

(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2008-528016

(P2008-528016A)

(43) 公表日 平成20年7月31日(2008.7.31)

(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 A	2 B O 3 0
C 1 2 P 23/00 (2006.01)	C 1 2 P 23/00 Z N A	4 B O 2 4
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00 A	4 B O 6 4
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00 A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁)

(21) 出願番号 特願2007-552681 (P2007-552681)
 (86) (22) 出願日 平成18年1月27日 (2006.1.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年9月26日 (2007.9.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2006/000188
 (87) 国際公開番号 W02006/079727
 (87) 国際公開日 平成18年8月3日 (2006.8.3)
 (31) 優先権主張番号 0500855
 (32) 優先日 平成17年1月27日 (2005.1.27)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 507123774
 リプロフィ
 L I B R O P H Y T
 フランス、エフ-84120ペルテュイ、
 リュ・ラスパイユ24番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物においてテルペノイド類を産生させるためのシステム

(57) 【要約】

本発明は、腺毛を有する植物において目的のテルペン類を産生させるための方法ならびに目的の前記テルペン類を産生させるのに有用な植物に関する。前記植物は、毛状突起においてそれを特異的に発現させることが可能なプロモーターの制御下で異種テルペンシクターゼをコードする配列を含んでなる。さらに、内因性ジテルペン類を産生するための経路は、好ましくは、異種経路における流動を増加するために、植物の毛状突起において阻止される。異種テルペン類の分泌は自発性であり、容易な回収を生じる。本発明はまた、細菌によって増強された効率の形質転換を示す葉の表面において抗生物質特性を有する化合物の阻止された産生を示す植物に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

腺毛を有する植物において目的のテルペンを産生させるための方法であって、

a) 毛状突起における発現を可能にするプロモーターの制御下にある、前記目的のテルペンの合成を可能にする異種テルペンシンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる発現カセットを含有する構築物を、前記植物の細胞に導入すること、

b) 前記細胞から植物を再構築し、前記テルペンシンターゼを発現するトランスジェニック植物を選択すること、次いで、

c) 前記トランスジェニック植物の毛状突起に含有される目的のテルペンを回収すること、

を含んでなる、方法。

10

【請求項 2】

テルペンシンターゼの発現が毛状突起特異的プロモーターの制御下にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記発現カセットが、プロモーターに作動可能に連結される少なくとも 1 つのエンハンサー配列を含んでなる、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記トランスジェニック植物の毛状突起に含有される目的のテルペンの回収が、毛状突起の滲出物に含有される目的のテルペンを回収することによって行われる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

毛状突起において内因性テルペン類を産生させるために経路を阻止することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

内因性テルペン産生経路が、内因性テルペンシンターゼの発現を阻止することによって阻止される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

b) において選択されるトランスジェニック植物が、内因性テルペンを産生するための経路が毛状突起において阻止されるトランスジェニック植物と交配される、請求項 5 または 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記異種テルペンシンターゼがジテルペンシンターゼである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記ジテルペンシンターゼがタキサジエンシンターゼまたはキャスベンシンターゼである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記異種テルペンシンターゼがモノテルペンシンターゼであり、構築物が、毛状突起においてそれを発現させることが可能なプロモーターの制御下にある、ゲラニルピロリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記異種テルペンシンターゼがセスキテルペンシンターゼであり、構築物は、毛状突起においてそれを発現させることが可能なプロモーターの制御下にある、ファルネシルピロリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記異種テルペンシンターゼがトリテルペンシンターゼであり、構築物は、毛状突起においてそれらを発現させることが可能なプロモーターの制御下にある、ファルネシルピロ

50

リン酸シンターゼ、スクアレンシンターゼおよびスクアレンエポキシダーゼをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

植物が、キク科 (Asteraceae)、アサ科 (Cannabaceae)、ナス科 (Solanaceae) またはシソ科 (Lamiaceae) 由来の植物である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

植物が、タバコ、好ましくは、ニコチアナ・シルベストリス (Nicotiana sylvestris) である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

テルペン修飾酵素をコードする導入遺伝子を前記植物の細胞に導入することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

毛状突起における発現を可能にするプロモーターの制御下にある目的のテルペンの合成を可能にする異種テルペンシンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現カセットを含んでなり、内因性テルペン類を産生するための経路が、毛状突起において阻止されることを特徴とする、腺毛を有するトランスジェニック種子または植物。

【請求項 17】

内因性テルペン産生経路が、内因性テルペンシンターゼの発現を阻止することによって阻止される、請求項 16 に記載のトランスジェニック種子または植物。

【請求項 18】

テルペンシンターゼの発現が毛状突起特異的プロモーターの制御下にある、請求項 16 または 17 のいずれか一項に記載のトランスジェニック種子または植物。

【請求項 19】

前記発現カセットが、プロモーターに作動可能に連結される少なくとも 1 つのエンハンサー配列を含んでなる、請求項 16 または 18 のいずれか一項に記載のトランスジェニック種子または植物。

【請求項 20】

テルペン修飾酵素をコードする導入遺伝子をさらに含んでなる、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載のトランスジェニック種子または植物。

【請求項 21】

植物が、キク科 (Asteraceae)、アサ科 (Cannabaceae)、ナス科 (Solanaceae) またはシソ科 (Lamiaceae) 由来の植物であることを特徴とする、請求項 16 ~ 20 のいずれか一項に記載のトランスジェニック種子または植物。

【請求項 22】

植物がニコチアナ (Nicotiana) 属であることを特徴とする、請求項 21 に記載のトランスジェニック種子または植物。

【請求項 23】

目的のテルペンを産生させるための請求項 16 ~ 22 のいずれか一項に記載のトランスジェニック種子または植物の使用。

【請求項 24】

a) 植物の地上部を収穫すること、b) 低極性または非極性型の溶媒において前記地上部をインキュベートすること、次いで、c) 溶媒を排除することを含んでなる、植物の毛状突起の滲出物中の異種テルペン類を回収するための方法。

【請求項 25】

植物細胞への DNA トランスファーを可能にする細菌と、葉表面で抗菌活性を有する化合物を産生するための経路が阻止される植物の細胞とを接触させることを含んでなる、植物細胞を形質転換するための方法。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする細菌で前記細胞を形質転換するための、葉表面で抗菌活性を有する化合物を産生するための経路が阻止される植物細胞の使用。

【請求項27】

以下の工程：a) 導入遺伝子を含んでなる植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする組換え細菌宿主細胞を得る工程、b) 葉表面での抗生物質特性を有する化合物を産生するための経路が阻止される植物を、工程a) で得られる組換え細菌宿主細胞による感染によって形質転換する工程、次いで、c) 導入遺伝子をそれらのゲノムに組込んでいる植物を選択する工程を含んでなること特徴とする、形質転換された植物を得るための方法。

【請求項28】

抗菌活性を有する化合物がテルペン、好ましくは、ジテルペンである、請求項25または27に記載の方法あるいは請求項26に記載の使用。

10

【請求項29】

抗菌活性を有する化合物がCBT-ジオールである、請求項28に記載の方法または使用。

【請求項30】

葉表面で抗菌活性化合物を産生するための経路が、毛状突起における内因性テルペンシクターゼの発現を阻止することによって阻止される、請求項28または29のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項31】

植物が、キク科(Asteraceae)、アサ科(Cannabaceae)、ナス科(Solanaceae)またはシソ科(Lamiaceae)由来の植物、好ましくは、ナス科(Solanaceae)由来の植物である、請求項25～30のいずれか一項に記載の方法または使用。

20

【請求項32】

植物が、トマト、タバコ、ヒマワリおよびポテトからなる群から選択される、請求項31に記載の方法または使用。

【請求項33】

植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする細菌が、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、特に、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)、リゾビウム(Rhizobium)、シノリゾビウム(Sinorhizobium)、またはメソルヒゾビウム(Mesorhizobium)に属する、請求項25～32のいずれか一項に記載の方法または使用。

30

【請求項34】

テルペノイド生合成遺伝子の機能を同定するために、内因性ジテルペン類、特に、CBT-ジオールを産生するための経路が毛状突起において阻止される植物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物において目的の化合物を産生させるための方法および該方法における使用のために調製される遺伝的に改変された植物に関する。本方法はまた、形質転換の増強された効率を可能にする遺伝的に改変された植物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

序論

毛状突起は、高等植物の地上部の表面に局在する(非特許文献1においてレビューされた)。それらは多様な形態をとり、主に2つのカテゴリーに分類される。第1は、毛、もしくは非分泌性毛状突起(単細胞性または多細胞性)を含む。それらは外部に物質を分泌しないか、または少なくとも感知されるほどの量を分泌しない。第2のグループは、外部に多様な物質を合成および分泌する増加した能力を有する分泌製として記載のすべての毛状突起または顆粒を含んでなる。いくらかのタイプの分泌性毛状突起がこのカテゴリーに

50

おいて見出される。特に、これらは、シソ科 (Lamiaceae) 由来の楕形の毛状突起、例えば (ミント、バジル、ラベンダー、タイムなど) ならびに、とりわけ、ナス科 (Solanaceae) (トマト、タバコ、ポテト、トウガラシ、ナスなど)、キク科 (Asteraceae) (ヒマワリなど) およびアサ科 (Cannabaceae) (例えば、大麻 (Cannabis sativa)) 科において見出される腺毛を含む。

【0003】

シソ科 (Lamiaceae) の楕形の毛状突起は、モノテルペン類 (例えば、メントール、テルピネオール) のような揮発性分子の産生部位である。それらの構造は、揮発物が蓄積する分泌細胞の先端ペリプラズム膜と壁との間に局在する油嚢によって特徴付けられる (非特許文献2)。精油が放出されるのは、これらの嚢が破壊する場合、例えば、葉が捻じ曲げられる場合である。

10

【0004】

分泌性として記載される毛状突起は、好ましくは、セスキテルペン類またはジテルペン類のような周囲温度では低いかもしくは全く揮発性を有さない分子を合成する (非特許文献1)。例えば、培養されたタバコ (ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum)) の腺毛は、その半分を超えるものが、2つのクラス、センブラン系およびラブダン系に属するジテルペン類からなる分泌物を産生する (非特許文献3)。ニコチアナ・シルベストリス (Nicotiana sylvestris) のような野生型タバコのいくつかの種では、センブランノイド類のみ、およびより詳細には、センブラトリエン-ジオール (CBT-ジオール) が存在し、葉表面に蓄積する量は、葉乾燥物の約15%を占める (非特許文献4)。

20

【0005】

すべてのジテルペン類は、同じ前駆体基質、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) から生じる。ジテルペン類の多様性の原因となるものは、GGPPを使用して、オレフィン (環式または非環式) を生成するテルペンシターゼである。GGPPはまた、その中にカロテノイド色素が見出されるテトラテルペン類の前駆体である。ジテルペン類として、植物成長ホルモンであるジベレリン類のような一次代謝の分子、およびこれらの分子の代謝多様性のほとんどの原因となる二次代謝物が挙げられる。一次および二次代謝物の間のこのような区分は、GGPPの代謝利用率の厳格な調節を介して生じる。この点において、大量のジテルペン類を蓄積する植物種は、その合成専用に分化した器官、分泌性毛状突起を具備することに留意することが妥当である。タバコおよび特に、ニコチアナ・シルベストリス (Nicotiana sylvestris) は、典型的な例であり、ここで、高流量のセンブランノイド合成、および従って、地上部の表面におけるその高い蓄積を確実にするために、毛状突起において豊富なGGPPプールが存在する。

30

【0006】

タバコにおいてCBT-ジオールの生合成をもたらす工程については、部分的に解明されており、2つの部分に分解され得る：

- ・いわゆる「ローマー (Rohmer)」経路 (非特許文献5) を介するすべてのジテルペン類の普遍的な前駆体、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) の生合成が、葉緑体において生じる。

40

- ・GGPPからのCBT-ジオールの生合成。非特許文献6は、以下の生合成経路を提唱している：

GGPP → CBT-オール → CBT-ジオール。

【0007】

第1の環化工程は、テルペンシターゼとして公知の大きなファミリーの酵素由来の酵素によって行われる (非特許文献7)。タバコのジテルペンシターゼは、GGPPを基質として使用して、CBT-オールを形成する。CBT-ジオールがCBT-オールから生成される第2の工程は、シトクロムP450ファミリー由来の酵素によって触媒される水酸化である。ワーグナー (Wagner) 教授のグループ (University of Kentucky) は、サブトラクティブPCRを使用して、これらの工程のそれぞれ

50

れについてのニコチアナ・タバカム (N. tabacum) 候補遺伝子を同定している：
 ・テルペンシクターゼをコードする配列に高い相同性を示す配列 (CYC-2; Genbank 番号 AF401234, NID: AY495694)、
 ・シトクロム P450 型酵素をコードする配列 (CYP71D16, NID: AF166332) (非特許文献 8、非特許文献 6)。

【0008】

N. タバカム (N. tabacum) における同時抑制および RNA 干渉によるこれらの遺伝子の発現のサイレンシングの研究により、(i) CBT-ジオールおよび CBT-オールの減少が、CYC-2 遺伝子発現の減少と関連したことが示されている。これらの研究は、(i) CYC-2 遺伝子が、CBT-オール合成を担う CBT-オールサイクラーゼをコードすること、および (ii) CYP71D16 遺伝子が、CBT-オールを CBT-ジオールに変換する CBT-オールヒドロキシラーゼをコードすることを示唆している。さらに、CYC-2 mRNA に極めて類似の遺伝子のゲノム配列が、最近、データベースに寄託されており (CYC-1, NID: AY049090)、1 つではなくいくらかの CBT-オールサイクラーゼ遺伝子の存在が示唆される。

10

【0009】

所定のジテルペノイド類は、特に、薬学的区域において商業的に開発されている。このことは、特に、乳および卵巣癌の処置において使用されるタキサンクラスのジテルペノイド類、パクリタキセルおよびドセタキセルについては、正しい。パクリタキセルは、イチイ (Taxus sp.) から抽出される天然の分子である一方、ドセタキセルは、位置からも抽出されるパクリタキセル前駆体、10-デアセチルパッカチン III (または 10-DAB III) から誘導される半合成分子である。イチイのパクリタキセル生合成遺伝子のほとんどについては、説明されている (非特許文献 9; 非特許文献 10)。これらの分子は、イチイ抽出物における 10-DAB III および具体的に、パクリタキセルの存在量が比較的低いため、ならびに分子構造の複雑さにより、工業的に大規模化することができる合成方法がないため、生成するための費用が高い。

20

【0010】

このように、より低い費用で目的のテルペン類を産生させるため、しかしまた、依然としてまだ容易に合成に至ることができないでいるテルペン誘導体を産生させるための方法に対する高い要求が存在する。

30

【非特許文献 1】ワグナー GJ (Wagner GJ)、ワング E (Wang E)、シェパード RW (Shepherd RW) (2004年) *New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome*. *Annals of Botany* 93: 3-11

【非特許文献 2】ターナー GW (Turner GW)、ガーシェンゾン J (Gershenson J)、クロテアウ R (Croteau R) (2000年) *Development of peltate glandular trichomes of peppermint*. *Plant Phys.* 124: 665-680

40

【非特許文献 3】ヒーマン V (Heemann V)、ブレーマー U (Bruemmer U)、パウルゼン C (Paulsen C)、シーホファー F (Seehofer F) (1983年) *Composition of the leaf surface gum of some Nicotiana species and Nicotiana tabacum cultivars*. *Phytochem.* 22: 133-135

【非特許文献 4】セバーソン RF (Severson RF)、ジョンソン AW (Johnson AW)、ジャクソン DM (Jackson DM) (1985年) *Cuticular constituents of tobacco: factors*

50

affecting their production and their role in insect and disease resistance and smoke quality. Recent Advances in Tobacco Science 11:105-173

【非特許文献5】ローマー (Rohmer) ら、1996年

【非特許文献6】ワング E (Wang E)、ワーグナー GJ (Wagner GJ) (2003年) Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing. Planta 216:686-691

10

【非特許文献7】ボールマン J (Bohlmann J)、マイヤー-ガウエン (Meyer-Gauen)、クロテアウ R (Croteau R) (1998年) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4126-33

【非特許文献8】ワング E (Wang E)、ワング R (Wang R)、デパラシス J (DeParasis J)、ラフリン JH (Loughrin JH)、ガン S (Gan S)、ワーグナー GJ (Wagner GJ) (2001年) Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. Nat. Biotechnol. 19:371-374

20

【非特許文献9】ジェンバイン S (Jennewein S)、クロテアウ R (Croteau R) (2001年) Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:13-9

【非特許文献10】ジェンバイン S (Jennewein S)、ワイルデュング MR (Wildung MR)、チョー M (Chau M)、ウォーカー K (Walker K)、クロテアウ R (Croteau R) (2004年) Random sequencing of an induced Taxus cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9149-9154

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、腺毛を有する植物において目的のテルペン類を産生させるための新規の方法ならびに前記産生に有用な植物について説明する。前記新規方法は、目的のテルペンの産生を可能にする異種テルペンシンターゼを植物に導入することに基づく。前記異種テルペンシンターゼの発現は、好ましくは、特に、植物の腺毛における発現を可能にするプロモーターによって制御される。収量を増加するためには、植物の毛状突起における内因性ジテルペン類の合成を阻止することが好ましい。

40

【0012】

本発明の第1の目的は、

a) 好ましくは、特に、毛状突起における発現を可能にするプロモーターの制御下にある、前記目的のテルペンの合成を可能にする異種テルペンシンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる発現カセットを含有する構築物を、前記植物の細胞に導入すること、

b) 前記細胞から植物を再構築し、前記テルペンシンターゼを発現するトランスジェニック

50

ク植物を選択すること、次いで、

c) 前記トランスジェニック植物の毛状突起に含有される目的のテルペンを回収することを含んでなる腺毛を有する植物において目的のテルペンを産生させるための方法に関する。

【0013】

好ましくは、テルペンシンターゼの発現は、毛状突起特異的プロモーターの制御下にある。

【0014】

好ましくは、前記トランスジェニック植物の毛状突起における目的のテルペンの回収は、毛状突起滲出物に含有される目的のテルペンを回収することによって行われる。

10

【0015】

特に好適な実施態様では、前記発現カセットは、プロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのエンハンサー配列を含んでなる。特定の実施態様では、エンハンサー配列は配列番号9の配列を含んでなる。

【0016】

好ましくは、本方法は、毛状突起における内因性ジテルペン産生の経路を阻止することをさらに含んでなる。より詳細には、内因性ジテルペン産生経路は、内因性ジテルペンシンターゼの発現を阻止することによって、阻止することができる。好ましくは、毛状突起における内因性ジテルペン産生経路を阻止することは、b)において選択されるトランスジェニック植物と、内因性ジテルペン産生経路が毛状突起において阻止されるトランスジェニック植物とを交配させることによって行われる。特定の実施態様では、内因性ジテルペンシンターゼの1つは、センプラトリエン - オールシンターゼである。

20

【0017】

好適な実施態様では、異種テルペンシンターゼはジテルペンシンターゼである。好ましくは、ジテルペンシンターゼは、タキサジエンシンターゼまたはキアスベンシンターゼである。

【0018】

別の好適な実施態様では、異種テルペンシンターゼはモノテルペンシンターゼであり、構築物は、毛状突起においてそれを発現させることが可能なプロモーターの制御下にある、ゲラニルピロリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含んでなる。あるいは、ゲラニルピロリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド配列は、第1とは異なる第2の構築物によって担持され得る。

30

【0019】

さらなる好適な実施態様では、異種テルペンシンターゼはセスキテルペンシンターゼであり、構築物は、毛状突起においてそれを発現させることが可能なプロモーターの制御下で、ファルネシルピロリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含んでなる。あるいは、ファルネシルピロリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド配列は、第1とは異なる第2の構築物によって担持され得る。

【0020】

なお別の好適な実施態様では、異種テルペンシンターゼはトリテルペンシンターゼであり、構築物は、毛状突起においてそれらを発現させることが可能なプロモーターの制御下にある、ファルネシルピロリン酸シンターゼ、スクアレンシンターゼおよびスクアレンエポキシダーゼをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含んでなる。あるいは、ファルネシルピロリン酸シンターゼ、スクアレンシンターゼおよびスクアレンエポキシダーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、第1とは異なる1つもしくはそれ以上の構築物によって担持され得る。

40

【0021】

好適な実施態様では、腺毛を有する植物は、キク科 (Asteraceae)、アサ科 (Cannabaceae)、ナス科 (Solanaceae) またはシソ科 (Lamiaceae) 由来の植物である。好ましくは、植物はタバコ、およびより詳細には、ニコ

50

チアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*) である。

【0022】

第2の態様では、本発明は、内因性ジテルペン産生経路が毛状突起において阻止されることを特徴とする、腺毛を有するトランスジェニック植物の植物または種子に関する。より詳細には、内因性ジテルペン産生経路は、内因性ジテルペンシンターゼの発現を阻止することによって、阻止することができる。好ましくは、腺毛を有する植物は、キク科 (*Asteraceae*)、アサ科 (*Cannabaceae*)、ナス科 (*Solanaceae*) またはシソ科 (*Lamiaceae*) 由来の植物である。さらにより好ましくは、植物はタバコ、およびより詳細には、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*) である。特定の実施態様では、内因性ジテルペンシンターゼは、センブラトリエン・オールシンターゼである。

10

【0023】

第3の態様では、本発明は、それが、好ましくは、特に、毛状突起において、発現を可能にするプロモーターの制御下にある、目的のテルペンの合成を可能にする異種テルペンシンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現カセットを含んでなることを特徴とする、腺毛を有するトランスジェニック種子または植物に関する。好ましくは、テルペンシンターゼの発現は、毛状突起特異的プロモーターの制御下にある。好適な実施態様では、前記発現カセットは、プロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのエンハンサー配列を含んでなる。好ましくは、内因性ジテルペン類を産生させるための経路は、前記植物の毛状突起において阻止される。より詳細には、内因性ジテルペン産生経路は、内因性ジテルペンシンターゼの発現を阻止することによって、阻止することができる。好ましくは、腺毛を有する植物は、キク科 (*Asteraceae*)、アサ科 (*Cannabaceae*)、ナス科 (*Solanaceae*) またはシソ科 (*Lamiaceae*) 由来の植物である。さらにより好ましくは、植物はタバコ、およびより詳細には、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*) である。特定の実施態様では、内因性ジテルペンシンターゼは、センブラトリエン・オールシンターゼである。

20

【0024】

本発明の第4の態様は、目的のテルペン類を産生させるための本発明に従う植物の使用に関する。

30

【0025】

本発明の第5の態様は、a) 植物の地上部を収穫すること、b) 低極性または非極性型の溶媒において前記地上部をインキュベートすること、次いで、c) 溶媒を排除することを含んでなる、植物の毛状突起の滲出物中の異種テルペン類を回収するための方法に関する。

【0026】

本発明の第6の態様は、植物細胞へのDNAのトランスファーを可能にする細菌による形質転換の増加された効率を示す植物、およびその使用にさらに関する。従って、本発明は、植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする細菌で前記細胞を形質転換するために、葉表面における抗菌活性を有する化合物の阻止された産生を示す植物の細胞に関する。本発明はまた、植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする細菌と、葉表面で抗菌活性を有する化合物の阻止された産生を示す植物の細胞とを接触させることを含んでなる、植物細胞を形質転換するための方法に関する。本発明は、それが、次の工程：a) 導入遺伝子を含んでなる植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする組換え細菌宿主細胞を得る工程、b) 葉表面での抗生物質特性を有する化合物の阻止された産生を示す植物を、工程a) で得られる組換え細菌宿主細胞による感染によって形質転換する工程、c) 導入遺伝子をそれらのゲノムに組込んでいる植物を選択する工程、を含んでなることを特徴とする、形質転換された植物を得るための方法にさらに関する。好ましくは、細菌は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、特に、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、リゾビウム (

40

50

Rhizobium)、シノリゾビウム(Sinorhizobium)、またはメソルヒゾビウム(Mesorhizobium)に属する。好ましくは、植物は、腺毛を有する植物である。好適な実施態様では、腺毛を有する植物は、キク科(Asteraceae)、アサ科(Cannabaceae)、ナス科(Solanaceae)またはシソ科(Lamiaceae)由来の植物である。好ましくは、それは、ナス科(Solanaceae)由来であり、タバコ、トマト、ヒマワリおよびポテトの中から選択することができる。好ましくは、抗菌活性を有する化合物は、テルペンおよび特に、ジテルペンである。特に、化合物はC B T - ジオールである。好ましくは、テルペン類、特に、C B T - ジオールのようなジテルペン類の産生を阻止することは、毛状突起における内因性テルペンシンターゼ、特に、センブラトリエン - オールシンターゼの発現を阻止することによって行われる。阻止することはまた、ゲラニルゲラニルピロリン酸、すべてのジテルペン類の前駆体を産生するゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼ(G G P P S)の発現を、毛状突起において特異的に阻止することによっても行うことができる。

10

【0027】

本発明の第7の態様は、テルペノイド生合成遺伝子の機能を同定するために、特に、C B T - ジオールの内因性ジテルペン産生が毛状突起において阻止される植物の使用に関する。より詳細には、C B T - ジオール産生経路を阻止することは、センブラトリエン - オールシンターゼの発現を阻止することによって行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明者らは、上記の代謝特徴によるタバコ、ニコチアナ・シルベストリス(Nicotiana glauca)が、内因性G G P Pフルにタキソール生合成経路をグラフトするのに理想的な宿主であることを示した。より一般的には、任意のテルペンシンターゼ、およびより詳細には、任意のジテルペンシンターゼは、そのコーディング配列が公知である限り、それから誘導されるジテルペノイド類の豊富な産生を得るために、タバコゲノムに組込まれ得る。これは、腺毛を有する植物に対する他のテルペンクラス(例えば、モノテルペン類、セスキテルペン類、またはトリテルペン類)について一般化することができる。

20

【0029】

本発明は、本質的に、以下に要約される3つの要素を含んでなる。

30

(1) 分泌性毛状突起における異種テルペンシンターゼのデノボ発現を可能にするためのタバコの遺伝子操作。本明細書に記載の実施例は、それぞれ、タキサジエンおよびキャスベンをもたらすタキサジエンシンターゼおよびキャスベンシンターゼの実施例である。これらの実施例は、タバコ毛状突起によるジテルペノイド類を産生させるための可能性を制限するものとみなされるべきではない。さらに、構成性発現に対してタバコ毛状突起においてジテルペンシンターゼを特異的に発現させることの重要性が強調される。

(2) タバコにおける内因性ジテルペン合成を阻害することによって得られるジテルペン産生の増加。分泌性毛状突起によるジテルペン産生のレベルを増加するために、内因性ジテルペン産生経路は、テルペンシンターゼ工程において阻止される。これにより、G G P P、すべてのジテルペンシンターゼに共通の基質に対する任意の競合を、排除しないとしても、減少することが可能である。テルペンシンターゼ活性(Nicotiana glauca)の場合、センブラトリエン - オールシンターゼ)をコードする遺伝子の不活化は、内因性ジテルペン類の産生を事実上排除するのに十分である。

40

(3) 毛状突起滲出物における目的のジテルペン類の分泌および低極性(塩化メチレン、クロロホルムなど)または非極性型(例えば、ペンタン、ヘキサンなど)の溶媒を使用することによる毛状突起によって産生されるジテルペノイド含有滲出物の回収。実際、本発明者らは、毛状突起の滲出物において、内因性テルペン類以外のテルペン類を分泌する明白でないかつ予測できない可能性を発見した。

【0030】

50

本発明者らはまた、葉表面で抗菌活性を有する化合物の産生が阻止される植物が、植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする細菌によるより高い効率の形質転換を示すことを発見した。事実、*N.シルベストリス* (*N. sylvestris*) の葉表面での毛状突起によるCBT-ジオール産生の排除は、*アグロバクテリウム・ツメファシエンス* (*Agrobacterium tumefaciens*) による遺伝的形質転換の効率の高度に有意な増強をもたらす。これは、*アグロバクテリウム・ツメファシエンス* (*Agrobacterium tumefaciens*) の増殖および従って、*N.シルベストリス* (*N. sylvestris*) 細胞の形質転換を防止するCBT-ジオールの抗菌活性によって説明することができる。

【0031】

さらに、本発明者らは、CBT-ジオール合成経路が毛状突起において阻止される植物のいくつかの興味深い特性を同定した。事実、CBT-ジオールは、産生される量を考慮すると、主要な混入物である。その存在は、少数成分の検出を困難にする。従って、CBT-ジオールをほとんどまたは全く産生しない植物は、遺伝子導入による毛状突起において産生される分子の精製を容易にする。さらに、そのような植物は、テルペノイド生合成遺伝子の機能を同定するのに極めて有用である。事実、そのような植物の葉滲出物における低いレベルのCBT-ジオールは、例えば、テルペンシンターゼ、シトクロムP450モノオキシゲナーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、ベンゾイルトランスフェラーゼまたは*N*-ベンゾイルトランスフェラーゼのようなテルペン生合成に關与する遺伝子の機能の「インピボ」同定を容易にする。

【0032】

従って、本発明は、腺毛を有する植物においてジテルペン類、モノテルペン類、セスキテルペン類およびトリテルペン類よりなる群において選択される目的のテルペン類を産生させるためのシステムにある。

【0033】

第1の実施態様では、本発明は、目的のジテルペン類、およびより詳細には、タキサン系薬剤を腺毛より産生させるためのシステムにある。

【0034】

ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*) におけるジテルペンシンターゼ発現の研究は、タバコ毛状突起が、ジテルペノイド類、および特に、タキサジエンまたはキャスペンのデノボ産生に適した天然のプラットフォームを構成することを示す。毛状突起滲出物におけるタキサジエンまたはキャスペンの産生は、毛状突起分泌系がジテルペン類のクラスに特有でないことを示す。前記ジテルペン類の産生のための培養を考慮すると、毛状突起におけるジテルペンシンターゼの特異的発現は、より遅い成長によって特徴付けられる構成性発現より顕著な利点を付与する。

【0035】

タバコおよび特に、*ニコチアナ・シルベストリス* (*Nicotiana sylvestris*) ならびに腺毛を有する植物の選択は、ジテルペン類の豊富な産生に同等に適応される。事実、*シロイヌナズナ* (*Arabidopsis thaliana*) 種における構成性プロモーター(35S)の制御下でのタキサジエンシンターゼの発現は、葉に限定されかつ少量(*N.シルベストリス* (*N. sylvestris*) におけるものより100倍少ない)でのタキサジエンの蓄積をもたらす(ベスマベス(*Besumbes*)ら、2004年; *ボテラ・パビア* (*Botella Pavia*)ら、2004年)。この差異は、腺ではない*シロイヌナズナ* (*Arabidopsis thaliana*) 毛状突起の生理に關連する。

【0036】

本発明者らによって示されるように、系統発生的に遠位の植物(それぞれ、*トウゴマ* および*イチイ*)から誘導されるキャスペンおよびタキサジエンシンターゼは、両方とも、タバコ毛状突起において機能的である。これらの観察から見て、本発明者らは、タバコ毛状突起は、それらの起源にかかわらず、すべての種類のジテルペンシンターゼを発現する

10

20

30

40

50

ことが可能な生物学的工場を構成すると考えている。

【0037】

内因性テルペンシンターゼ遺伝子のためのサイレンシングストラテジーの使用は、毛状突起におけるタキサジエン蓄積の有意な増加をもたらす。従って、前記ストラテジーは、特に、タバコ毛状突起によるジテルペン産生のレベルを増加するために適応される。一般的に、グラフトされた遺伝子操作された経路の生合成を増加するための何らかの手段によって、内因性ジテルペノイド経路をサイレンシングすることは、高い収量の目的のジテルペノイド類を産生させるための明らかな利点を表す。

【0038】

一般的様式では、発現カセットは、転写開始を可能にするプロモーター、イントロンを含有するかまたは含有せず、その翻訳は異種テルペンシンターゼの産生を可能にする転写される核酸、および転写ターミネーターから構成される。転写される核酸は、ゲノムDNA、相補的DNA(cDNA)または合成DNAであり得る。本発明の範囲において、転写される核酸は、好ましくは、イントロンを欠くcDNAである。転写される核酸は、合成または半合成の組換え分子であり得、おそらく、増幅されるかまたはベクターにクローニングされ、化学的に改変されるかまたは非天然の塩基を含んでなる。典型的に、それらは単離されたDNA分子であり、当業者に周知の組換え方法によって合成される。それらは、典型的に、それらの全長で、即ち、起源の遺伝子のATG開始コドンおよび葉緑体輸送ペプチドのそれらのコーディング配列を伴って使用される。一般的に、植物のジテルペンシンターゼは葉緑体に輸送され、従って、輸送ペプチドを所有する一方、細菌または真菌のような葉緑体を所有しない生物体のジテルペンシンターゼは、葉緑体輸送ペプチドを所有しない。植物および特に、タバコの葉緑体において前記ジテルペンシンターゼを正確に発現するためには、当業者に周知のルビスコ(Rubisco)小サブユニットのもののような輸送ペプチドとの融合を作製する必要がある。

【0039】

発現カセットという用語は、作動可能に連結されるコーディング領域および調節領域を含んでなる核酸構築物を示す。表現「作動可能に連結される」は、エレメントが、コーディング配列(目的の遺伝子)の発現および/またはコードされるタンパク質のターゲティングが、転写プロモーターおよび/または輸送ペプチドの制御下にあるような方法で組み合わされることを示す。典型的に、プロモーター配列は、発現の制御と両立する距離をもって、目的の遺伝子の上流に配置される。同様に、輸送ペプチド配列は、一般的に、目的の遺伝子の配列の上流に、およびそれを伴うフレーム内に、および任意のプロモーターの下流に融合される。スペーサー配列は、それらが発現および/またはターゲティングを防止しない限り、調節エレメントと遺伝子との間に存在し得る。

【0040】

発現カセットは、好ましくは、特に、植物の毛状突起における発現を可能にするプロモーターを含んでなる。そのようなプロモーターは、当業者に公知である。

【0041】

本発明の趣旨において、「特異的」プロモーターは、所定の組織または細胞グループにおいて主に活性であるプロモーターを意味すると理解されるべきである。他の組織または細胞において一般的により低い残留発現は、全体的に除外され得ると理解されるべきである。本発明の特定の特徴は、植物の葉分泌の組成の改変を可能にし、および特に、目的のテルペンの調製を可能にするテルペンシンターゼのそこでの発現を可能にする腺毛の分泌細胞に特異的なプロモーターを構築する能力に基づく。

【0042】

例えば、CYP71D16遺伝子のATGの上流に局在する1852bpの調節配列は、タバコ毛状突起の分泌細胞におけるuidAレポーター遺伝子の発現を特異的に指令することが示されている(米国特許出願公開第2003/0100050A1号明細書、ワグナー(Wagner)ら、2003年)。さらに、異なる種から抽出されるいくらかのプロモーター配列が、タバコ毛状突起における異種遺伝子の発現を指令することが示さ

10

20

30

40

50

れている（表 1）。

【 0 0 4 3 】

前記プロモーターのうち、脂質転送に関与するワタタンパク質（LTP）をコードする LTP3 遺伝子のものは、ワタ線維細胞において特異的に発現される。タバコにおける遺伝子の調節配列（1548bp）が研究されている。前記配列は、葉の毛状突起における uidA 遺伝子の発現を特異的に指令する。ATG の -614 ~ -300 位上流に局在する 315bp の配列は、プロモーターの特異性の基礎になると考えられる。LTP6 遺伝子のプロモーターはまた、ワタにおける毛状突起特異的発現を可能にすることができる。しかし、文献に基づけば、発現は、毛状突起の基部の細胞において生じ、分泌細胞においては生じないようである。さらに、前記プロモーターがタバコに導入される場合、発現は、もはやそれほど高度には特異的でなく、特に、表皮細胞におけるシグナルを伴う（表 1 を参照のこと）。

10

【 0 0 4 4 】

本発明の好適な実施態様では、これが、カセットにおいて使用されるプロモーターが、CYC-2（CBT-オールサイクラーゼ；NID：AF401234）に高い配列相同性を示すニコチアナ・シルベストリス（*Nicotiana sylvestris*）種の NsTPS-02a、02b、03、および 04 遺伝子から誘導される理由である。前記プロモーターの配列を配列番号 5 ~ 8 に示す。従って、発現カセットに含有されるプロモーターは、それが、配列番号 5、6、7 もしくは 8 またはその機能的変種の配列のすべてまたは一部を含んでなることを特徴とする、腺毛において機能的転写プロモーター活性を有する核酸を含んでなる。より詳細には、その機能的変種は、[blastN 配列アライメントソフトウェア（アルトシュル（Altschul）ら、1990 年によって得られる）] 前記配列の 1 つに少なくとも 80、85 もしくは 90% 同一性を示す配列を意味することが理解されるべきであり、腺毛、特に、腺毛の分泌細胞に特有である。前記プロモーター配列については、2004 年 10 月 13 日に出願された FR 第 0410799 号明細書においてより詳細に記載されている。

20

【 0 0 4 5 】

ターミネーター配列のうち、NOSターミネーター（ベバン（Bevan）ら、1983, *Nucleic Acids Res.* 11(2), 369-385)、およびヒストン遺伝子ターミネーター（EPO 第 633317 号明細書）を引用することができる。

30

【 0 0 4 6 】

特定の実施態様では、発現カセットは、増加した発現（「エンハンサー」）を可能にする配列、例えば、CaMV35Sプロモーターおよびオクトピンシンターゼ遺伝子の所定のエレメント（米国特許第 5290924 号明細書）を含んでなることができる。好ましくは、CaMV35Sプロモーターのエンハンサーが使用される。エンハンサーの例を配列番号 9 の配列に示す。

【 0 0 4 7 】

転写される核酸は、目的のテルペンを合成することが可能なテルペンシンターゼをコードする。

【 0 0 4 8 】

本発明の特定の実施態様では、目的のテルペンはジテルペンである。好ましくは、目的のジテルペンはタキサンである。より詳細には、タキサンはタキサジエンであり得る。植物に導入される異種テルペンシンターゼは、ジテルペンシンターゼ、より詳細には、目的のジテルペンを合成することが可能なジテルペンシンターゼである。例えば、タキサジエンについては、ジテルペンシンターゼはタキサジエンシンターゼである。より詳細には、タキサジエンシンターゼはイチイのものである。図 8 は、タバコ毛状突起においてタキサジエンを産生させるためのストラテジーを例示する。イチイのタキサジエンシンターゼについての多くのコーディング配列およびタンパク質配列が公知である。参考の非網羅的リストを以下に示す。

40

【 0 0 4 9 】

50

【表 1】

コード配列参照	タンパク質配列参照
AY365032	AAR15329.1
AY364470	AAR13861.1
AY364469	AA13860.1
AY461450	AAS18603.1
U48796	AAC49310.1

10

【0050】

さらに、キャスペンについては、ジテルペンシターゼはキャスペンシターゼである。より詳細には、キャスペンシターゼはトウゴマのものである。非制限的例として、コーディング配列について参照 L 3 2 1 3 4 およびタンパク質配列について参照 P 5 9 2 8 7 を引用することができる。

【0051】

より一般的には、本発明は、公知であるか、またはその配列が下記のようなジテルペンシターゼの特徴に対応する任意のジテルペンシターゼに関する。

【0052】

いくらかのジテルペン類シターゼの遺伝子がクローニングされ、それらの機能が確認されている。これらは：タキサジエンシターゼ（ワイルダング（Wildung）およびクロテアウ（Croteau）、1996年）、アピエタジエンシターゼ（ペーターズ（Peters）ら、2000年）、レボピマラジエンシターゼ（シェプマン（Scheppmann）ら、2001年）、イソピマラジエンシターゼ（マーティン（Martin）ら、2004年）、キャスペンシターゼ（マウ（Mau）およびウエスト（West）、1994年）、センブラトリエン - オールシターゼ（ワング（Wang）およびワーグナー（Wagner）、2003年）、ent - キャスサジエン（cassadiene）シターゼ（チョ（Cho）ら、2004年）、ラブデン（labdene）シターゼ（セオ（Seo）ら、2003年）、syn - ピマラジエンシターゼ（ワイルダーマン（Wilderman）ら、2004年）、ent - コパルイル（copallyl）ニリン酸シターゼならびにent - カウレンシターゼ（サン（Sun）ら、1994年、プリシク（Prisic）ら、2004年）を含む。他のジテルペンシターゼ遺伝子は、現在、イネ（syn - ステマレン（stemarene）シターゼ、syn - ピマラジエンシターゼ、ent - サンダラコピマラジエンシターゼおよびent - キャスサジエン（cassadiene）シターゼ）ならびにタバコ（cis - アピエノールシターゼ）において特徴付けられている。

20

30

【0053】

ジテルペンシターゼのタンパク質配列は共通の特徴を共有する。未成熟タンパク質はすべて、N末端に葉緑体輸送ペプチドを含有する。すべてのジテルペンシターゼは、2つの特徴的なドメインを含有する。N末端ドメインはグリコシルヒドロラーゼ様ドメインと呼ばれ；C - 末端ドメインは触媒部位を含有する。

40

【0054】

ジテルペンシターゼは、3つの大きなクラスに再分割される。クラス1の酵素は、C - 末端ドメインにおいてDDXXDコンセンサスモチーフを有する。クラスIIの酵素は、N末端ドメインに局在する(D/E)XD(D/N)コンセンサスモチーフを有する（プリシク（Prisic）ら、2004年）。クラスIおよびIIの酵素は、連続的に反応して、ラブダン型の炭素骨格を作製し、一般的に、一次代謝（例えば：ent - コパルイル（copallyl）ニリン酸シターゼおよびent - カウレンシターゼ）の特徴であるが、また、イネ（例えば：ent - コパルイル（copallyl）ニリン酸シター

50

ーゼおよびent-キヤスサジエン(cassadiene)シンターゼ)におけるような二次代謝にも参加する。裸子植物の二次代謝に特有の他の酵素は、これらの2つのモチーフを含有し、従って、2つの触媒部位を伴う二官能性である(例えば:アビエタジエンシンターゼ)。二機能性であるにもかかわらず、それらはクラスIに列挙される。これらのすべての酵素(クラスIおよびII)は、CDIS(針葉樹ジテルペン内部配列)と呼ばれるN末端ドメインにおける配列によってさらに特徴付けられる。前記配列は、一般的に約215アミノ酸であり、シグナルペプチドとグリコシルヒドロラーゼ様ドメインとの間に局在する(トラップ(Trapp)およびクロテアウ(Croteau)、2001年)。

【0055】

被子植物では、クラスIIIの酵素は、C末端領域においてDDXDコンセンサスを有するが、クラスIおよびIIのCDISを有さない。前記酵素は、単一の反応工程で反応する。キヤペンシンターゼは、クラスIIIジテルペンシンターゼの例である。

【0056】

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)ゲノムは、クラスIIジテルペンシンターゼの基準(アウボーグ(Aubourg)ら、2002年)に一致する21の配列を含有する。アラビドプシス(*Arabidopsis*)遺伝子の国際命名法に従うそれらのゲノム座標は次のとおりである: At5g48110、At3g29410、At3g14490、At1g31950、At4g15870、At2g23230、At1g48800、At1g66020、At3g29110、At1g70080、At1g33750、At3g32030、At3g14520、At3g14540、At5g44630、At4g13280、At4g13300、At4g20210、At3g29190、At4g20230、At4g20200。遺伝子At3g29410、At3g14540、At1g33750、At3g32030およびAt1g48800によってコードされるタンパク質はまた、それらをクラスIの二官能性ジテルペンシンターゼに類似にするN末端ドメインにおけるクラスII型の(D/E)EDDモチーフを有する。従って、前記酵素は、単一の工程においてラブダノイド(labdanoïd)型ジテルペン類を産生することができる。これらの配列によってコードされるタンパク質のうち、認められているものはない。しかし、本発明者らは、遺伝子At3g29410、At3g14540によってコードされる2つのタンパク質を特徴付けることを試みた。

【0057】

本発明の別の特定の実施態様では、目的のテルペンはモノテルペンである。例えば、目的のモノテルペンはリモネンであり得る。非制限的例はまた、ピネン、ツジエン(thujene)、またはリナロールである。植物に導入される異種テルペンシンターゼは、モノテルペンシンターゼ、より詳細には、目的のモノテルペンを合成することが可能なモノテルペンシンターゼである。しかし、モノテルペン産生はまた、毛状突起において発現されるゲラニルピロリン酸シンターゼの導入を必要とする。ゲラニルピロリン酸シンターゼの非制限的例を以下に参考として示す。

【0058】

【表2】

生物体	コード配列参照	タンパク質配列参照
ヨーロッパブドウ(<i>Vitis vinifera</i>)	AY351862	AAR08151
ペパーミント(<i>Mentha piperata</i>)	AF182828	AAF08793
グランドモミ(<i>Abies grandis</i>)	AF513112	AAN01134
アラビドプシス t.(<i>Arabidopsis t.</i>)	Y17376	CAC16849

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

図 9 は、タバコ毛状突起においてモノテルペン類を産生させるためのストラテジーを例示する。例えば、リモネンについては、モノテルペンシターゼはリモネンシターゼである。リモネンシターゼについての多くのコーディング配列およびタンパク質配列が公知である。参照の非網羅的例を以下に示す。

【 0 0 6 0 】

【表 3】

コード配列参照	タンパク質配列参照
AY473624	AAS47694.1
AF514289	AAM53946.1
AF514287	AAM53944.1
AF317695	AAK06663.1
AF241793	AAG31438.1
AF241792	AAG31437.1
AF241791	AAG61436.1
AF241790	AAG31435.1
AF233894	AAF65545.1
AF175323	AAD50304.1

10

20

【 0 0 6 1 】

キャレネ (carene) シターゼ、ピネンシターゼ、ツジエン (thujene) シターゼ、およびリナロールシターゼは、モノテルペンシターゼの他の例である。

【 0 0 6 2 】

本発明の別の特定の実施態様では、目的のテルペンはセスキテルペンである。例えば、目的のセスキテルペンは、バレンセン、サンタレン、ゲルマクレンまたは epi - アリストロチェンであり得る。

30

【 0 0 6 3 】

植物に導入される異種テルペンシターゼは、セスキテルペンシターゼ、より詳細には、目的のセスキテルペンを合成することが可能なセスキテルペンシターゼである。しかし、セスキテルペン産生はまた、毛状突起において発現されるファルネシルピロリン酸シターゼの導入を必要とする。

【 0 0 6 4 】

【表 4】

生物体	コード配列参照	タンパク質配列参照
アラビドプシス(Arabidopsis)	L46367	AAF44787
ヨモギ(Artemisia)	AY308477	AAP74720
ハッカ(Mentha)	AF384040	AAK63847

40

【 0 0 6 5 】

図 10 は、タバコ毛状突起においてセスキテルペン類を産生させるためのストラテジーを例示する。例えば、バレンセンについては、セスキテルペンシターゼはバレンセンシ

50

ンターゼである。より詳細には、パレンセンシンターゼは、スイートオレンジのものである。非制限的例として、コーディング配列について参照 A F 4 4 1 1 2 4 およびタンパク質配列について参照 A A G 0 4 6 0 8 . 1 を引用することができる。

【 0 0 6 6 】

ゲルマクレンシンターゼ (S S T L H 1 遺伝子、参照 A F 2 7 9 4 5 5) および e p i - アリストロチェンシンターゼ (参照 A A A 1 9 2 1 6) は、セスキテルペンシンターゼの他の例である。

【 0 0 6 7 】

本発明の別の特定の実施態様では、目的のテルペンはトリテルペンである。例えば、目的のトリテルペンは、ラノステロール、シクロアルテノール、ルペオールまたは - アミリンであり得る。

10

【 0 0 6 8 】

植物に導入される異種テルペンシンターゼは、トリテルペンシンターゼ、より詳細には、目的のトリテルペンを合成することが可能なトリテルペンシンターゼである。しかし、トリテルペン産生はまた、毛状突起において産生されるファルネシルピロリン酸シンターゼ、スクアレンシンターゼ、およびスクアレンエポキシダーゼの導入を必要とする。

【 0 0 6 9 】

【 表 5 】

酵素	コード配列参照	タンパク質配列参照
スクアレンシンターゼ	D29017	BAA06103
スクアレンエポキシダーゼ	NM_104624	NP_564734

20

【 0 0 7 0 】

図 1 1 は、タバコ毛状突起においてトリテルペン類を産生させるためのストラテジーを例示する。例えば、ラノステロールについては、トリテルペンシンターゼはラノステロールシンターゼである。ラノステロールシンターゼについての多くのコーディング配列およびタンパク質配列が公知である。

30

【 0 0 7 1 】

ラノステロールシンターゼ、シクロアルテノールシンターゼ、ルペオールシンターゼおよび - アミリンシンターゼは、トリテルペンシンターゼの他の例である。

【 0 0 7 2 】

異種テルペンシンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる発現カセットを含有する構築物の導入に加えて、方法は、それぞれテルペン修飾酵素をコードする 1 つもしくはそれ以上の導入遺伝子の植物細胞への導入を含んでなることができる。特に、テルペン修飾は、水酸化、アシル化および特に、アセチル化、ベンゾイル化、脱水素化などであり得る。導入遺伝子の導入は、好ましくは、テルペン修飾酵素をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる発現カセットを導入することによって生じる。テルペン修飾酵素をコードするポリヌクレオチド配列は、毛状突起において、好ましくは、毛状突起特異的な発現を可能にするプロモーターの制御下にある。導入遺伝子は、異種テルペンシンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる構築物または異なる構築物によって担持され得る。例えば、前記修飾酵素は、とりわけ、P 4 5 0 モノオキシゲナーゼ、アシルトランスフェラーゼ、ベンゾイルトランスフェラーゼ、レダクターゼであり得る。テルペン修飾酵素をコードする遺伝子の非網羅的リストを以下の表に示す。

40

【 0 0 7 3 】

【表 6】

酵素	遺伝子 (Genbank 受託番号)	改変された テルペン骨格
タキソイド 2- α ヒドロキシラーゼ	AY518383	タキサジエン
タキサジエン 5- α ヒドロキシラーゼ	AY289209	タキサジエン
タキソイド 7- β ヒドロキシラーゼ	AY307951	タキサジエン
タキソイド 10- β ヒドロキシラーゼ	AY563635	タキサジエン
5- α -タキサジエノール-10- β -ヒドロキシラーゼ	AY453403	タキサジエン
タキサン 14b-ヒドロキシラーゼ	AY188177	タキサジエン
タキサン 13- α -ヒドロキシラーゼ	AY056019	タキサジエン
タキサンヒドロキシラーゼ	AY374652	タキサジエン
タキサジエン-5- α -オール-O- アセチルトランスフェラーゼ	AY628434	タキサジエン
タキサジエノールアセチルトランスフェラーゼ	AF190130	タキサジエン
10-デアセチルバッカチン III-10-O-アセチルトランスフェラーゼ	AF193765	タキサジエン
2-デベンゾイル-7,13-ジアセチルバッカチン III-2-O-ベンゾイルトランスフェラーゼ	AF297618	タキサジエン
3'-N-デベンゾイルタキソール N- ベンゾイルトランスフェラーゼ	AF297618	タキサジエン
タキソイドフェニルプロパノイルトランスフェラーゼ	AY082804	タキサジエン
タキサン 2- α -O-ベンゾイルトランスフェラーゼ	AY675557	タキサジエン
タキソイド-O-アセチルトランスフェラーゼ	AY628433	タキサジエン
5-エピ-アリストロチエン-1,3-ジヒドロキシラーゼ	AF368376	5-エピ-アリストロチエン
アビエタジエノール/ アビエタジエノールオキシダーゼ	AY779538	アビエタジエン、 デヒドロアビエタジエン、 レボピマラジエン、 イノピマラジエン
リモネン-3-ヒドロキシラーゼ	AAQ18708	リモネン
(-)-イソピペリテノールデヒドロゲナーゼ	AY641428	リモネン
(-)-イソピペリテノンレダクターゼ	AY300162	リモネン
(+)-プレゴンレダクターゼ	AY300163	リモネン
メントールデヒドロゲナーゼ	AY288138	リモネン

【 0 0 7 4 】

そのようにして形成される発現カセットは、ベクターに挿入される。ベクターは、DNA あるいは RNA であり得、環状または非環状、一本鎖もしくは二本鎖である。典型的に、それは、プラスミド、ファージ、ウイルス、コスミド、人工染色体などである。有利な

10

20

30

40

50

ことに、それは、即ち、植物細胞を形質転換することが可能な植物ベクターである。植物ベクターの例は、特に、*A. tumefaciens* (A. tumefaciens) T-DNAプラスミド pBIN19 (ベバン (Bevan)、1984年)、pPZP100 (ハジケウイクズ (Hajdukewicz)ら、1994年)、pCAMBIAシリーズ (R. ジェファソン (R. Jefferson)、CAMBIA、豪州)を含む文献に記載されている。本発明のベクターは、複製開始点および/または選択遺伝子および/または植物組換え配列などをさらに含んでなり得る。ベクターは、例えば、制限酵素、連結、クローニング、複製などを使用して、当業者に周知の従来分子生物学的方法によって、構築することができる。

【0075】

選択遺伝子は、非排他的様式で、抗生物質もしくは除草剤に対する耐性を付与する遺伝子のようなマーカー遺伝子、またはポジティブ選択システム、特に、MPI選択遺伝子の存在下でのマンノースに対する選択に基づくシステム (マンノース-6-リン酸イソメラーゼ) (ハンセン (Hansen) およびライト (Wright)、1999年)、または選択後のマーカー遺伝子の排除に接続する選択システム (エビヌマ (Ebinuma)ら、1997年)の使用を含んでなる。最終的に、形質転換された植物はまた、選択マーカー遺伝子の非存在下でのPCRスクリーニングによって選択することができる (マックガーベイ (McGarvey) およびケーパー (Kaper)、1991年)。

【0076】

本構築物の種子または植物を含む植物細胞もしくは組織への導入は、当業者に既知の任意の方法によって担持され得、例えば、細菌アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、エレクトロポレーション、接合伝達、遺伝子銃法、特に、ウイルスベクターによるトランスフェクションおよび当業者に公知の他の任意の方法を含んでなることができる。

【0077】

一般的に使用される方法は、主に、目的の構築物 (核酸、カセット、ベクターなど) を細菌 *A. tumefaciens* (*A. tumefaciens*) に導入し、次いで、前記細菌と選択された植物のリーフディスクとを接触させることにある細菌アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) の使用に基づく。発現カセットは、典型的に、ベクターとして、例えば、熱ショックによって細菌に伝達することができる Ti プラスミド (または T-DNA) を使用することによって、細菌に導入される。形質転換された細菌とリーフディスクとのインキュベーションは、Ti プラスミドのディスク細胞のゲノムへの伝達をもたらす。その細胞が本発明の構築物を含んでなるトランスジェニック植物を再生するために、場合により、後者を、適切な条件で培養することができる。 *A. tumefaciens* (*A. tumefaciens*) 形質転換方法のさらなる詳細または変形の実施については、例えば、ホーシュ (Horsch)ら、1985年またはホーカス (Hooykaas) およびシルペルト (Schilperroort)、1992年を参照することができる。

【0078】

従って、特定の実施態様では、そのようにして形成される発現カセットは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) による植物細胞への伝達のためのディスアーム型 Ti プラスミドのトランスファー DNA (T-DNA) の左および右境界の間に挿入される。T-DNA はまた、その発現が抗生物質に対する耐性を付与し、形質転換体の選択を可能にする遺伝子を含んでなる。

【0079】

植物形質転換の別の方法は、直接植物細胞上に遺伝子構築物が付着される微粒子 (典型的にマイクロビーズ) を投射し、次いで、トランスジェニック植物を再構成するために前記細胞を培養することに基づく。使用される粒子は、典型的に金粒子であり、典型的にパーティクルガンによって投射される (特に、ラッセル (Russell)ら、*In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1992年、28P、97-105頁を参照の

10

20

30

40

50

こと)。

【0080】

マイクロインジェクション法は、主に、遺伝子構築物を植物プロトプラストまたは胚に注入し、次いで、植物体全体を再生するように前記組織を培養することに基づく。他の植物遺伝子導入法は周知であるか、または上記の方法を実施する他のプロトコルについては、先行技術(ジーメンス, J (Siemens, J) およびシーダー (Schieder), 1996年)に記載されており、本発明において用いることができる。

【0081】

特に、本発明は、高等植物(特に、被子植物)の腺毛の分泌細胞において特異的に目的のテルペン類を産生させるのに使用することができる。本発明は、特に、腺毛を有する科由来のすべての植物、例えば、キク科(Asteraceae)(ヒマワリなど)、ナス科(Solanaceae)(トマト、タバコ、ポテト、トウガラシ、ナスなど)、アサ科(Cannabaceae)(例えば、大麻(Cannabis sativa))およびシソ科(Lamiaceae)(ミント、バジル、ラベンダー、タイムなど)に適用可能である。本発明は、特に、例えば、ナス(Solanum)属、トマト(Lycopersicon)属、トウガラシ(Capsicum)属、ペチュニア(Petunia)属、ダチュラ(Datura)属、ベラドンナ(Atropa)属などのようなナス科(Solanaceae)ならびにタバコ属(Nicotianeae)、例えば、タバコ、およびより詳細には、野生型タバコニコチアナ・シルベストリス(Nicotiana sylvestris)由来の植物に適用される。非制限の様式では、本発明は、次の属由来の植物に適用され得る：ハコヤナギ(Populus)、トマト(Lycopersicon)、ニコチアナ(Nicotiana)、アサ(Cannabis)、アサガオ(Pharbitis)、アプテリア(Apteria)、ポチヨウジ(Psychotria)、ヤマアイ(Mercurialis)、キク(Chrysanthemum)、ポリポディウム(Polypodium)、テンジクアオイ(Pelargonium)、ミゾホウズキ(Mimulus)、シカギク(Matricaria)、モナルダ(Monarda)、ナス(Solanum)、ノコギリソウ(Achillea)、カノコソウ(Valeriana)、メボウキ(Ocimum)、ウマゴヤシ(Medicago)、トチノキ(Aesculus)、ルリマツリ(Plumbago)、ギンシダ(Pityrogramma)、ファセリア(Phacelia)、ヒルギダマシ(Avicennia)、ギョリュウ(Tamarix)、フランケニア(Frankenia)、イソマツ(Limonium)、ウイキョウ(Foeniculum)、イブキジャコウソウ属(Thymus)、アキギリ(Salvia)、サネカズラ(Kadsura)、ベイエリア(Beyeria)、カラハナソウ(Humulus)、ハッカ(Mentha)、ヨモギ(Artemisia)、ネペタ(Nepeta)、ガラエア(Geraea)、ポゴステモン(Pogostemon)、マヨラナ(Majorana)、クレオメ(Cleome)、サントリソウ(Cnicus)、パルセニウム(Parthenium)、リシノカルポス(Ricinocarpos)、ヒメナエア(Hymenaea)、ラレア(Larrea)、サクラソウ(Primula)、ファセリア(Phacelia)、オシダ(Dryopteris)、プレクトランサス(Plectranthus)、アツモリソウ(Cypripedium)、ペチュニア(Petunia)、ダチュラ(Datura)、トビカズラ(Mucuna)、トウゴマ(Ricinus)、オトギリソウ(Hypericum)、ハマジンチョウ(Myoporum)、アカシア(Acacia)、ジプロペルティス(Diplopeltis)、ハウチワノキ(Dodonaea)、ハルガニア(Halgania)、シアノステジア(Cyanostegia)、プロスタンテラ(Prostanthera)、アントセルシス(Anthocercis)、オレアリア(Olearia)、ビスカリア(Viscaria)。

【0082】

一旦再生されたら、異種テルペンシンターゼの発現または毛状突起における目的のテル

ペンの産生について、トランスジェニック植物を試験することができる。これは、葉滲出物を回収し、目的のテルペンが分泌されることが意図される場合、前記滲出物における目的のテルペンについて試験することによって行うことができる。これはまた、葉、およびより詳細には、毛状突起細胞における異種テルペンシンターゼの存在を分析することによって（例えば、mRNAまたはゲノムDNAを特異的プライマーもしくはプローブで分析することによって）行うことができる。場合により、改善されたレベルの発現を示す植物を得るために、植物を、選択、交配、処置などすることができる。

【0083】

この点について、本発明の別の目的は、上記で規定されるようなカセットまたはベクターを含んでなる改変された細胞に基づく。例えば、それは、特に、ナス科 (Solanaceae)、キク科 (Asteraceae)、アサ科 (Cannabaceae) またはシソ科 (Lamiaceae) 由来の植物細胞であり得る。細胞は、インビトロで培養し、培養において目的のテルペン類を産生させるか、あるいは（例えば、機能ゲノム学によって）異種テルペンシンターゼの特性を研究するために、組織または植物体全体を再構成するのに使用することができる。

10

【0084】

本発明の別の目的はまた、上記において規定されるような発現カセットもしくはベクターを含んでなる植物または播種しに基づく。より詳細には、本発明は、腺毛を有し、好ましくは、特に、毛状突起において、発現を可能にするプロモーターの制御下で、目的のテルペンの合成を可能にする異種テルペンシンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現カセットを含んでなるトランスジェニック種子または植物に関する。テルペンシンターゼがモノテルペンシンターゼである場合、トランスジェニック種子または植物は、毛状突起においてそれを発現させることが可能なプロモーターの制御下にある、ゲラニルピロリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現カセットをさらに含んでなる。テルペンシンターゼがセスキテルペンシンターゼである場合、トランスジェニック種子または植物は、毛状突起においてそれを発現させることが可能なプロモーターの制御下で、ファルネシルピロリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現カセットをさらに含んでなる。テルペンシンターゼがトリテルペンシンターゼである場合、トランスジェニック種子または植物は、毛状突起においてそれらを発現させることが可能なプロモーターの制御下で、ファルネシルピロリン酸シンターゼ、スクアレンシンターゼおよびスクアレンエポキシダーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現カセットをさらに含んでなる。

20

30

【0085】

本発明の好適な実施態様では、植物は、さらに、毛状突起において阻止された内因性テルペン産生経路を示す。好適な実施態様では、内因性テルペン産生経路は、毛状突起において特異的に阻止され、植物の他の部分において影響を受けるとしてもほとんど認められないことを意味する。内因性テルペン産生経路は、好ましくは、内因性テルペンシンターゼの発現を阻止することによって阻止される。しかし、本発明はまた、別のレベルで内因性テルペンを産生する経路を阻止することを提供する。

【0086】

内因性テルペンシンターゼの発現は、当業者に公知の多くの利用可能な技術によって阻止することができる。テルペンシンターゼ遺伝子は、欠失、変異（例えば、EMSによる化学変異もしくは放射線）または分断（挿入変異誘発）することができる。さらに、内因性テルペンシンターゼの発現は、転写物インヒビターを発現することによる遺伝子サイレンシングによって阻止することができる。転写物インヒビターは、二本鎖RNAの形態をとることができるRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、三重鎖を形成することができるRNA、および内因性ジテルペンの転写物にいくらかの相補性または特異性を有するRNAである。

40

【0087】

本発明の特定の実施態様に従えば、転写物インヒビターは、アンチセンスRNAの形態

50

である。後者は、一般的に、内因性テルペンシターゼの転写物の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列を含んでなり、古典的ワトソン-クリック (Watson-Crick) 型相互作用を介して前記転写物に選択的にハイブリダイズする。従って、アンチセンスRNA型の転写物インヒビターは、テルペンシターゼの転写物に結合し、後者がmRNAである場合、例えば、目的の転写物の5'末端における細胞翻訳機構へのアクセスを阻止し、タンパク質へのその翻訳を妨害し、目的の導入遺伝子の発現のインヒビターでの抑制を可能にすることができる (クマー (Kumar) ら、Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62 (1993年) 1415-1434)。例えば、そのようなポリヌクレオチドについては、欧州特許第92574号明細書および同第140308号明細書に記載されている。転写物インヒビターがアンチセンスRNA型である場合、それは、ジテルペンシターゼ転写物のコーディング配列のすべてもしくは一部、または3'もしくは5'非コーディング配列のすべてもしくは一部を含み得る。好適な様式では、アンチセンス転写物インヒビターは、リボソーム結合性および翻訳開始配列に相補的である。好適な様式では、転写物インヒビターは、少なくとも10リボヌクレオチドの長さを有する。

10

【0088】

好適な実施態様では、転写物インヒビターは、RNA干渉の機構を利用する (バウルコンベ (Baulcombe)、2004年においてレビューされている)。好ましくは、前記サイレンシングは、イントロン-スプライスドヘアピン (intron-spliced hairpin) RNAまたはihpRNA法 (スミス (Smith) ら、2000年) によって行われる。このことは、センスフラグメントおよびアンチセンス配向でこの同じフラグメント (2つはイントロンによって分離される) を含んでなる構築物によって、標的遺伝子の二本鎖RNAを産生させることにある (ウェスリー (Wesley) ら、2001年; ワング (Wang) ら、特許出願、1999年)。前記構築物は、好ましくは、毛状突起特異的発現を可能にするプロモーターの制御下にある。

20

【0089】

しかし、本発明はまた、毛状突起において内因性テルペン産生経路を阻止するための当業者に公知の任意の手段を考慮する。事実、他のアプローチによってTPS遺伝子サイレンシング方法が達成され得ることを明記することは重要である。例えば、それは、放射線、例えば、線または高速中性子照射による欠失変異のライブラリーを作製することにより得る。所定の遺伝子座に影響を及ぼす欠失は、変異体から抽出されるDNAに対する多様な方法によって検出することができる (チッシサー (Tissier) およびモンタネ (Montane)、1999年)。放射線変異誘発の1つの利点は、遺伝子クラスター全体を含む欠失を単離する可能性である。これらの酵素を形成する遺伝子は、1つの遺伝子座に対してクラスター形成される極めて類似の遺伝子のファミリーを形成する (チッシサー (Tissier) ら、2004年; サラウド (Sallaud) ら、非公開データ) ため、ニコチアナ (Nicotiana) のセンブランシターゼ場合、これは特に関連性がある。

30

【0090】

本発明はまた、テルペン修飾酵素をコードする導入遺伝子をさらに含んでなる本発明に従うトランスジェニック種子または植物に関する。

40

【0091】

特に、本発明は、内因性ジテルペン合成経路が毛状突起において阻止される植物に関する。前記植物は、目的のテルペンを産生することが可能な最終植物を調製するための重要な中間体を表す。事実、前記植物は、目的のテルペンを産生することが可能な植物と、内因性ジテルペン合成経路が毛状突起において阻止される植物とを交配させることによって得ることができる。次いで、より詳細には、本発明は、内因性ジテルペン合成経路が毛状突起において阻止される植物に関する。本発明はまた、毛状突起における発現を可能にするプロモーターの制御下にある目的のテルペンの合成を可能にする異種テルペンシターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現カセットを含んでなるトランスジェ

50

ニック種子または植物を調製するための、内因性ジテルペン合成経路が毛状突起において阻止されるトランスジェニック植物の使用に関する。本発明は、さらに、内因性ジテルペン合成経路が毛状突起において阻止され、目的のテルペンを産生することが可能であるトランスジェニック種子または植物を調製するための方法であって、内因性ジテルペン合成経路が毛状突起において阻止されるトランスジェニック植物と、毛状突起における発現を可能にするプロモーターの制御下にある目的のテルペンの合成を可能にする異種テルペンシンターゼをコードするポリヌクレオチド配列を含有する発現カセットを含んでなるトランスジェニック植物とを交配させることを含んでなる上記方法に関する。

【0092】

本発明のなお別の目的は、それが、次の工程：a)本発明に従う発現カセットを含んでなる組換え植物宿主細胞を得る工程、b)工程a)において得られる組換え宿主細胞から植物全体を再生する工程、c)本明細書において規定されるような発現カセットを組み込んでいる工程b)において得られうる植物を選択する工程、を含んでなることを特徴とする、形質転換された植物を得るための方法である。

10

【0093】

本発明はまた、それが、次の工程：a)本発明に従うアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) の組換え宿主細胞を得る工程、b)工程a)において得られるアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 組換え宿主細胞による感染によって目的の植物を形質転換する工程、c)本明細書において規定されるような発現カセットをそれらのゲノムに組み込んでいる植物を選択する工程、を含んでなることを特徴とする、形質転換された植物を得るための方法を目的とする。

20

【0094】

本発明はまた、それが、次の工程：a)本発明に従う発現カセットまたは組換えベクターで少なくとも1つの植物細胞をトランスフェクトする工程、b)工程a)において得られる組換え植物細胞から植物全体を再生する工程、c)本発明に従う発現カセットをそれらのゲノムに組み込んでいる植物を選択する工程、を含んでなることを特徴とする、形質転換された植物を得るための方法を目的とする。

【0095】

形質転換された植物を得るための上記の方法のいずれか1つは、次のさらなる工程：d)工程c)において得られるような2つの形質転換された植物と、同じ種の植物とを交配させる工程、e)導入遺伝子についてホモ接合である植物を選択する工程とを含んでなることもできる。

30

【0096】

第2の特定の実施態様では、形質転換された植物を得るための上記の方法のいずれか1つは、次のさらなる工程：f)工程c)において得られる形質転換された植物と、同じ種の植物とを交配させる工程、g)導入遺伝子を保存している工程f)における交配から生じる植物を選択する工程を含んでなることもできる。

【0097】

本発明に従う少なくとも1つの植物と、別のものとを交配させることによって得られるハイブリッドトランスジェニック植物もまた、本発明の一部である。

40

【0098】

第1に、本発明は、a)植物の地上部を収穫すること、b)低極性または非極性型の溶媒において前記地上部をインキュベートすること、次いで、c)溶媒を排除することを含んでなる、植物の毛状突起の滲出物中の異種テルペン類または目的のテルペン類を回収するための方法に関する。好ましくは、前記植物は、本発明に従うトランスジェニック植物および特にタバコである。地上部は、好ましくは、葉および茎を意味すると理解されるべきである。低極性溶媒は塩化メチレンまたはクロロホルムであり得る。特定の実施態様では、溶媒は非極性、好ましくは、極めて非極性 (*very apolar*) である。例えば、溶媒は、ペンタンもしくはヘキサンまたは同じ極性を有する任意の溶媒、好ましくは

50

、ペンタンであり得る。インキュベーション工程は、振盪を伴う数秒間～振盪を伴わない浴中でのいくらかの時間、持続し得る。好ましくは、選択される溶媒は室温で揮発性であり、目的のテルペン類に対して化学的に不活性である。好ましくは、溶媒は、そのエバポレーションによって排除される。しかし、溶媒が排除されるあらゆる方法が本発明に包含される。

【0099】

さらに、本発明者らは、葉表面で抗菌特性を有する化合物の産生が阻止される植物が、植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする細菌による増強された効率の形質転換を示すことを発見した。化合物は、抗菌特性を有することができる。好適な実施態様では、化合物の阻止された産生は毛状突起に特有である。

10

【0100】

事実、テルペン類、特に、葉表面において分泌されるものは、しばしば、抗菌活性を有する化合物である（例えば、参考文献：トロネッタ（Trombetta）ら、2005年；チョリアノプウロス（Chorianopoulos）ら、2004年；フリードマン（Friedman）ら、2004年；リオス（Rios）およびレシオ（Recio）、2005年；サログロウ（Saroglou）ら、2005年）。その結果、抗菌活性を有する前記テルペン類の存在は、この目的のために使用される細菌、特に、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）属、リゾビウム（*Rhizobium*）、メソルヒゾビウム（*Mesorhizobium*）またはシノリゾビウム（*Sinorhizobium*）による前記植物の形質転換の障害となる（ブルートハーツ（Broothaerts）ら、2005年）。それは、前記分子が、形質転換中の細菌の増殖を阻害し、従って、植物細胞へのDNAトランスファーを阻害するからである。結果として、抗菌活性を有する前記テルペン類の排除は、不応な種を形質転換することを可能にするか、または形質転換が困難な種の形質転換頻度を増加するかのいずれかであり得る。

20

【0101】

好ましくは、前記細菌は、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）属、特に、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）、リゾビウム（*Rhizobium*）、シノリゾビウム（*Sinorhizobium*）、またはメソルヒゾビウム（*Mesorhizobium*）に属する。

【0102】

抗生物質特性を有する化合物はテルペンであり得る。例えば、それはジテルペンであり得る。好適な実施態様では、化合物はCBT-ジオールである。この場合、このテルペンの産生は、毛状突起における内因性テルペンシンターゼ、特に、ジテルペンシンターゼ、好ましくは、センプラトリエン-オールシンターゼの発現を阻止することによって、阻止することができる。この阻止を行うのに利用可能な手段については、上記で詳細に説明した。特に、これらには、遺伝子の物理化学的変異誘発、遺伝子の欠失、その挿入変異または「遺伝子サイレンシング」が含まれる。後者の方法が好適である。

30

【0103】

あるいは、抗生物質特性を有する化合物は、そのリストが網羅的でない次の化合物のうちの1つであり得る： -ピネン、ミルセン、オシメン、 -テルピネン、p-シメン、カルバクロール、チモール、リナロール、カンファー、テルピネオール、 -カリオフィレン、カリオフィレンオキサイド、パチョロール、ゲルマクレン類（A、B、CまたはD）、 -セリネン、カジネン、ピサボレン類（ 、 、 ）、ピサボロール、サンタレン類（ および ）、サンタロール類など、但しまた、多くのキク科（*Asteraceae*）種に存在するセスキテルペンラクトン類。

40

【0104】

従って、本発明は、植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする細菌によって前記植物を形質転換するための1つのそのようなトランスジェニック植物の使用に関する。本発明はまた、植物を形質転換するための方法に関し、前記植物は、葉表面で抗生物質特性を有する化合物の阻止された産生を示し、植物細胞へのDNAトランスファーを可能にし

50

、導入遺伝子を担持する細菌と、前記植物の細胞とを接触させることを含んでなる、上記方法に関する。好ましくは、前記植物の細胞は、葉断片、特に、リーフディスクに含まれる。本発明のなお別の目的は、それが、次の工程：a) 導入遺伝子を含んでなる植物細胞へのDNAトランスファーを可能にする組換え宿主細胞、好ましくは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) を得る工程、b) 葉表面での抗生物質特性を有する化合物の阻止された産生を示す植物を、工程a) で得られる組換え細菌宿主細胞による感染によって形質転換する工程、c) 導入遺伝子をそれらのゲノムに組込んである植物を選択する工程を含んでなることを特徴とする、形質転換された植物を得るための方法である。形質転換された植物を得るための上記の方法はまた、次のさらなる工程：d) 工程c) において得られるような2つの形質転換された植物と、同じ種の植物とを交配させる工程、e) 導入遺伝子についてホモ接合である植物を選択する工程を含んでなる。さらに、本方法は、さらなる次の工程：f) 工程c) において得られる形質転換された植物と、同じ種の植物とを交配させる工程、g) 導入遺伝子を保存している工程f) における交配から生じる植物を選択する工程を含んでなることができる。

10

20

30

40

50

【0105】

本発明は、テルペノイド生合成遺伝子の機能を同定するために、内因性ジテルペン類、特に、CBT-ジオールを産生するための経路が毛状突起において阻止される植物の使用に関する。より詳細には、CBT-ジオール産生経路は、センプラトリエン-オールシンターゼの発現を阻止することによって阻止することができる。

【0106】

本発明の他の態様および利点は、例示の目的のためであって、制限的方法によるものではない以下の実施例において理解されよう。

【実施例】

【0107】

非特異的プロモーターの制御下でのタキサジエンシンターゼの発現によるタバコ植物ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*) におけるタキサジエンの産生

下記の構築物は、毛状突起において含む植物のすべての細胞における発現を可能にした。前記発現は、毛状突起に非特有であるものとして説明する。

【0108】

発現ベクター

発現カセットを以下のとおりに構築した(図1の概念図を参照のこと)：

35S型の構成性プロモーター(カリフラワーモザイクウイルスから抽出される)は当業者に周知である。

タキサジエンシンターゼcDNA。

当業者に周知の(アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) Tiプラスミドのオクトピンシンターゼ遺伝子から抽出される)OCSターミネーター。

この構築物の配列を配列番号1の配列に示す。

【0109】

形質転換された植物の分析

再生プロセスにより、タキサジエンシンターゼを発現するトランスジェニック植物の単離がもたらされた。導入遺伝子の単一のコピーを含有する植物を選択し、ガスクロマトグラフィー質量分析検出(GC-MS)によって分析した。前記植物の滲出物は、 $14 \pm 3 \mu\text{g} / 1\text{g}$ のFM(新鮮物)を含有した(図5)。これらの植物の成長は、野生型コントロール(形質転換されていない)より遅かったため、それを培養に不適切にした。これらの効果は、トマトまたはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) におけるジテルペンシンターゼ過剰発現の場合において先に観察されており、トランスジェニック植物において利用可能なGGPPプールの減少に帰する(フライ(Fray)ら

、1995年；ベスマベス（Besumbes）ら、2004年）。GGPPは、ジベレリン類およびアブシジン酸のようなホルモンの合成における重要な代謝物である。

【0110】

タバコ、ニコチアナ・シルベストリス（*Nicotiana sylvestris*）におけるタキサジエンの毛状突起特異的産生

本実施例では、タキサジエンの産生を毛状突起に制限するように、タキサジエンシンターゼを、毛状突起特異的プロモーターNsCBTS-02a（チッシサー（Tissier）ら、2004年；仏国特許第0410799号明細書）の制御下に配置した。

【0111】

発現ベクター

発現カセットを以下のとおりに構築した（図2の概念図を参照のこと）：

1キロベースのNsCBTS-02aプロモーター。

タキサジエンシンターゼcDNA。

NsCBTS-02a遺伝子ターミネーター

この構築物の配列を配列番号2の配列に示す。

【0112】

形質転換された植物の分析

再生プロセスにより、毛状突起分泌細胞において特異的にタキサジエンシンターゼを発現するトランスジェニックタバコ植物の単離がもたらされた。単一コピーの導入遺伝子を含む植物を選択した。滲出物のGC-MS分析は、35Sプロモーターの制御下でのタキサジエンシンターゼの非特異的発現の場合に測定されるものに類似のタキサジエン含有量（ $10 \pm 1 \mu\text{g} / 1\text{g}$ のFM、図5）を示した。これらの植物の成長は、野生型（形質転換されていない）植物のものと同であった。さらに、花は正常な受粉を有した。これは、タキサジエンの毛状突起特異的合成が植物に対して何ら有害な影響を及ぼさないことを示し、従って、非特異的発現を超える毛状突起特異的発現の優位性を実証する。

【0113】

NsCBTS遺伝子の発現の阻害によるニコチアナ・シルベストリス（*Nicotiana sylvestris*）毛状突起における増加したタキサジエン産生

NsCBTS遺伝子を、RNA干渉の機構に関与する遺伝子サイレンシングによって不活化した（パウルコンベ（Paulcombe）、2004年においてレビューされている）。サイレンシングは、イントロン-スプライドヘアピン（intron-spliced hairpin）RNAまたはihpRNA法（スミス（Smith）ら、2000年）によって行った。それは、センスフラグメントおよびアンチセンス配向でこの同じフラグメント（2つのフラグメントはイントロンによって分離される）を含んでなる構築物によって、標的遺伝子（単数または複数）の二本鎖RNAを産生させることにある（ウェスリー（Wesley）ら、2001年；ワング（Wang）ら、特許出願、1999年）。より具体的には、以下のとおりにカセットを構築した（図3）：

NsCBTS-02aプロモーター（仏国特許第0410799号明細書）の1.7kbのフラグメント。

NsCBTS-02a遺伝子のエキソン2およびイントロン2、続いて、アンチセンス配向でこの同じ遺伝子のエキソン2を含んでなるフラグメント。

NOSTターミネーター。

【0114】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）による前記カセットの形質転換により、CBTS遺伝子のihpRNA構築物を発現するトランスジェニック植物が得られた。単一コピーの導入遺伝子を含む植物を選択した。これらの植物の子孫を、CBT-ジオール含有量について分析した。図6は、CBT-ジオール分泌が、ihpTPS植物においてほぼ完全に阻止された（WTの0.1~1%）ことを示す。

【0115】

10

20

30

40

50

次いで、前記植物を、毛状突起において特異的にタキサジエンシンターゼを発現する植物と交配させた（上記を参照のこと）。この交配の子孫において、選択培地上で両方の構築物を担持する植物を選択し、GC-MSによりタキサジエン含有量について分析した。

【0116】

これらの植物におけるタキサジエン産生は、毛状突起特異的プロモーターの制御下でタキサジエン発現カセットのみを発現する植物より約30倍高かった。

【0117】

タバコ、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana glauca*) におけるキャスペンの毛状突起特異的産生
発現ベクター

キャスペンシンターゼの毛状突起特異的発現は、以下のような発現カセット（図4：概念図および配列）における特異的プロモーターNsCBTS-02aの使用を必要とした。

1キロベースのNsCBTS-02aプロモーター。

キャスペンシンターゼの完全なcDNA。

NsCBTS-02aターミネーター

【0118】

形質転換された植物の分析

再生プロセスにより、毛状突起分泌細胞において特異的にキャスペンシンターゼを発現するトランスジェニック植物の単離がもたらされた。単一コピーの導入遺伝子を含む植物のGC-MS分析により、約15 μ g/1gのFMのキャスペン含有量が示された。これらの植物の成長は、野生型（形質転換されていない）植物のものと同一であった。このことから、タキサジエンについて、毛状突起におけるキャスペンシンターゼの特異的合成は、植物に対して有害な影響を及ぼさないことが確認される。

【0119】

35S転写アクチベーター（エンハンサー）を使用することによる導入遺伝子の増加した発現

CYP71D16遺伝子の1.8kbプロモーターの制御下でのタキサジエンシンターゼの発現を、同じプロモーター（但し、その前方に、35Sプロモーターのエンハンサー（配列番号9）がある）の制御下でタキサジエン-5'-ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子の発現と比較した。発現の定量分析を、リアルタイム定量PCRおよび遺伝子に特有なTaqMan（登録商標）プローブの使用によって行った。

【0120】

図7の結果は、タキサジエン-5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子の発現がタキサジエンシンターゼ遺伝子の発現より1000倍高かったことを示す。プロモーターは他のすべての点において、同一であったため、35Sプロモーターエンハンサーは、この活性化を担ったことが推論され得る。

【0121】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) による遺伝子形質転換の増加した効率

ihpTPS導入遺伝子を担持するホモ接合体系統（系統番号804）を、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana glauca*) から作製した。この系統は、葉表面においてもはやCBT-ジオールを産生しない（図6を参照のこと）。N.シルベストリス (*N. glauca*) の葉および系統番号804から得られるリーフディスクを、カナマイシン耐性遺伝子および目的の異なる導入遺伝子を担持するT-DNAを含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) の異なる株に感染させた（表2）。アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) との共培養の3日後、リーフディスクを、カナマイシン（150mg/L）を含む選択培地に移した。選択の4週間後、多数の耐性カルスが、系統番号804由来のリーフディスク上に出

10

20

30

40

50

現した(図12)。全体から見て、系統番号804によって得られる形質転換された植物の数は、*N. sylvestris*コントロールの5~10倍であった。これらの所見は、異なる導入遺伝子を担持するアグロバクテリウム(*Agrobacterium*)株を使用するいくらかの実験によって確認された(表2)。結論として、葉表面でのCBT-ジオール分泌を排除することは、遺伝子形質転換の効率を改善する。

【0122】

イチイ由来のシトクロムP450モノオキシゲナーゼをコードする遺伝子の機能の同定
毛状突起特異的プロモーター(仏国特許出願第0410799号明細書)の制御下にあるタキサジエンシンターゼをコードする導入遺伝子(NID:U48796)および同じプロモーターの制御下にあるタキサジエン5-ヒドロキシラーゼをコードする導入遺伝子(T5H、NID:AY289209)を、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)によって、*N. sylvestris*および系統ihpTPS(番号804)に導入した。形質転換された植物の滲出物を、葉をペンタンに浸漬することによって抽出した。滲出物中に存在する化合物を、ガスクロマトグラフィー、続いて、質量分析検出(GC-MS)によって分析した。タキサジエンシンターゼ導入遺伝子のみを含有する植物は、滲出物中にタキサジエンを産生した(図13A)。両方の導入遺伝子を含有する植物は、タキサジエンを産生せず、タキサジエンがT5Hの基質であることが確認された。ihpTPS植物では、主要な新たな産物がGC-MSクロマトグラム上で高度に認められるようになった(図13D)。*N. sylvestris*植物の滲出物における豊富なCBT-ジオールのため、前記産物は、2つの導入遺伝子をもまた含有するこれらの植物において検出されなかった(図13B)。結論として、ihpTPS系統の滲出物における極めて低いレベルのCBT-ジオールにより、毛状突起において発現される酵素の産物を同定し、従って、対応する遺伝子の機能を決定することがより容易になった。さらに、産物を容易に精製することができ、それによって、その特徴付けおよび産生を可能にする。

【0123】

参考文献

- アルトシュル SF (Altschul SF)、ギッシュ W (Gish W)、ミラー W (Miller W)、マイアーズ EW (Myers EW)、リップマン, DJ (Lipman, DJ) (1990年) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- アウボーグ S (Aubourg S)、レチャーニー A (Lecharny A)、ボールマン J (Bohlmann J) (2002年) *Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of Arabidopsis thaliana. Mol. Genet. Genomics* 267: 730-745
- ボールマン J (Bohlmann J)、マイヤー-ガウエン (Meyer-Gaue n)、クロテアウ R (Croteau R) (1998年) *Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4126-33
- バウルコンベ D (Baulcombe D) (2004年) *RNA silencing in plants. Nature* 431: 356-363
- ベスマベス O (Besumbes O)、サウレット-グエト S (Sauret-Gueto S)、フィリップス MA (Phillips MA)、インペリアル S (Imperial S)、ロドリゲス-コンセプション M (Concepcion M)、ボロナット A (Boronat A) (2004年) *Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in Ar*

10

20

30

40

50

- abidopsis for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. *Biotechnol. Bioeng.* 88:168-75
- ボテラ-パビア P (Botella-Pavia P)、ベスムベス O (Besumbes O)、フィリップス MA (Phillips MA)、カルレテロ-ポーレット L (Carretero-Paulet L)、ボロナット A (Boronat A)、ロドリゲス-コンセプション M (Concepcion M) (2004年) Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.* 40:188-99 10
- ブルートハーツ W (Broothaerts W)、ミッチェル HJ (Mitchell HJ)、ウィア B (Weir B)、ケインズ S (Kaines S)、スミス LM (Smith LM)、ヤン W (Yang W)、メイヤー JE (Mayer JE)、ロア-ロドリゲス C (Roa-Rodriguez C)、ジェファソン RA (Jefferson RA) (2005年). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433:629-633
- チョ EM (Cho EM)、オカダ A (Okada A)、ケンモク H (Kenmoku H)、オオトモ K (Otomo K)、トヨマス T (Toyomasu T)、ミツハシ W (Mitsuhashi W)、サッサ T (Sassa T)、ヤジマ A (Yajima A)、ヤブタ G (Yabuta G)、モリ K (Mori K)、オイカワ H (Oikawa H)、トシマ H (Toshima H)、シブヤ N (Shibuya N)、ノジリ H (Nojiri H)、オオモリ T (Omori T)、ニシヤマ M (Nishiyama M)、ヤマネ H (Yamane H) (2004年) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding ent-cassa-12,15-diene synthase, a putative diterpenoid phytoalexin biosynthetic enzyme, from suspension-cultured rice cells treated with a chitin elicitor. *Plant J.* 37:1-8 20
- チョリアノプウロス N (Chorianopoulos N)、カルポートザキス E (Kalpoutzakis E)、アリギアニス N (Aligiannis N)、ミタク S (Mitaku S)、ナイチャス GJ (Nychas GJ)、ハロウトニアン SA (Haroutounian SA) (2004年). Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J Agric Food Chem.* 52:8261-8267 30
- エビヌマ H (Ebinuma H)、スギタ K (Sugita K)、マツナガ E (Matsunaga E)、ヤマカド M (Yamakado M) (1997年) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 3月18日; 94(6):2117-2121
- フライ RG (Fray RG)、ウォーレス A (Wallace A)、フレーザー PD (Fraser PD)、パレロ D (Valero D)、ヘッデン P (Hedden P)、ブラムリー PM (Bramley PM)、グリアソン D (Gri 40
- 50

- erson D) (1995年) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J.* 8: 693 - 701
- フリードマン M (Friedman M)、ヘニカ PR (Henika PR)、レビン CE (Levin CE)、マンドレル RE (Mandrell RE) (2004年). Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric Food Chem.* 52: 6042 - 6048 10
- ハンセン G (Hansen G)、ライト MS (Wright MS) (1999年) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* 4: 226 - 231
- ヒーマン V (Heemann V)、ブレーマー U (Braummer U)、パウルゼン C (Paulsen C)、シーホファー F (Seehofer F) (1983年) Composition of the leaf surface gum of some *Nicotiana* species and *Nicotiana tabacum* cultivars. *Phytochem.* 22: 133 - 135 20
- ホーカス PJ (Hooykaas PJ)、シルペルト RA (Schilperort RA) (1992年) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 20: 175
- ホーシュ RB (Horsch RB)、ロジャーズ SG (Rogers SG)、フレイリィ RT (Fraley RT) (1985年) Transgenic plants. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* 50: 433 - 7
- ジェンバイン S (Jennewein S)、クロテアウ R (Croteau R) (2001年) Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 13 - 9 30
- ジェンバイン S (Jennewein S)、ワイルデュング MR (Wildung MR)、チャー M (Chau M)、ウォーカー K (Walker K)、クロテアウ R (Croteau R) (2004年) Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9149 - 9154
- マーティン DM (Martin DM)、ファルド J (Faldt J)、ボールマン J (Bohlmann J) (2004年) Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol.* 135: 1908 - 1927 40
- マウ CJ (Mau CJ)、ウエスト C (West C) (1994年) Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8497 - 8501
- マックガーベイ P (McGarvey P)、ケーパー JM (Kaper JM) (50

- 1991年) A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *Biotechniques* 10月; 11(4): 428-32
- ペータース RJ (Peters RJ)、フローリ JE (Flory JE)、ジェットー R (Jetter R)、ラビン MM (Ravn MM)、リー HJ (Lee HJ)、コーツ RM (Coates RM)、クロテアウ RB (Croteau RB) (2000年) Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*): characterization and mechanism of action of the "pseudomature" recombinant enzyme. *Biochemistry* 39: 15592-15602 10
- プリシク S (Prisic S)、クー M (Xu M)、ワイルダーマン PR (Wilderman PR)、ペータース RJ (Peters RJ) (2004年) Rice Contains Two Disparate ent-Copalyl Diphosphate Synthases with Distinct Metabolic Functions. *Plant Physiol.* 136: 4228-4236
- リオス JL (Rios JL)、レシオ MC (Recio MC) (2005年). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 100: 80-84 20
- サログロウ V (Saroglou V)、カリオチ A (Karioti A)、デメツォス C (Demetzos C)、ディマス K (Dimas K)、スカルツサ H (Skaltsa H) (2005年) Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *J Nat Prod.* 68: 1404-1407
- シェプマン HG (Schepmann HG)、パング J (Pang J)、マツダ SP (Matsuda SP) (2001年) Cloning and characterization of Ginkgo biloba levopimaradiene synthase which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 392: 263-269 30
- セオ S (Seo S)、セト H (Seto H)、コシノ H (Koshino H)、ヨシダ S (Yoshida S)、オオハシ Y (Ohashi Y) (2003年) A diterpene as an endogenous signal for the activation of defense responses to infection with tobacco mosaic virus and wounding in tobacco. *Plant Cell.* 15: 863-873
- セバーソン RF (Severson RF)、ジョンソン AW (Johnson AW)、ジャクソン DM (Jackson DM) (1985年) Cuticular constituents of tobacco: factors affecting their production and their role in insect and disease resistance and smoke quality. *Recent Advances in Tobacco Science* 11: 105-173 40
- ジューメンズ J (Siemens J)、およびシーダー A (Schieder A) (1996年) *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 2: 66-75
- スミス NA (Smith NA)、シング SP (Singh SP)、ワング MB 50

- (Wang MB)、ストートジェスヂジユク PA (Stoutjesdijk PA)、グリーン AG (Green AG)、ウォーターハウス PM (Waterhouse PM) (2000年) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407:319-20
- サン TP (Sun TP)、カミヤ Y (Kamiya Y) (1994年) The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*. 6:1509-1518
- チッシサー A (Tissier A)、モンタネ M-H (Montane M-H) (1999年) Methods for producing a library of mutants and applications thereof. 仏国特許第9913515号明細書 10
- チッシサー A (Tissier A)、サラウド C (Sallaud C)、ロンテイン D (Rontein D) (2004年) Plant promoters and uses thereof. 仏国特許出願第0410799号明細書
- トラップ SC (Trapp SC)、クロテアウ RB (Croteau RB) (2001年) Genomic organization of plant terpen synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158:811-832
- トロンベッタ D (Trombetta D)、キャストリ F (Castelli F)、サーピートロ MG (Sarpietro MG)、ヴェヌーティ V (Venuti V)、クリスタニ M (Cristani M)、ダニエル C (Daniele C)、サイジャ A (Saija A)、マツザンチ G (Mazzanti G)、ビシグナノ G (Bisignano G) (2005年) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:2474-2478 20
- ターナー GW (Turner GW)、ガーシェンゾン J (Gershenzon J)、クロテアウ R (Croteau R) (2000年) Development of peltate glandular trichomes of pepper mint. *Plant Phys*. 124:665-680 30
- ワグナー GJ (Wagner GJ)、ワング E (Wang E)、シェパード RW (Shepherd RW) (2004年) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93:3-11
- ワング E (Wang E)、ワング R (Wang R)、デパラシス J (DeParasis J)、ラフリン JH (Loughrin JH)、ガン S (Gan S)、ワグナー GJ (Wagner GJ) (2001年) Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat. Biotechnol*. 19:371-374 40
- ワング E (Wang E)、ワグナー GJ (Wagner GJ) (2003年) Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing. *Planta* 216:686-691
- ワング M-B (Wang M-B)、グレアム MW (Graham MW)、ウォーターハウス PM (Waterhouse PM) (1999年) Methods an 50

d means for obtaining modified phenotypes
s. 特許出願国際公開第9953050号パンフレット

ウェスリー SV (Wesley SV)、ヘリウエル CA (Helliwell CA)、スミス NA (Smith NA)、ワング MB (Wang MB)、ラウス DT (Rouse DT)、リュウ Q (Liu Q)、グッディング PS (Gooding PS)、シング SP (Singh SP)、アボット D (Abbott D)、スタートジェスヂユク PA (Stoutjesdijk PA)、ロビンソン SP (Robinson SP)、グリーブ AP (Gleave AP)、グリーン AG (Green AG)、ウォーターハウス PM (Waterhouse PM) (2001年) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27:581-90

10

ワイルダーマン PR (Wilderman PR)、クー M (Xu M)、ジン Y (Jin Y)、コーツ RM (Coates RM)、ペータース RJ (Peter s RJ) (2004年) Identification of syn-pimara-7,15-diene synthase reveals functional clustering of terpene synthases involved in rice phytoalexin/allelochemical biosynthesis. *Plant Physiol.* 135:2098-2105

ワイルデュング MR (Wildung MR)、クロテアウ R (Croteau R) (1994年) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyses the committed step of taxol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 271:9201-9204

20

【0124】

【表 7】

遺伝子略称	遺伝子の名称	植物	プロモーター (bp)	形質転換 された植物	発現	参考文献
LTP3	脂質輸送 タンパク質	ワタ	1548 1143 614	タバコ	毛状突起、葉の周辺 表皮および導管組織	Liu et al., 2000, BBA, 1487:106111
LTP6	脂質輸送 タンパク質	ワタ	447 272	タバコ	毛状突起および 孔辺細胞	Hsu et al., 1999, Plant Science, 143:6370
wax9D	脂質輸送 タンパク質	カンラン (Brassica oleracea)	972	タバコ	葉、茎および花の表皮、 花弁、萼片、胚珠、 ならびに毛状突起	Pyee and Kolattukudy, 1995, Plant J. 7:4559
LTP1	脂質輸送 タンパク質	アラビドプシス	1149	アラビドプシス	多様な組織の 表皮細胞	Thoma et al., 1994, Plant Physiol. 105 3545
CYC71D16	CBT オール ヒドロキシラーゼ	タバコ	1852	タバコ	毛状突起	Wang et al., 2002, J. Exp. Bot. 189:11897

表1

10

20

30

40

【 0 1 2 5 】

表 2 .

N . シルベストリス (N . s y l v e s t r i s) 対系統番号 8 0 4 の形質転換効率の比較。 Km : カナマイシン ; No . : 数 ; 番号 8 0 4 : i h p T P S 導入遺伝子を担持す

50

るN・シルベストリス(N・sylvestris)導入遺伝子の説明。FPS:トマトのファルネシルピロリン酸シターゼをコードする遺伝子(Genbank受託番号AF048747);TPFPS:葉緑体輸送ペプチドを伴うFPS。SSLTH:トマトのゲルマクレンシターゼをコードする遺伝子(Genbank受託番号AF279455)。TPSSLTH:葉緑体輸送ペプチドを伴うSSLTH。キャспен:トウゴマのキャспенシターゼをコードする遺伝子(Genbank受託番号L32134)。GUSi:細菌における発現を防止するためのイントロンを伴う大腸菌(Escherichia coli)uidA遺伝子。

【0126】

【表8】

10

実験番号	アグロバクテリウム株	T-DNA耐性	導入遺伝子	リーフディスクの数	得られた植物の(N.シルベストリス(N.sylvestris))数	得られた植物の数(番号804)
1	LBA4404	Km	FPS+SSLTH	100	4	41
2	LBA4404	Km	キャспен	65	3	27
3	LBA4404	Km	GU Si/TPFPS/TPSS TLH	140	9	40

20

【図面の簡単な説明】

【0127】

【図1】タバコの細胞における非特異的タキサジエンシターゼ発現カセット。

【図2】タバコ毛状突起におけるタキサジエンシターゼ発現カセット。

【図3】NsTPS遺伝子サイレンシングのためのRNAi構築物。

【図4】タバコ毛状突起におけるキャспенシターゼ発現カセット。

【図5】35SまたはNsTPS-02aプロモーターの制御下でタキサジエンシターゼを発現する系統におけるタキサジエン分泌。タキサジエンシターゼ発現を制御する35SまたはNsTPS-02aプロモーターを伴う構築物を、ニコチアナ・シルベストリス(Nicotiana sylvestris)のゲノムにクローニングした。導入遺伝子の単一のコピーを担持する植物の滲出物において分泌されるタキサジエンをペンタンで抽出し、GC-MSにより定量した。タキサジエン含有量を $\mu\text{g}/1\text{g}$ の新鮮物で表す。それぞれ35SおよびNsTPS-02aプロモーターについて、合計で12および5つの植物を分析した。(TS:タキサジエンシターゼ、WT:野生型)

30

【図6】ihpTPS RNAiを発現する植物におけるCBT-ジオール分泌。CBT-ジオールを、ニコチアナ・シルベストリス(Nicotiana sylvestris)滲出物からペンタンで抽出し、GC-MSにより定量した。WTのCBT-ジオール含有量を100%に設定した。形質転換体の子孫由来の植物(T1)をihpTPSによって表す。

40

【図7】毛状突起における発現に対する35Sプロモーターエンハンサーの効果。タバコ葉(N・シルベストリス(N・sylvestris))由来の全RNAを抽出し、逆転写によって相補的DNAに変換した。発現比を、定量的デュプレックスPCR(CYP71D16に対してVICフルオロフォアおよび導入遺伝子に対してFAM)によって決定した。N=5の植物を分析した。(e35S:プロモーター35Sのエンハンサー、p:プロモーター)。

【図8】タバコ毛状突起(ニコチアナ・シルベストリス(Nicotiana sylvestris))におけるタキサジエン産生をもたらす工程の概説。GGPP:ゲラニルゲラニルピロリン酸;CBT-オール:センブラトリエン-オール;CBT-ジオール:センブラトリエン-ジオール;CBTS:センブラトリエン-オールシターゼ;CBT

50

ol-OH：センブラトリエン-オールヒドロキシラーゼ。Prom：好ましくは、特異的様式で、毛状突起における発現を可能にするプロモーターを示す。TS：タキサジエンシンターゼ；term：転写ターミネーター。CBTS RNAi：CBTS合成を可能にする遺伝子が、ihpRNA型の構築物によってサイレンシングされているタバコ植物を示す（実施例を参照のこと）。

【図9】タバコ毛状突起（ニコチアナ・シルベストリス（*Nicotiana sylvestris*））におけるモノテルペン産生をもたらす工程の概説。説明：GGS：ゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼ；GS：ゲラニルピロリン酸シンターゼおよび図7に同じ。

【図10】タバコ毛状突起（ニコチアナ・シルベストリス（*Nicotiana sylvestris*））におけるセスキテルペン産生をもたらす工程の概説。説明：FS：ファルネシルピロリン酸シンターゼならびに図7および8に同じ。

【図11】タバコ毛状突起（ニコチアナ・シルベストリス（*Nicotiana sylvestris*））におけるトリテルペン産生をもたらす工程の概説。

【図12】CBT-ジオール産生が鋭敏に減少したN・シルベストリス（*N. sylvestris*）植物の葉由来のリーフディスクに対して得られる遺伝子形質転換の増加した効率の例示。カナマイシン耐性遺伝子および目的の導入遺伝子を含有する同じアグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）株との共培養の3週間後に、写真を撮影した。WT：N・シルベストリス（*N. sylvestris*）；ihpTPS：ihpTPS導入遺伝子を含有するN・シルベストリス（*N. sylvestris*）。

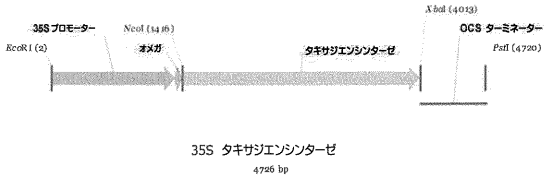
【図13】図13A。TS：タキサジエンシンターゼのみを発現する植物由来の滲出物のクロマトグラム。タキサジエンに特徴的なイオン122を抽出することによって、GC/MSにより、滲出物において、タキサジエンを検出した。図13B。TS+T5H：タキサジエンシンターゼ（TS）およびタキサジエン5-ヒドロキシラーゼ（T5H）を発現する植物由来の滲出物のGC-MSクロマトグラム（抽出されたイオン：191）。タキサジエンはもはや認められず、CBT-ジオール以外の他の産物が認められた。図13C。TS+ihpTPS。ihpTPSバックグランドにおいてTSを発現する植物由来の滲出物のGC-MSクロマトグラム（抽出されたイオン：122）。CBT-ジオールが排除され、タキサジエンの検出を容易にした。図13D。TS+T5H+ihpTPS。ihpTPSバックグランドにおいてTSおよびT5Hを発現する植物由来の滲出物のGC-MSクロマトグラム（抽出されたイオン：191）。CBT-ジオールはもはや検出されなかったが、酸化型タキサジエン（タキサジエンに対するタキサジエン5-ヒドロキシラーゼの反応の産物）に対応するピークは容易に検出された。

10

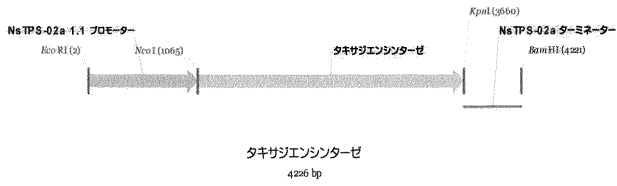
20

30

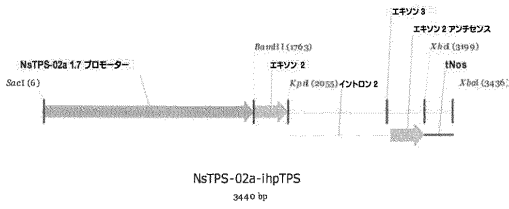
【 図 1 】



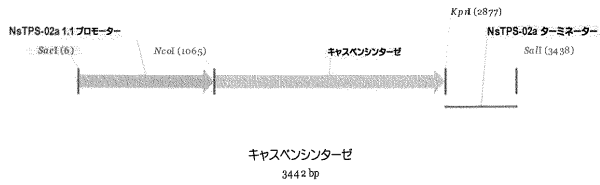
【 図 2 】



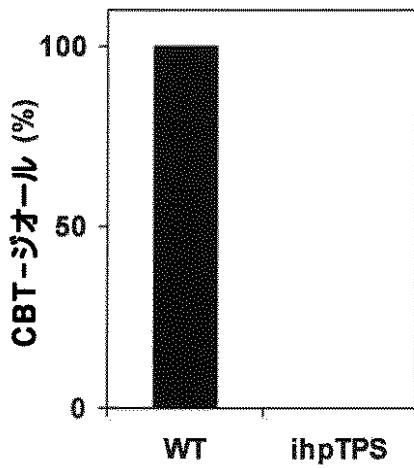
【 図 3 】



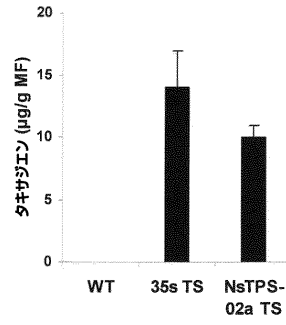
【 図 4 】



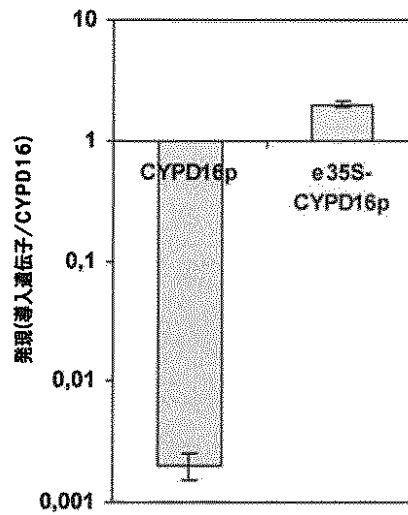
【 図 6 】



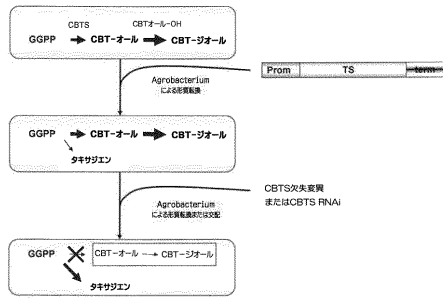
【 図 5 】



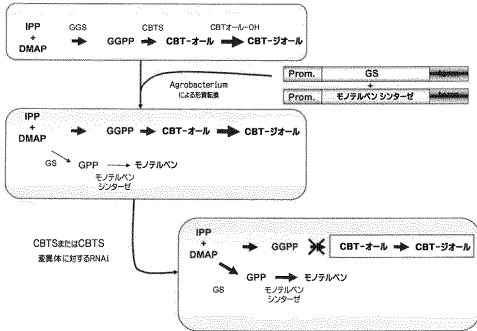
【 図 7 】



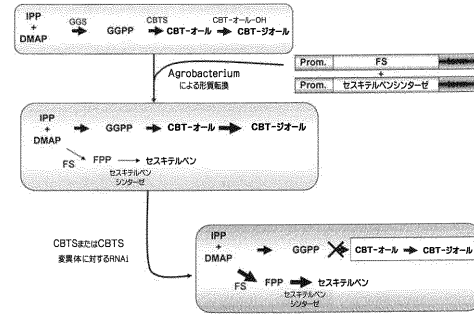
【 図 8 】



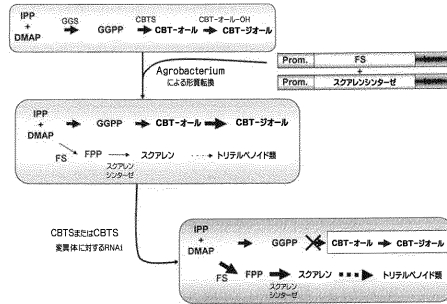
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】

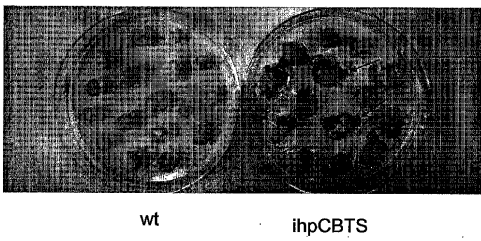
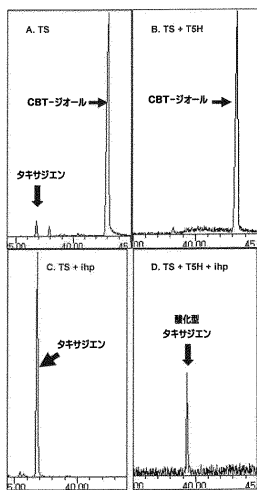


FIGURE 12

【 図 13 】



【配列表】

2008528016000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年9月26日(2007.9.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008528016000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/000188

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/82 C12N15/11 C12N9/10		
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) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 99/38957 A (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION; THE REGENTS OF THE UN) 5 August 1999 (1999-08-05) page 5, line 28 - line 36; claims 1-12; figures 1,3 page 6, line 26 - page 7, line 8 page 16, line 11 - page 17, line 24 page 11, line 9 - line 14 ----- -/--	1-5, 13-16, 18-23 6-10,17, 24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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 document 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 May 2006		Date of mailing of the international search report 19/05/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, D

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/000188

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG E ET AL: "Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing" PLANTA, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 216, no. 4, February 2003 (2003-02), pages 686-691, XP002318258 ISSN: 0032-0935 cited in the application	34
Y	abstract; figure 1	6,7,17,24
X	WO 93/07266 A (IDAHO RESEARCH FOUNDATION, INC) 15 April 1993 (1993-04-15) page 19, line 33 - page 20, line 22; claims 1-39; figures 1-3	25-27,31-33
X	MAHMOUD S S ET AL: "Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 98, no. 15, 17 July 2001 (2001-07-17), pages 8915-8920, XP002965001 ISSN: 0027-8424	24
Y	abstract; figures 1,2 page 8918, right-hand column, paragraph 2 - page 8919, right-hand column, paragraph 3	6,7,10,17,24
Y	AHARONI A ET AL: "Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 15, no. 12, December 2003 (2003-12), pages 2866-2884, XP002322003 ISSN: 1040-4651 abstract; figures 6,7	10,24
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2006/000188

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BESUMBES OSCAR ET AL: "Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. 20 OCT 2004, vol. 88, no. 2, 20 October 2004 (2004-10-20), pages 168-175, XP002347300 ISSN: 0006-3592 cited in the application abstract; figures 1,2	8,9,24
A	WO 2004/111183 A (EVOGENE LTD; RONEN, GIL; RABINOVICH, LARISA; MEISSNER, RAFAEL; KARCHI,) 23 December 2004 (2004-12-23)	1-24, 28-34
A	IIJIMA YOKO ET AL: "The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 136, no. 3, November 2004 (2004-11), pages 3724-3736, XP002347301 ISSN: 0032-0889 abstract; figures 1-3	1,6,10, 11,16, 17,23,24
A	WO 01/20008 A (UNIVERSITEIT LEIDEN; HOGE-MEPPELINK, ANNEKE HF; SCARPELLA, ENRICO; MEI) 22 March 2001 (2001-03-22) page 22, paragraph 3; claims 1-25; figure 3 page 4, line 23 - line 26	1-34
A	WO 99/19460 A (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION; CROTEAU, RODNEY, B; W) 22 April 1999 (1999-04-22) abstract; examples 1,2	10-12
A	HERMANN S R ET AL: "Promoters derived from Banana bunchy top virus-associated components S1 and S2 drive transgene expression in both tobacco and banana" PLANT CELL REPORTS, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 20, no. 7, October 2001 (2001-10), pages 642-646, XP002309599 ISSN: 0721-7714	1,15, 24-34
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/000188

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LIU A H-C ET AL: "Cloning and promoter analysis of the cotton lipid transfer protein gene Ltp3<1>" BIOCHIMICA AND BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1487, no. 1, 24 August 2000 (2000-08-24), pages 106-111, XP004277398 ISSN: 1388-1981 cited in the application</p>	1,15, 24-34
A	<p>WO 00/17327 A (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH DEPARTMENT; THE SALK INSTITUTE FOR BIO) 30 March 2000 (2000-03-30) claims 138-162</p>	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2006/000188

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9938957	A	05-08-1999	AU 2490399 A	16-08-1999
WO 9307266	A	15-04-1993	AU 2778992 A US 5527674 A	03-05-1993 18-06-1996
WO 2004111183	A	23-12-2004	EP 1636333 A2	22-03-2006
WO 0120008	A	22-03-2001	AU 5824400 A	17-04-2001
WO 9919460	A	22-04-1999	AU 741393 B2 AU 1089099 A CA 2306207 A1 EP 1023436 A1 JP 2001520004 T NZ 503964 A US 6303330 B1 US 5876964 A	29-11-2001 03-05-1999 22-04-1999 02-08-2000 30-10-2001 25-05-2001 16-10-2001 02-03-1999
WO 0017327	A	30-03-2000	AU 776690 B2 AU 6045899 A AU 2004242423 A1 BR 9913878 A CA 2342053 A1 EP 1121422 A2 JP 2002526066 T MX PA01002805 A NO 20011359 A PL 347308 A1	16-09-2004 10-04-2000 20-01-2005 12-06-2001 30-03-2000 08-08-2001 20-08-2002 04-06-2002 15-05-2001 25-03-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°
PCT/FR2006/000188

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N15/82 C12N15/11 C12N9/10												
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB												
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N												
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche												
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data												
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS												
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées										
X Y	WO 99/38957 A (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION; THE REGENTS OF THE UN) 5 août 1999 (1999-08-05) page 5, ligne 28 - ligne 36; revendications 1-12; figures 1,3 page 6, ligne 26 - page 7, ligne 8 page 16, ligne 11 - page 17, ligne 24 page 11, ligne 9 - ligne 14 ----- -/-	1-5, 13-16, 18-23 6-10,17, 24										
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents												
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe												
* Catégories spéciales de documents cités:												
<table border="0"> <tr> <td>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</td> <td>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</td> </tr> <tr> <td>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</td> <td>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</td> </tr> <tr> <td>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</td> <td>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</td> </tr> <tr> <td>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</td> <td>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</td> </tr> <tr> <td>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets	*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention											
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément											
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier											
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets											
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée												
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale											
12 mai 2006	19/05/2006											
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé											
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Gurdjian, D											

3

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 demande internationale n°
 PCT/FR2006/000188

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WANG E ET AL: "Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing" PLANTA, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 216, no. 4, février 2003 (2003-02), pages 686-691, XP002318258 ISSN: 0032-0935 cité dans la demande</p>	34
Y	<p>abrégé; figure 1</p>	6,7,17, 24
X	<p>WO 93/07266 A (IDAHO RESEARCH FOUNDATION, INC) 15 avril 1993 (1993-04-15) page 19, ligne 33 - page 20, ligne 22; revendications 1-39; figures 1-3</p>	25-27, 31-33
X	<p>MAHMOUD S S ET AL: "Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 98, no. 15, 17 juillet 2001 (2001-07-17), pages 8915-8920, XP002965001 ISSN: 0027-8424</p>	24
Y	<p>abrégé; figures 1,2</p> <p>page 8918, colonne de droite, alinéa 2 - page 8919, colonne de droite, alinéa 3</p>	6,7,10, 17,24
Y	<p>AHARONI A ET AL: "Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 15, no. 12, décembre 2003 (2003-12), pages 2866-2884, XP002322003 ISSN: 1040-4651 abrégé; figures 6,7</p>	10,24
	----- -/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2006/000188

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	BESUMBES OSCAR ET AL: "Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. 20 OCT 2004, vol. 88, no. 2, 20 octobre 2004 (2004-10-20), pages 168-175, XP002347300 ISSN: 0006-3592 cité dans la demande abrégé; figures 1,2	8,9,24
A	WO 2004/111183 A (EVOGENE LTD; RONEN, GIL; RABINOVICH, LARISA; MEISSNER, RAFAEL; KARCHI,) 23 décembre 2004 (2004-12-23)	1-24, 28-34
A	IIJIMA YOKO ET AL: "The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 136, no. 3, novembre 2004 (2004-11), pages 3724-3736, XP002347301 ISSN: 0032-0889 abrégé; figures 1-3	1,6,10, 11,16, 17,23,24
A	WO 01/20008 A (UNIVERSITEIT LEIDEN; HOGE-MEPELINK, ANNEKE HF; SCARPELLA, ENRICO; MEI) 22 mars 2001 (2001-03-22) page 22, alinéa 3; revendications 1-25; figure 3 page 4, ligne 23 - ligne 26	1-34
A	WO 99/19460 A (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION; CROTEAU, RODNEY, B; W) 22 avril 1999 (1999-04-22) abrégé; exemples 1,2	10-12
A	HERMANN S R ET AL: "Promoters derived from Banana bunchy top virus-associated components S1 and S2 drive transgene expression in both tobacco and banana" PLANT CELL REPORTS, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 20, no. 7, octobre 2001 (2001-10), pages 642-646, XP002309599 ISSN: 0721-7714	1,15, 24-34
	----- -/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n° PCT/FR2006/000188
--

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LIU A H-C ET AL: "Cloning and promoter analysis of the cotton lipid transfer protein gene Ltp3<1>" BIOCHIMICA AND BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1487, no. 1, 24 août 2000 (2000-08-24), pages 106-111, XP004277398 ISSN: 1388-1981 cité dans la demande	1,15, 24-34
A	WO 00/17327 A (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH DEPARTMENT; THE SALK INSTITUTE FOR BIO) 30 mars 2000 (2000-03-30) revendications 138-162	1-22

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2006/000188

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9938957	A	05-08-1999	AU 2490399 A	16-08-1999
WO 9307266	A	15-04-1993	AU 2778992 A US 5527674 A	03-05-1993 18-06-1996
WO 2004111183	A	23-12-2004	EP 1636333 A2	22-03-2006
WO 0120008	A	22-03-2001	AU 5824400 A	17-04-2001
WO 9919460	A	22-04-1999	AU 741393 B2 AU 1089099 A CA 2306207 A1 EP 1023436 A1 JP 2001520004 T NZ 503964 A US 6303330 B1 US 5876964 A	29-11-2001 03-05-1999 22-04-1999 02-08-2000 30-10-2001 25-05-2001 16-10-2001 02-03-1999
WO 0017327	A	30-03-2000	AU 776690 B2 AU 6045899 A AU 2004242423 A1 BR 9913878 A CA 2342053 A1 EP 1121422 A2 JP 2002526066 T MX PA01002805 A NO 20011359 A PL 347308 A1	16-09-2004 10-04-2000 20-01-2005 12-06-2001 30-03-2000 08-08-2001 20-08-2002 04-06-2002 15-05-2001 25-03-2002

フロントページの続き

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

(72)発明者 アラン・ティシエ

フランス、エフ - 8 4 1 2 0 ペルテュイ、リュ・ラスパイユ 2 4 番

(72)発明者 クリストフ・サロー

フランス、エフ - 3 4 0 7 0 モンペリエ、アヴニュ・デュ・リトラル 2 3 3 番

(72)発明者 デニ・ロンタン

フランス、エフ - 0 4 8 0 0 グルー・レ・バン、バティマン・ベ - アパルトマン 4 9、ル・シガル
ーン・シュマン・ドゥ・サンタネット

Fターム(参考) 2B030 AA02 AD05 AD09 CA17

4B024 AA08 BA07 BA79 CA04 DA01 FA02

4B064 AH01 CA11 CA19 CC24 DA11

4B065 AA88X AA89Y AB01 BA02 CA27 CA53