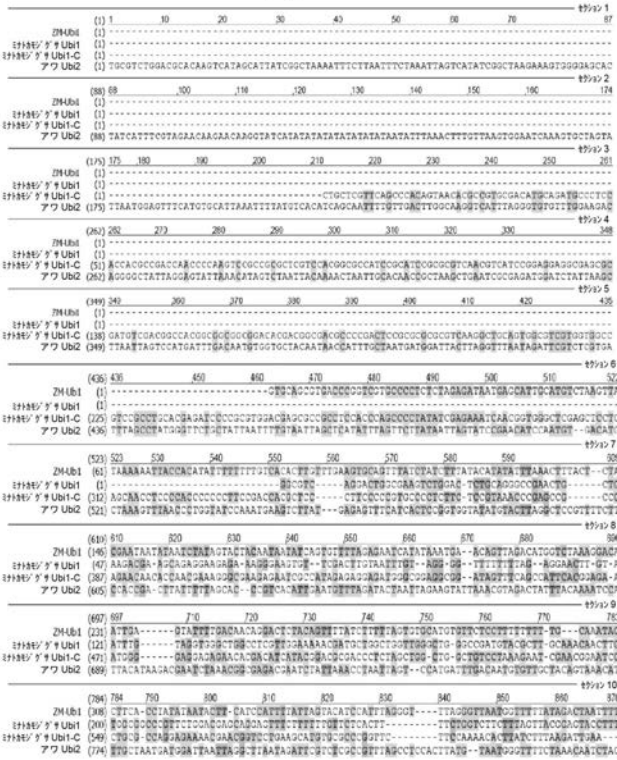
【 0 1 9 2 】

本明細書で引用される刊行物、特許および特許出願を含む全ての参考文献は、本開示の明示的詳細と矛盾しない程度に参照により本明細書に組み込まれ、そのため、あたかも各参考文献が個別的かつ具体的に参照により組み込まれることが示されており、本明細書に全体が示されているのと同程度に組み込まれる。本明細書に論じられる参考文献は、本出願の出願日前より前のその開示についてのみ提供される。本明細書中のいずれも、本発明者らが先行発明によってこのような開示に先立つ権利がないことの自認と解釈すべきでない。以下の実施例は、特定の特徴および/または実施形態を例示するために提供されるものである。実施例は、本開示を例示される特定の特徴または実施形態に限定するものと解釈されるべきでない。

40

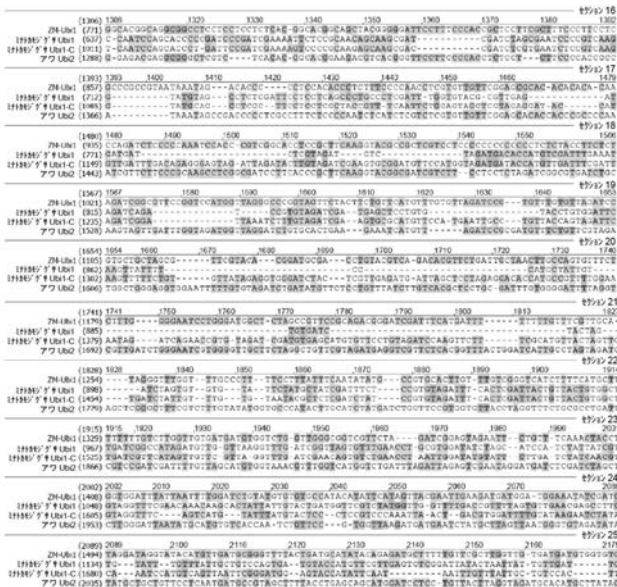
【 図 2 - 1 】

图 2



【 図 2 - 3 】

図 2 続き

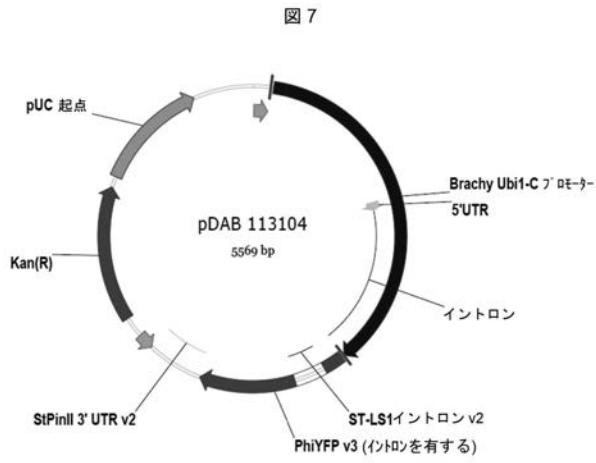


【 図 2 - 4 】

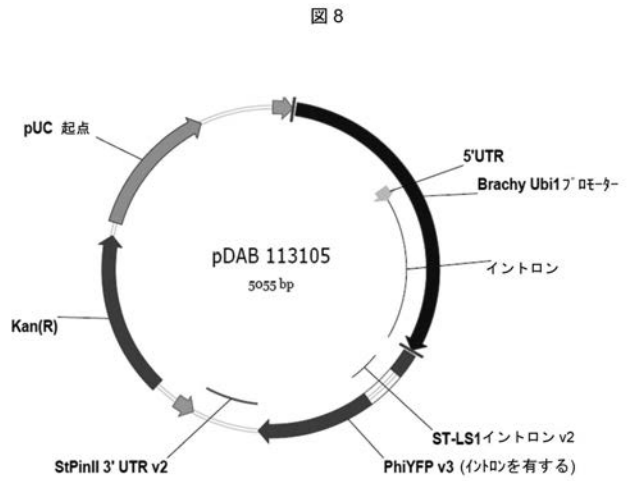
図 2 続き

(2176) 2176	2180	2184	2188	2192	2196	2200	2204	2208	2212	2216	2220	2224	2228	2232	2236	2240	2244	2248	2252	2256	2260	2264	2268	2272	2276	2280	2284	2288	2292	2296	2300	2304	2308	2312	2316	2320	2324	2328	2332	2336	2340	2344	2348	2352	2356	2360	2364	2368	2372	2376	2380	2384	2388	2392	2396	2400	2404	2408	2412	2416	2420	2424	2428	2432	2436	2440	2444	2448	2452	2456	2460	2464	2468	2472	2476	2480	2484	2488	2492	2496	2500	2504	2508	2512	2516	2520	2524	2528	2532	2536	2540	2544	2548	2552	2556	2560	2564	2568	2572	2576	2580	2584	2588	2592	2596	2600	2604	2608	2612	2616	2620	2624	2628	2632	2636	2640	2644	2648	2652	2656	2660	2664	2668	2672	2676	2680	2684	2688	2692	2696	2700	2704	2708	2712	2716	2720	2724	2728	2732	2736	2740	2744	2748	2752	2756	2760	2764	2768	2772	2776	2780	2784	2788	2792	2796	2800	2804	2808	2812	2816	2820	2824	2828	2832	2836	2840	2844	2848	2852	2856	2860	2864	2868	2872	2876	2880	2884	2888	2892	2896	2900	2904	2908	2912	2916	2920	2924	2928	2932	2936	2940	2944	2948	2952	2956	2960	2964	2968	2972	2976	2980	2984	2988	2992	2996	3000	3004	3008	3012	3016	3020	3024	3028	3032	3036	3040	3044	3048	3052	3056	3060	3064	3068	3072	3076	3080	3084	3088	3092	3096	3100	3104	3108	3112	3116	3120	3124	3128	3132	3136	3140	3144	3148	3152	3156	3160	3164	3168	3172	3176	3180	3184	3188	3192	3196	3200	3204	3208	3212	3216	3220	3224	3228	3232	3236	3240	3244	3248	3252	3256	3260	3264	3268	3272	3276	3280	3284	3288	3292	3296	3300	3304	3308	3312	3316	3320	3324	3328	3332	3336	3340	3344	3348	3352	3356	3360	3364	3368	3372	3376	3380	3384	3388	3392	3396	3400	3404	3408	3412	3416	3420	3424	3428	3432	3436	3440	3444	3448	3452	3456	3460	3464	3468	3472	3476	3480	3484	3488	3492	3496	3500	3504	3508	3512	3516	3520	3524	3528	3532	3536	3540	3544	3548	3552	3556	3560	3564	3568	3572	3576	3580	3584	3588	3592	3596	3600	3604	3608	3612	3616	3620	3624	3628	3632	3636	3640	3644	3648	3652	3656	3660	3664	3668	3672	3676	3680	3684	3688	3692	3696	3700	3704	3708	3712	3716	3720	3724	3728	3732	3736	3740	3744	3748	3752	3756	3760	3764	3768	3772	3776	3780	3784	3788	3792	3796	3800	3804	3808	3812	3816	3820	3824	3828	3832	3836	3840	3844	3848	3852	3856	3860	3864	3868	3872	3876	3880	3884	3888	3892	3896	3900	3904	3908	3912	3916	3920	3924	3928	3932	3936	3940	3944	3948	3952	3956	3960	3964	3968	3972	3976	3980	3984	3988	3992	3996	4000	4004	4008	4012	4016	4020	4024	4028	4032	4036	4040	4044	4048	4052	4056	4060	4064	4068	4072	4076	4080	4084	4088	4092	4096	4100	4104	4108	4112	4116	4120	4124	4128	4132	4136	4140	4144	4148	4152	4156	4160	4164	4168	4172	4176	4180	4184	4188	4192	4196	4200	4204	4208	4212	4216	4220	4224	4228	4232	4236	4240	4244	4248	4252	4256	4260	4264	4268	4272	4276	4280	4284	4288	4292	4296	4300	4304	4308	4312	4316	4320	4324	4328	4332	4336	4340	4344	4348	4352	4356	4360	4364	4368	4372	4376	4380	4384	4388	4392	4396	4400	4404	4408	4412	4416	4420	4424	4428	4432	4436	4440	4444	4448	4452	4456	4460	4464	4468	4472	4476	4480	4484	4488	4492	4496	4500	4504	4508	4512	4516	4520	4524	4528	4532	4536	4540	4544	4548	4552	4556	4560	4564	4568	4572	4576	4580	4584	4588	4592	4596	4600	4604	4608	4612	4616	4620	4624	4628	4632	4636	4640	4644	4648	4652	4656	4660	4664	4668	4672	4676	4680	4684	4688	4692	4696	4700	4704	4708	4712	4716	4720	4724	4728	4732	4736	4740	4744	4748	4752	4756	4760	4764	4768	4772	4776	4780	4784	4788	4792	4796	4800	4804	4808	4812	4816	4820	4824	4828	4832	4836	4840	4844	4848	4852	4856	4860	4864	4868	4872	4876	4880	4884	4888	4892	4896	4900	4904	4908	4912	4916	4920	4924	4928	4932	4936	4940	4944	4948	4952	4956	4960	4964	4968	4972	4976	4980	4984	4988	4992	4996	5000	5004	5008	5012	5016	5020	5024	5028	5032	5036	5040	5044	5048	5052	5056	5060	5064	5068	5072	5076	5080	5084	5088	5092	5096	5100	5104	5108	5112	5116	5120	5124	5128	5132	5136	5140	5144	5148	5152	5156	5160	5164	5168	5172	5176	5180	5184	5188	5192	5196	5200	5204	5208	5212	5216	5220	5224	5228	5232	5236	5240	5244	5248	5252	5256	5260	5264	5268	5272	5276	5280	5284	5288	5292	5296	5300	5304	5308	5312	5316	5320	5324	5328	5332	5336	5340	5344	5348	5352	5356	5360	5364	5368	5372	5376	5380	5384	5388	5392	5396	5400	5404	5408	5412	5416	5420	5424	5428	5432	5436	5440	5444	5448	5452	5456	5460	5464	5468	5472	5476	5480	5484	5488	5492	5496	5500	5504	5508	5512	5516	5520	5524	5528	5532	5536	5540	5544	5548	5552	5556	5560	5564	5568	5572	5576	5580	5584	5588	5592	5596	5600	5604	5608	5612	5616	5620	5624	5628	5632	5636	5640	5644	5648	5652	5656	5660	5664	5668	5672	5676	5680	5684	5688	5692	5696	5700	5704	5708	5712	5716	5720	5724	5728	5732	5736	5740	5744	5748	5752	5756	5760	5764	5768	5772	5776	5780	5784	5788	5792	5796	5800	5804	5808	5812	5816	5820	5824	5828	5832	5836	5840	5844	5848	5852	5856	5860	5864	5868	5872	5876	5880	5884	5888	5892	5896	5900	5904	5908	5912	5916	5920	5924	5928	5932	5936	5940	5944	5948	5952	5956	5960	5964	5968	5972	5976	5980	5984	5988	5992	5996	6000	6004	6008	6012	6016	6020	6024	6028	6032	6036	6040	6044	6048	6052	6056	6060	6064	6068	6072	6076	6080	6084	6088	6092	6096	6100	6104	6108	6112	6116	6120	6124	6128	6132	6136	6140	6144	6148	6152	6156	6160	6164	6168	6172	6176	6180	6184	6188	6192	6196	6200	6204	6208	6212	6216	6220	6224	6228	6232	6236	6240	6244	6248	6252	6256	6260	6264	6268	6272	6276	6280	6284	6288	6292	6296	6300	6304	6308	6312	6316	6320	6324	6328	6332	6336	6340	6344	6348	6352	6356	6360	6364	6368	6372	6376	6380	6384	6388	6392	6396	6400	6404	6408	6412	6416	6420	6424	6428	6432	6436	6440	6444	6448	6452	6456	6460	6464	6468	6472	6476	6480	6484	6488	6492	6496	6500	6504	6508	6512	6516	6520	6524	6528	6532	6536	6540	6544	6548	6552	6556	6560	6564	6568	6572	6576	6580	6584	6588	6592	6596	6600	6604	6608	6612	6616	6620	6624	6628	6632	6636	6640	6644	6648	6652	6656	6660	6664	6668	6672	6676	6680	6684	6688	6692	6696	6700	6704	6708	6712	6716	6720	6724	6728	6732	6736	6740	6744	6748	6752	6756	6760	6764	6768	6772	6776	6780	6784	6788	6792	6796	6800	6804	6808	6812	6816	6820	6824	6828	6832	6836	6840	6844	6848	6852	6856	6860	6864	6868	6872	6876	6880	6884	6888	6892	6896	6900	6904	6908	6912	6916	6920	6924	6928	6932	6936	6940	6944	6948	6952	6956	6960	6964	6968	6972	6976	6980	6984	6988	6992	6996	7000	7004	7008	7012	7016	7020	7024	7028	7032	7036	7040	7044	7048	7052	7056	7060	7064	7068	7072	7076	7080	7084	7088	7092	7096	7100	7104	7108	7112	7116	7120	7124	7128	7132	7136	7140	7144	7148	7152	7156	7160	7164	7168	7172	7176	7180	7184	7188	7192	7196	7200	7204	7208	7212	7216	7220	7224	7228	7232	7236	7240	7244	7248	7252	7256	7260	7264	7268	7272	7276	7280	7284	7288	7292	7296	7300	7304	7308	7312	7316	7320	7324	7328	7332	7336	7340	7344	7348	7352	7356	7360	7364	7368	7372	7376	7380	7384	7388	7392	7396	7400	7404	7408	7412	7416	7420	7424	7428	7432	7436	7440	7444	7448	7452	7456	7460	7464	7468	7472	7476	7480	7484	7488	7492	7496	7500	7504	7508	7512	7516	7520	7524	7528	7532	7536	7540	7544	7548	7552	7556	7560	7564	7568	7572	7576	
-------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	--

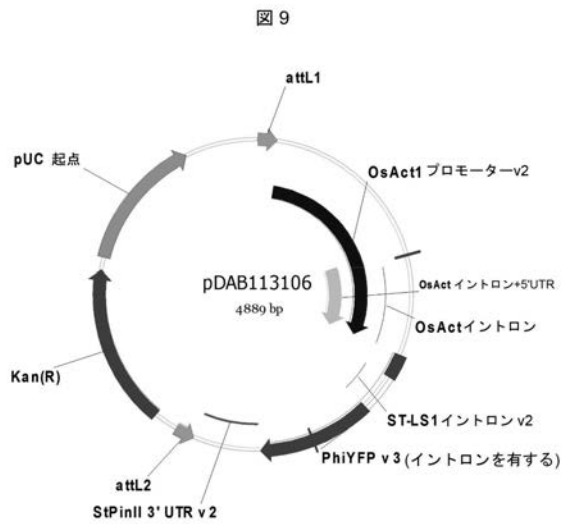
【 図 7 】



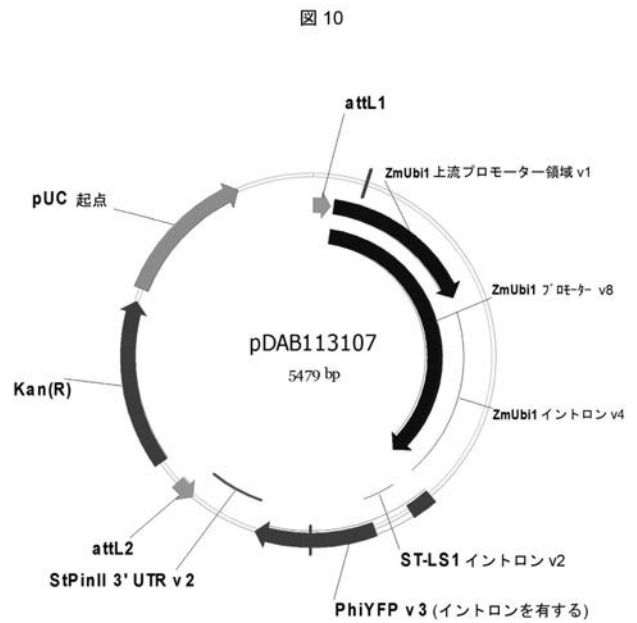
【 図 8 】



【 図 9 】

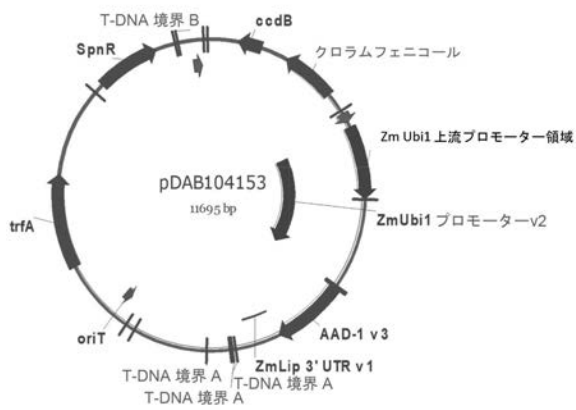


【 図 10 】



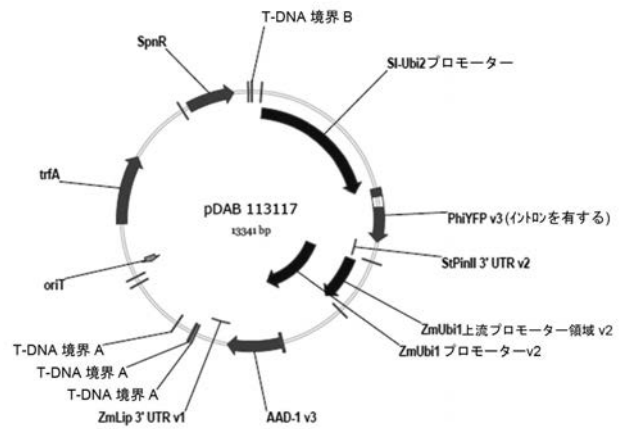
【図 1 1】

図 11



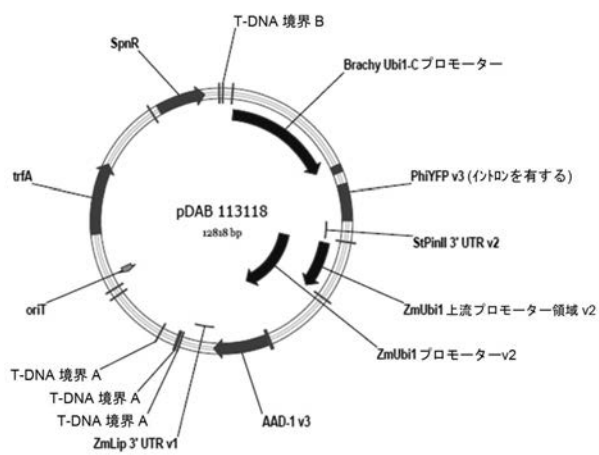
【図 1 2】

図 12



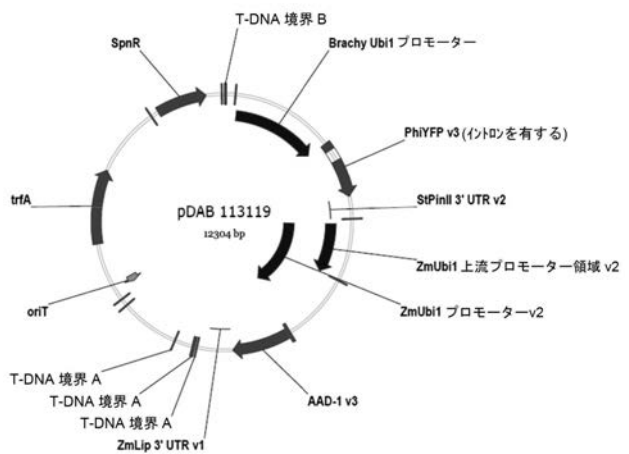
【図 1 3】

図 13



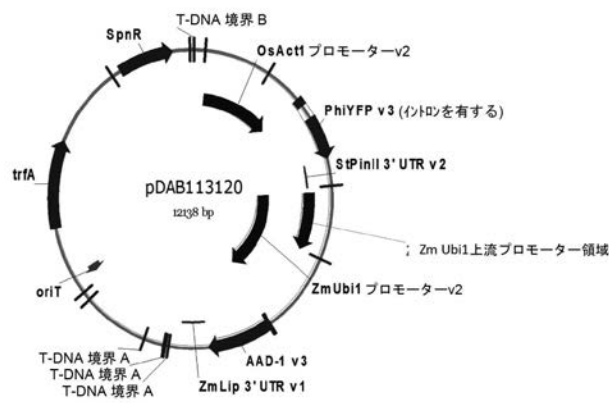
【図 1 4】

図 14



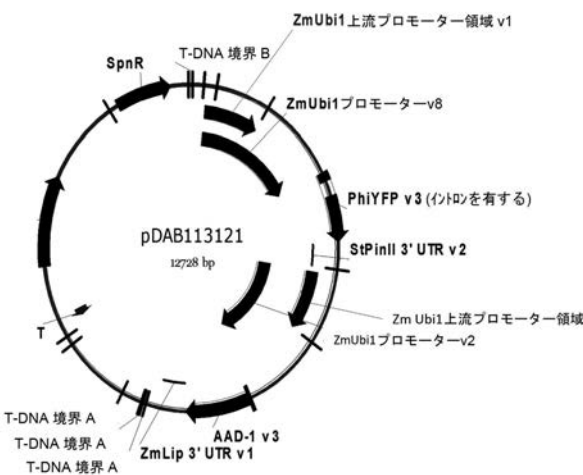
【 図 1 5 】

図 15



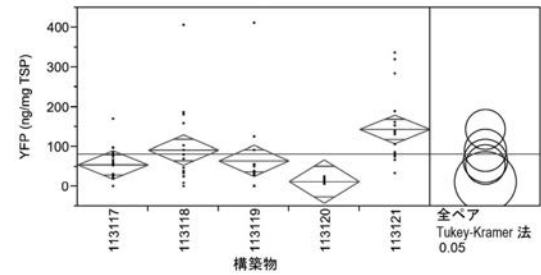
【 図 1 6 】

図 16



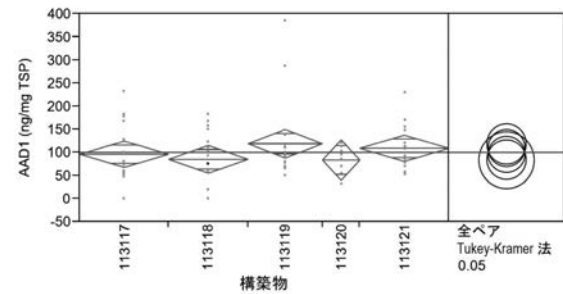
【 図 1 7 】

図 17



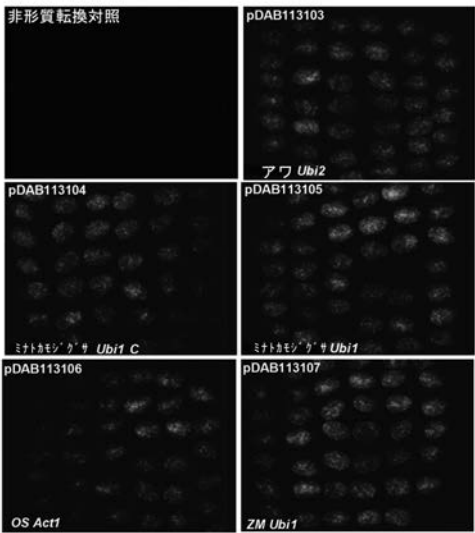
【 図 1 8 】

図 18



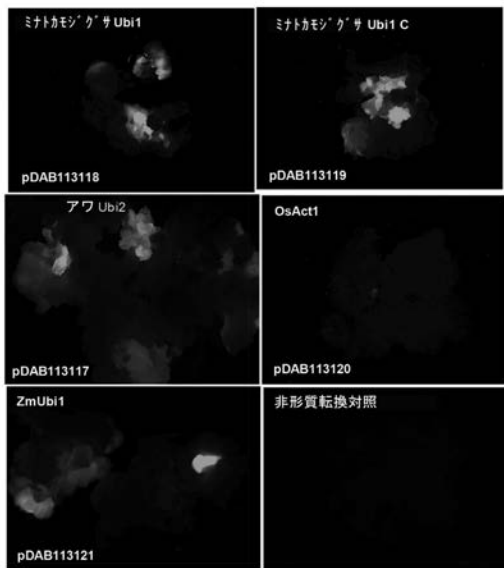
【 図 1 9 】

図 19



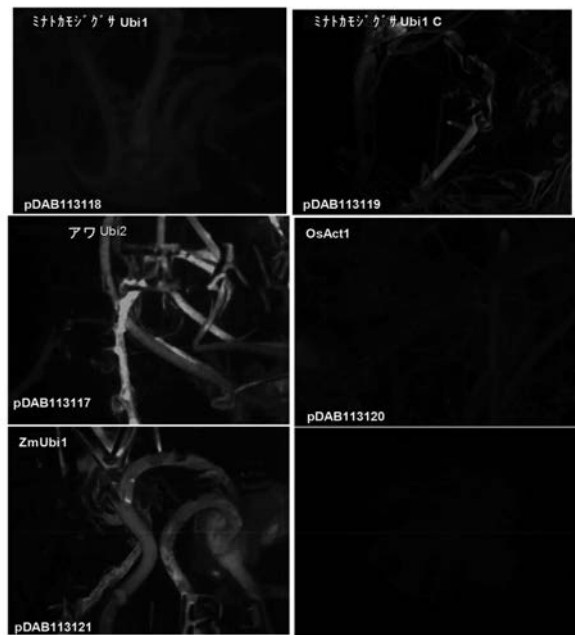
【 図 2 0 】

図 20



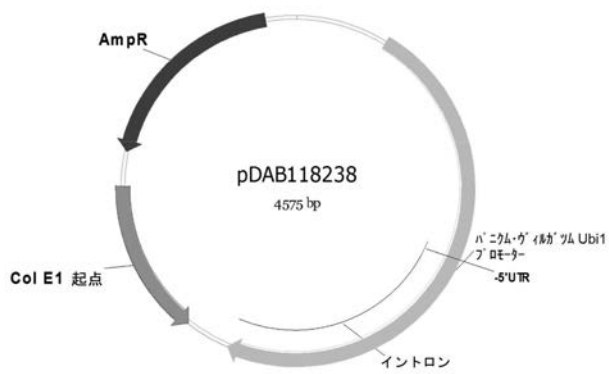
【 図 2 1 】

図 21



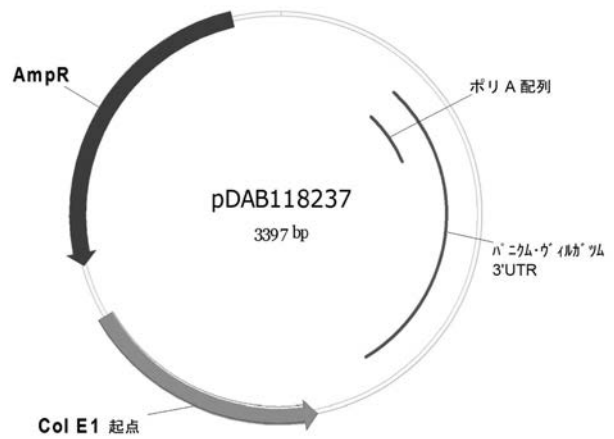
【 図 2 2 】

図 22



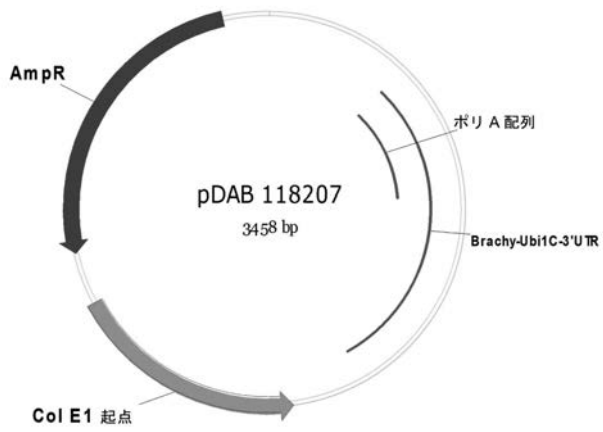
【 図 2 3 】

図 23



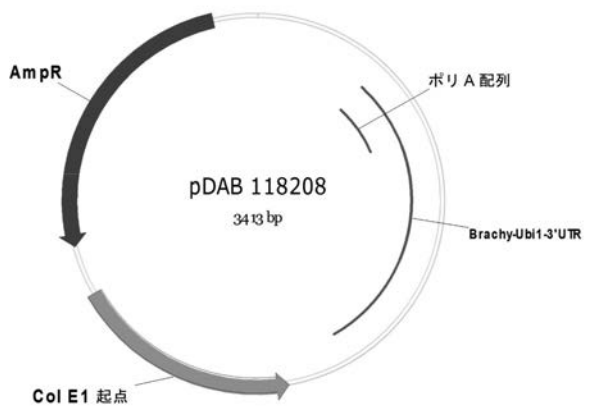
【 図 2 4 】

図 24



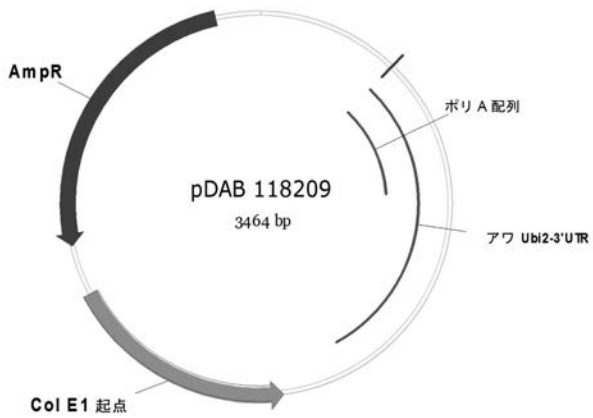
【 図 2 5 】

図 25



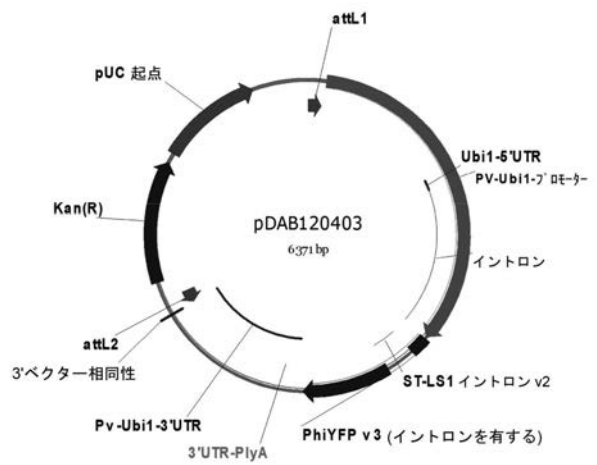
【 図 2 6 】

図 26



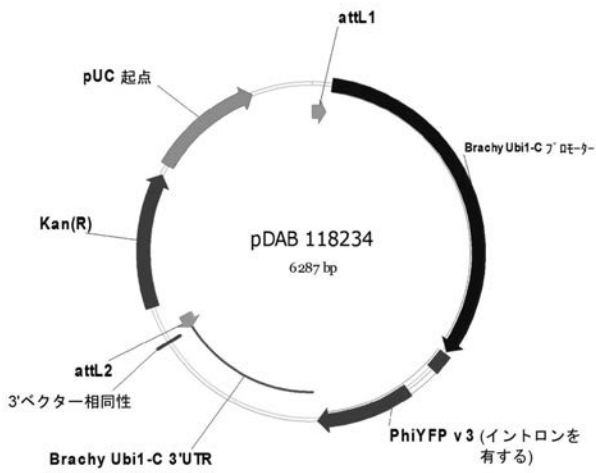
【 図 2 7 】

図 27



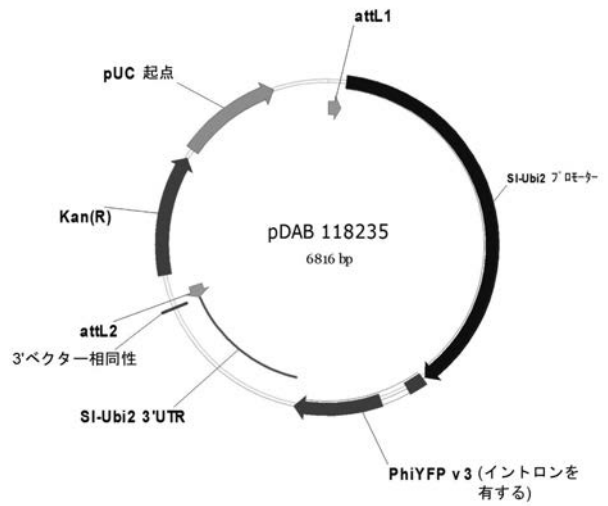
【 図 2 8 】

図 28



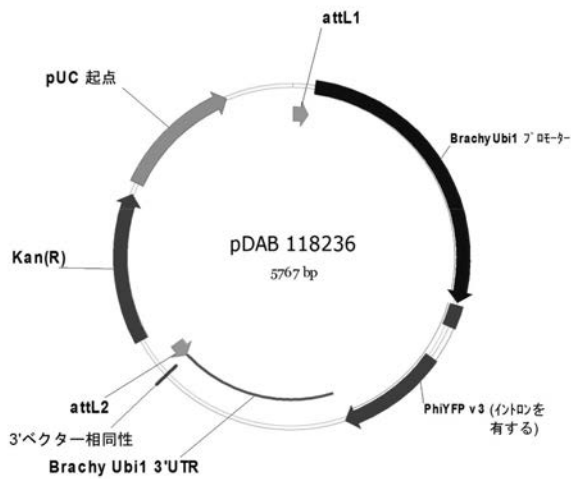
【 図 2 9 】

図 29



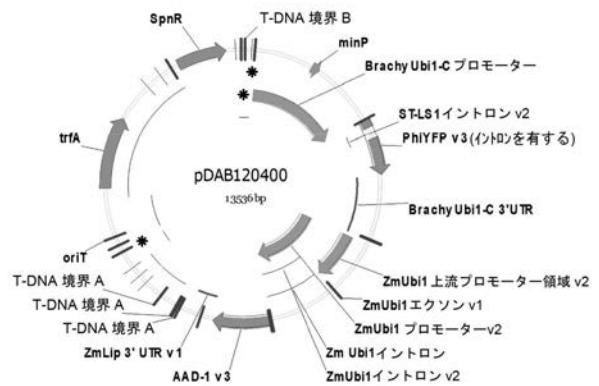
【 図 3 0 】

図 30

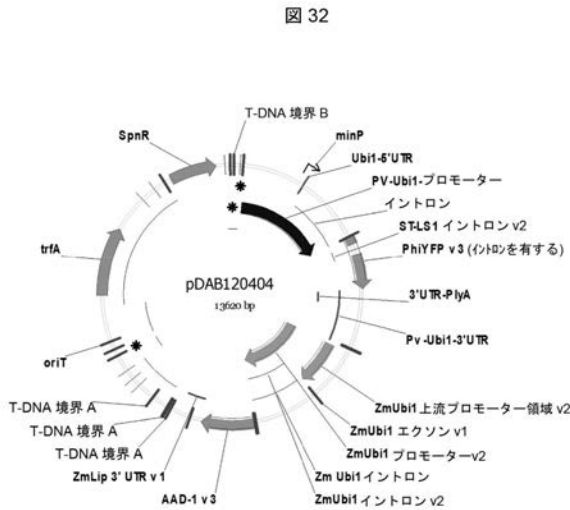


【 図 3 1 】

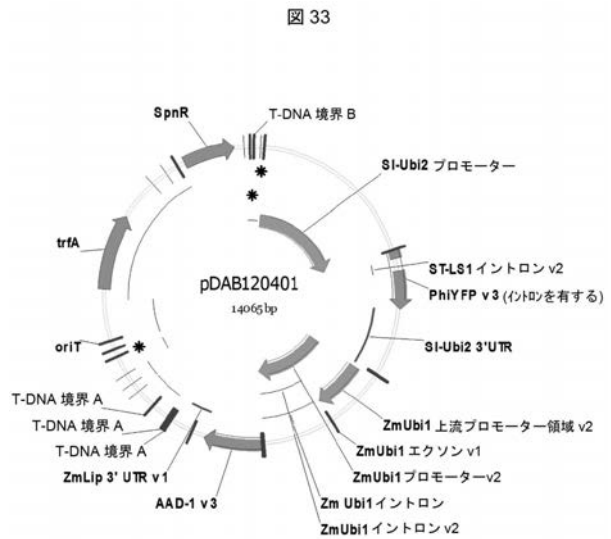
図 31



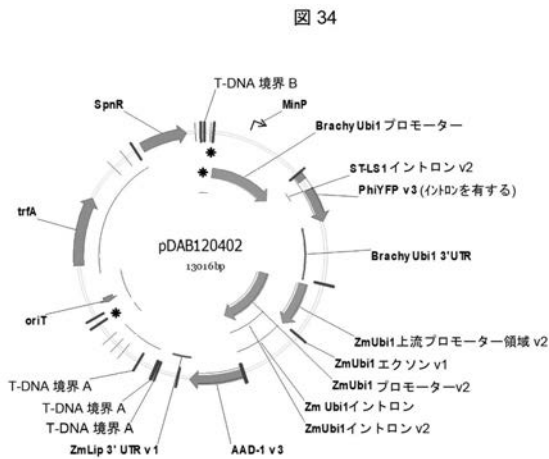
【 図 3 2 】



【 ㊦ 3 3 】



【 図 3 4 】



【 図 3 5 - 1 】

[illegible]

【図 35 - 2】

図 35 続き

atccaccctgcacctgggtgcttcgctccgtgggtggcatgcagatctttgtcaagactttgacccggaaag
accattacacctggagggttgaactcttcagacacacatcgacaacgtgaaggcgaagatccaggacaaggagg
gcattccccccagaccagcagcgcctgatcttttgcgtggaagcagcttgaggatggagcgcactctggcgga
ttataacatccagaaggagctctaccctacacctgggtgctccgctccgtgggtggccagTAAGtttgtcaa
aaactggctacagctctgctgccccctgttggtctgcccccttggaaagtgcgtgcttatgtttatgtgag
aagtgcgttgtgtctcttaacccggtactgtttgtggaacatctgctgctgcttatgtcatcgtgaa
gaactcgtgtatgaataagtgaacatgaaccttgtctgtgattacggcttcgtggttatgcgaacgttc
ttacaaacgcaattgcacctgatgtaaaactggttttgcgtgctgtatggaacaagtgcctcatgatgttc
atgcaagatgcaattccagcttttgttggttgtcatctttgtactgctgcttaccgcacataaagattgc
atcttgcttattgcttttgtgtttgtgctgctgctgctcctctgcaaccttatcaaacctttgtttag
attctctcttatagacttggttaactctcagctttacaaacgcagactgtttctgaaatttcatcgtgaa
gataaagctgatagatggagtaactaatatagacatctttocataaattgttcgggtgcagagataggag
gccccaggatctctatttaccagatgaacctacctggcgctgctacgcacatgcgcgagcaagctctg
agggtctcaatgtacacatgaaattgattttgtgctgcttttggttggtgatcgttgcatttgtctga
ttcatcagagtttaataacggatataatcagcaaatatccgcagcatccacacgcagcacacgctccggtta
acagagtcctccctgcttgcctttaaattattacggagtaactccgtattaatccttagatatgtttcgaag
gaactcaaaccttctccatctgcaaatctcagtgctcaaaactggaattagataattgaaacctctat
tcgggtgcaattcacaactgcaattgaaacgacgtctcaatttcaatttcgggttcagattccaccga
taggttgacatgatccatgatccaccattgtacaac (配列番号 19)

【図 36 - 1】

図 36

ggcgtcaggactggcgaagctcggactctgacgggcgaactgctgaagcgaagcagagggaagaaag
ggaagtgttcgactgtgaatttgtagggttttttttagaggaactgttaatttgtaggtggactggcct
cgttggaaaaacgatgctggctgggtgggtggcgatgacgcttgcaaaacacttgcggcgccgct
tctggacgagcaggagtttctttttgttctcacttttctggcttctttagttagcagagatccttttgt
tttttaaaaggagttaccttttttttaggaattctttagttacacttctgcttgcctctcaaaaaattttaa
cttctgctttttttcatttttaatttttgcacactttttagcaggtttcatgaatgcttattttccagcatat
catttatttgcagatattttttatgcgtatgtatttggacgagagcactcgggactgttcagagactgcgt
gggtgggagcggctcccaaccgctttctatctctgttgcacatccggtggcgacttggttcgctgctga
gctgtgactgaacagacttggtctcttcccactctggcactataaattcccacatcgatcgacctcc
ctttccccaatccagcaccctccgacatccgacatccgaaatttctgcacacgacgacgacgacgacgac
TCCCGTCAAGgtatgtactctcgatctcctcctcagccctgcctcgatttgggtgacgcttgaga
tgatgactctcgtagatgtctagatgacacactgtcgatttgaatagatcagatccgtgtagatcgatg
agctcctgtgactgtggattcaagttattttgcgactgctatttgtgtgactactagatctagtgctg
tgtatttctgactctcgatttctcgtgtgatttctcactcgactgcttactgtgcttgcgttgacgcca
tagatgttggtttgaggtttgactggttagtggttgaacctcgtggagatctagatccactctatttag
gtgaggtttcgaacaaacagcactatattgtactgaggttgcctctatggttggtttgacgcttt
taggttgaacgagctctctgattttgttttactgctgacagtgatgacactgttgcgtgaggtgctg
attataactaattattgttgattgataaattctgtagtttgccttctcaatttattttatcgtagctcctga
tttgctcagctgtgctcaccgctgcgactggtcaatcaacttgttagcccaactcgtcttaactatgta
catttgttgttagaatcagagatcaagcaatttagctatcttattgcttatctgttccatgttctgactg
gagtgtaacgctctacacttttgcctgctgactgtgattgataaactctgacttaaatctcatgattgacg
agtttccagatctgattgttgcttacttgcactaatatctattcatgtgacacctctctgctcttgtaacg
ttacgctgtttgtttgaatttctgactatgcagATGcagatctttgtgaagacctcactggcaaaa
ccatcacaccttgagggtcgagtcgtccgacacgatcgacaacgtcaaggcaaaagtccaggaacaaggagg
cattcctccagaccagcagcgcctcatcttttgcgtggaagcagcttgaggcagggcgccacctcgcgcag
tacaactccagaaggagtcacacctccacctggtcctgaggtccgtgggtggcagcagatctctgctca
agaccttaccggcaagaccatcagcctggaggtcgagtcctctgacacgatcgacaagtgaaggcgaa
gatccaggataaaggaggcctccccccggaacgacgagcgcctcatctttgcggcgacgagcttgaggac
ggcgttaccctcgcgactacaactccagaaggaaatccacactccatcgtggtgctcaggtcgtggtggt
gcatgcagatctctcgtcaagacctaacggcgaagaccatcactctggaggttgagtcctctgcacacgat
cgacaatttggaaggcaaaagtccaggataaaggaggcattcccccgacacgacgacgacgacgacgacg
ggcagcagcttgaggatggcgccacctggcagatataatccagaaggaaatccaccttgacactggt
gtcttcgctccgtggtggcagcagatctttgtaaagaccttgactggcaagacaatttaccctggaggt
tgagtcgtccgacacaattgacaatgtcaaggcgaagtccaggacaaggaggcattcccccgacacg
cagcgcctcatcttcgccggcgaagcagcttgaggatggtgcacaccttgacagatataatccagaagg
aatcctctgcactcgtggtgcttgcctcgcgggtggaatgcagatctcgttaagacgttgacaaggaa
gacctcacactggaggttgaattctcggacacatgacaacgtgaaggcgaagatccaggacaaggag
ggcatccccccagacagcagcgcctcatcttgcgtggaagcagcttgaggatggcgccacctctgcag
attacaacatccagaaggagtcacacctgcacctggtgctccgtctcgtggtgggagcTAAGcttctgc
gcaactgggttcaagctctgctgaccttggtggtctgcccccttagtggtcatgctctttgttatgctgct
tgctcccaactcgtgattcgtttgtggaacatctcgtgctgattagcagcttgacactcgttatgaaat
tgtgaaacctgaacctgttccgtgaatctgattgataaagtgaacctgaacctgttccgtgattat
tgtataactcgttgtgctgattg

【図 36 - 2】

図 36 続き

ttggtcgtgtgattttatgttgaactggagaaccaagttcgttcaggacatattgcaacctaaagctaa
accatgtagaactactgttctgggagacataaaacgtcatttttatgcattcgtaacatttaagcatatc
tacaataattgtattgctcttctcactcatccttgaaacatattgctctcttcagcgctctacatg
cagtggtcgcagacaacacaggccctgccagctgcttttcaattttccaattataaaccacaatagtcgg
actatggcatctgtgggtgactatgcaagatgtgtgctgacggtctctgaaacttttcccatgtatctgt
tgaaattaccagtaaaattcagcctctatttcaactcggcaggttgattttcaaacagaatgtgttttt
ttttgtctggaagctatattggtaaaataatacaaaagctggagtggtattattttccaacagatattc
aagaaaactcagtgatttatttactactgagttatataatataatcttcaagttgacttctcatattt
caaacgacatgtgagcacattgttcagtttcttaggatgtgtgtgtgctcaagggtgaattttgcaatt
ctgcccccgagtaaacactacacgtatttttttgagtgagcagtgcatttgattacaaggcaacaacaac
aaaaacctatggcaagatattcctcttagaggtgccaggatcattttgactgaactatgtaaggctgaa
gaaaagg (配列番号 20)

【図 37 - 1】

図 37

tgcgtctggacgcacaaatcatagcattatcggtcaaaatttcttaatttctaatttagtcatatcggtc
aagaaagtggggagcactatcatttgcgtgagacaagaacaggtatcatatataatataatataat
ttaaactttgttaagtgaatcaaatgctgatttaattggagtttcatgctgcaattaaattttatgtcac
atcagcaattttgttgacttggcaaggtcatttaggtggtgttttgggaagcaggggctatttaggagatt
aaacatagcttaattacaaaactaatgcacaacgcctaaagctgaatcgcgagatggatctataagcct
aatttagtccatgatttgacaatgtggttgcataataccatttgctaatgagtgatgacttaggtttta
agatctgctctcggtatttagcctatgggttctgctataattttgttaattagctcatatttagtcttat
aatttagtattcgaacatccaatgtgacatgctaaagttaaacctggatccaatgaagttcttatgaga
gttccatcactccggtgggtatagctacttaggtccggtttcttccacgacttatttttagaccgcctc
acattgaattgttagataactaattagaagtataaacgttagactattacaaaactccattacataagc
aatcaaaacggcgagacgaatctataaacctaattagtccatgatttgacaatgtgtgctacagtaaa
catctgctaatgaggttaatttaggttaattagatctgctcgcggtttagcctccacttatgtaattgg
gtttcttaaaacatctacgttttaatactcctaatgactctataaatattcaatgtgacacgtgctaaaa
taagctcagctgggaaggaagaaacgtcccccttagtttccactctatttaattgttatctgtagatg
ccagatgattgacaatcgcaatcactcaacttagtgggcatgcacatcagcagcgtgtgaacctgtagt
tgcgttccccctagAGAAATATCAACTGTGGGCCACGCATCAGCGCTGCTGTAACTGGACGAGGAG
CCCCGTGACGGCGTGCACATCGAAGCGCCACCAACACGGAACCCCGTCCCCACTCTCGGAAGCTCC
GCTCCACGGCGTGCACATCTAACGGCTACAGCAGCGGTACGGGTGGAGTGGAATCTTGCCTCTTTCG
GCTGGCGGCTTCGGAATTCGTGGCGGAGACGAGCGGGCTGCTCTCACGCGCAGGAAGAGTca
cggttctctccccacctctcctctccccacggccataaatagcCGACCCCCCTGCCCTTTCTCCCAA
TCTCATCTGCTGCTGTGTTGTCGAGCACACACCCGCCCAATCGTTCTTCCCGCAAGCCTCGCGCA
TCTTCAACCCGCTTCAAGgtacggcagctcgtcttctcctctagatcggtgctgactgcaagtagttga
tttggttagatggttaggatctgtgcactgaagaaatcatgtagatccgagatgttctgttgcgtagat
ggctgggaggtggaattttgtgtagatctgatatgttctcgtgttattctgttcacgctcctgcgact
tgtggggttttaggtcgttgatctgggaactcgtggggttgccttaggtgctgtagatggagtcgt
ctcagcgtttactggatcattgctagtagatcagctcgggttctgcttctgttatgtatggtgcccata
cttgcatctatgactcgttccgtggtttacactggtttctgcgctgattcgtccgactgatttctg
tagcatgtggttaacggttggtcatggtctgatttagattagatgcaataggatgactcgtatcagc
ctctggggttaataatgcatgtgtcaccactcgttccgtggttaagatgagatgactatgcttagttaa
tgggttgtagatataatgctgctgttctcctcaatgagcgtgactgttctacagcagcagcagcagcctc
ctgttacttaggttagatgcacatgcttatagatcaagatgtagtactgctactgttggaaattcttttagta
tactgtatgactcctcgtccttctgactgttttggtaatactggatgagtgagcagcagcagcagcagc
tgttggttagcggccatccatctgcatatgacacatgataagatgattacgctgttctgctatgag
ggcatagcttttatgtgagcaacatgcactcctcgtgttatatgcatataatagatggaagatctat
gtcaaatttgatgattattttgtacatcagatgataagcatgctcttcaacttttgttatgatactt
ggataatgaaatgctgctgcacgttcaattctatagcactaagtgatgtagacacgacgacgacgacgac
gtggcatcgtttgaatgtgtgtgtgctgttcaactagagactgttttataacactactgtagatactt
accttctgctcgtttattcttttgcagATGcagatcttgtcaagacctcaccggcaagacacacac
ctcaggtggaggtctctgcacacattgacaacgtcaaggcgaagatccaggaacaaggagacatccc
ccggatcagcagcgcctcatcttgcggcgacagcgttgaggatggggcgacacctgggtgactacaaca
tcagaaggagagcaccctccacctggtcgtccgtctcaggggagcagatgacagatcttgtgaagacctt
gactggcaagaccatcacccttgagggtg

【図 37 - 2】

図 37 続き

agtcctccgacaccatcgacaacgtcaaggccaagatccaggacaaggagggcatcccccgaccagca
gaggctcatcttgcgggcaagcagcttgaggatggacgacccctggctgactataacatccagaaggag
agcaacctccatctgggtgctccgtccaggggagggatcgagatctctcggaagactctcaactggcaaga
ccatcacctcgaggtggagctctccgacaccatcgacaacgtcaaggccaagatccaggacaaggaggg
catcccccgaccagcagagggctcatcttgcgtggaagcagcttgaggacggacgacccctggctgac
tataacatccagaaggagagcaccctccacctgggtgctccgctgaggggtgggatcgagatcttctga
agactttgactggcaagaccattactttggaggttgagagctccgacaccatcgacaacgtgaaggccaa
gatccaggacaaggagggcatcccccgaccagcagcagagggctcatcttgcgggcaagcagcttgaggac
ggacgacccctgggtgactataacatccagaaggagagcaccctccacctgggtgctccgtctcaggggag
gcatcgagatctctgtgaagaccctcactggcaagaccatcaccttgagggtggagctctccgacaccat
cgacaatgtcaaggccaagatccaggacaaggagggcatcccccgaccagcagcagagactcatcttgc
ggcaagcagcttgaggacggcagcaccctgggtgactacaacatccagaaggagagcaccctccacctgg
tgctccgtctcaggggagggatcgagatctctgtgaagaccctcactggcaagaccatcacctcgaggt
ggagctcttgcacaccatcgacaacgtcaaggccaagatccaggacaaggagggcatcccccgaccag
cagcgtcttatcttgcgggcaagcagctggaggatggcgcacccctgoggattacaatccagaagg
agagacccctccatctgggtgctccgtcgagggtgggatcgagatattcgtgaagacttgaccggcaa
gacatcactttggaggttgagagctccgacaccatcgacaatgtgaaggccaagatccaggacaaggag
ggatcccccgaccagcagcagctctgacttgcgggcaagcaactggaggatggcgcacccctggcg
actacaatccagaaggagtcacccctccacctgggtgctccgctccgtgggtggtcagTAAGcccatcg
gtcatggatgctctactgactgggtgctgctggctctgctgctgctgctcactttgaagtacctgtgctg
ggatgtgttctggtcatgaactgagcttggctttgatgtcttcttggctggtcttatgaactggttgta
tctgtatgttactgtaaacgttggctgggtgacagcagatagggatccgaatgaataaatgatgttgg
acttaactctgactctgttggcttctgggttatgccaacttctatattgctgagatcagaatgtttagct
tttaggtctgttggcttgggtcgactcctggttcttacttgaggcgtaactctgttctggcaaacct
aaatgctcaactgaatgtttaggacttaattgtggacagattaacgtgttgggttggcttctgagatg
tgattcggaaggcttggtagttgggaatcaaggagagcagctaggtctgacgaacgttatttggat
ttaagccttctcagatattgccattactctaaacctaatgatataatttcaactcggggatgttggag
agctcttctctcctcgacagcaaaatgatttggcttctgctgtgtacatgatttggcaactgttg
caacaactgaagtagacaagttttagctcaccagaagaatgaagaaagatttgggaatttgtatcagcga
caaaccttgttaacttgcccatcagaatgcacagaagagcggtcaaaattgacatgcttgcgaacct
tgcaatagttgatgcacatgttggccattgcctgccagctcttaggaaaagtgttgggtcgagaaatcta
agcatatgtgctctgctcacattgcgtggaaacccacacagcttctgacacattgtccactccagaagt
catctcggcgctgttaccctgttgaaggttaaccgaaactctcaagcgtgaccccaaacctggaa
ggaaatttgaggaaatcttctgttctgactcggtcactcttcc (配列番号 21)

【図 38 - 2】

図 38 続き

tttgtgaagacgcttacgggcaagaccatcaccttgagggtggagctctcggaacaccatcgacaatgtga
aggcgaaagtacaggacaaggagggcatctccggaccagcagcgctcatcttctgtggcaagcagct
agaggacggggtacccctggcggaattacaacatccagaaggagtcacccctccaccttgcctgcgctc
cggtgggttctTAAGcctagtgctcctgaggtggcttctgtcggtatggatcaacctcgggttaagtgc
tgtgaactctctgacttgcgttgcagtgctcgggtgtggttgaataagaacatgaagaacatgtgct
gtggatcacatgaacttttttttgaacggaagatcacatgacttctatggcttgaagtctcgaactc
tgaaatctggaccccttttgaagctcgaactcatcattctgcattatcatctgggtgtgacttattg
atgtgatgcagctcctgctgaatagtcacatgagatcactgactgactgactgctgcttattgggtgtgatg
ttgttaacaagctgaaggtcgtggtgtcttccagttagacgaagtgcttattgtagcgtgtagt
gctgctggatgattgatgaactgaacattctgcatttagcaactagcgagccaaaggtgactgactgact
ttctgtagactgtttttttatgccatggctgcttctcaattgcaactgattttcacattagctggatc
ataatctgagcagactactcaaaagtcaaaagtctatctctgctatgacgctttgccaactaggattttct
ttgtatgatttgttacaacatctgtaattctagtcaaaagaaagccaaaattttctttgtatgatttgg
tttacaacatctctaatctagtcaaaagaaagccaaatttatccctcctgggtccctacatcacgtagct
atgtggcccgcaagcagatgaagcagcccgctcagccgacgcgacgcgacgacccacacatcctgctc
ctccctcgccggcgccggcgccggcgagggcgaccccgctgcccctggcgagggcagcagcaggtgcgc
cactgcgcgcgcgcgcgtggcgagggcagcaggtgcgcgactgcccgcgcctcccttccggcatgccc
gacggctgggctactgtcccgcgcccttcccaat (配列番号 34)

【図 38 - 1】

図 38

ttgaattttaatttcaaaattttgcagggttagttagtgacatcacatcatatttagaaaaagttttata
attttccctccgttagttttcatataattttgaactccaacgataatctattataaatccccgactca
tcaaaaaaatgataaaaatttatgattaatttttcaacatgtgttatgggtgtaactatcgctctataa
aatttcaacttaaaactccacctatacattggagaataaagaaagacgaattacagtagggagttaattga
accaaatggaatagtttgagggtaaaaatgaactaaacatagtttagggaggttattcagatttttagttat
agtttgagaggagtaatttagactttttctctatcttgaattgttgacggctctctcattcgatcgatcgatg
gagcttttcagcccaacataaactcttcgggcccacagcttcgtccatccagctaggaggaacatttt
gcccagatgactcgttt
acctttgggtttcattcttcttccatctgaatttatctaaactgtgtttgaacttcgttaagaattttgtt
cgatctgctcgggtacatcggttgataggtggcctccagatctctctttttaaccggcaagtaaaata
atctcagctccagcctaacgtcaattatcagagagaaaaaaatatttttttatgatttgatcggaaccc
aacgccttaactgctgacatcctgggttctgcccggcagcggcgaggaagacccagcactcgcaacgccc
cgcaacggcgcccgctgttggaacttggtctcccgagcactccgtgggctcggcttatcgcccgccgctcc
atctcaacccgtccgcttggaacgctggaagtgtatcgctcgccgaccagcctcgagggttaacctaacctgc
cgctactataaaatccgggatccggcctctccaatcccatcgccaCAAGTTCGCGATCTCGATTTCAC
AAATCGCCGAGAGACCGAGCAGAGAAAGTTCCTCGATCGCTTCGCAAGTactcctacctaactccg
tcttaactgactctctctctatcagcttggttaactctcgaatgactctgctgctggctcgctgttccg
cctgctatgactgctttccatcacgagtttttttttcatcatctaatctatcggttgccgaagaat
tgtggctagtgaggtagtttctgctgctgactcggtgactgctggtggtgattggtgttttctg
aaaaagttgctggatagtttacgctttcaggccgaggtctggttcgaatttgattatgaagtctatatg
ctttggatctatcgatttccagtttttatcagatgtagggcaaaaaatttgcggcatttgtgtggaatt
agttggccttttaggtctgcacattcatggtgacggcagagttgctgctggctgttgcgtgggagcagtt
attatagttgttttttttttccctgattgatccacatttcaatgataaactagcctttgtcacctaag
caagtcagggttgatcctatctggttcttcagctaccagtttgcatagatgattggtgatttcgattgc
tttagtaggctcttgatttccacatctaatctgctcatgaatataagataactttacatgcttttgatata
actttatatttgaactgttcaactgtccagcctatttggataaattgagtgcaattggcttttgatgcctg
aattattcacatgttctggataaattgacgtgtgctcactagttgactgttttttagagtgccaccgct
ctgttcagctgatttgtgattcgattgctctagtttaacttttgattatgcagctagtgctttgtcat
atgtagctttataggctctgatgtccttggaatagttcagctcacttgcgaagtgtctttacaagtga
tagctctgatttctatttggcttctcgagtcagagctttgcaaatgcttctgtgttacttatcatcata
ttacttgaattgacgatttaattgggtggatgttgcgtttactctacattttttgtgttttata
ttatactaaaaatgttgggtgctgcttttcaGATGcagatcttgggaagacactcactggcaagact
atccaccttgagggtggagctctctgacacaattgacaatgtgaaggcaagatccaggacaaggagggga
ttcctccagacccagcagcgttatcttgcgtggcaagcagcttaggagtgccgtacacttgacagata
caacatccagaaggagtcacactgcaccttgtcctcaggctcggtggaggtcagagatttctgtgaag
accctcactggcaagcagatccacctagaggtggagctcatcgacacccatcgacaatgtgaaggcaaaaga
tccaggacaaggagggcatccccctgaccagcagcgctcatcttgcaggcaagcagtgaggagtg
ggcaactctggctgactataatccagaaggagtcaccccttcaactcgtcctccgctcgagaggtggc
atcgagatcttctggaagacgtgacaggcaagaccatcacattggaagttagtctcccgatacaactcg
acaattgtgaaggccaagatccaggataaaggaggtatcccccggaacagcagcgctcatctcgcgg
caagcagctcgaggatggcgacactcgtgactacaacatccagaaggaatcaacctgcacctgggt
ctccgctcggtggtggaatcgagatc

【配列表】

2016531575000001.app

【 国際調査報告 】

PCT/US2014/053327 24.12.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/053327

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 35, 37, 38, 39, and 40 were searched.

PCT/US2014/053327 24.12.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/053327

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/82 (2014.01) CPC - C12N 15/82 (2014.11) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A01H 4/00, 5/00; C12N 15/29, 15/82 (2014.01) CPC - C12N 15/82, 15/8241, 15/8213 (2014.11) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12N 15/82, 15/8241, 15/8213 (2014.11) (keyword delimited) US Classes - 435/419, 468; 536/23.6; 800/298 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Orbit, Google Patents, Google, PubMed Search terms used: nucleic acid, operably, promoter, linked, transcription terminator, marker, vector, plasmid, expression construct, kilobase		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/159891 A1 (DEBRECHT et al) 29 November 2012 (29.11.2012) entire document	1, 2, 4-6, 25
Y		26
Y	US 2007/0243543 A1 (SONG et al) 18 October 2007 (18.10.2007) entire document	26
P, X	WO 2014/039872 A1 (COGAN et al) 13 March 2014 (13.03.2014) entire document	1-27
A	WO 2013/101343 A1 (KUMAR et al) 04 July 2013 (04.07.2013) entire document	1-27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 December 2014		Date of mailing of the international search report 24 DEC 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenhaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 クマー , サンディーブ

アメリカ合衆国 46032 インディアナ州 , カーメル , ワイアンドット ドライブ 201

(72)発明者 ウォーデン , アンドリュー , エフ .

アメリカ合衆国 46278 インディアナ州 , インディアナポリス , ストーンズ フェリー ロード 8435

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AB04