

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5337800号
(P5337800)

(45) 発行日 平成25年11月6日(2013.11.6)

(24) 登録日 平成25年8月9日(2013.8.9)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
A 01 H 5/00 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00 Z N A A
A 01 H 5/00 A

請求項の数 12 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2010-517191 (P2010-517191)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月18日 (2008.7.18)
 (65) 公表番号 特表2010-533502 (P2010-533502A)
 (43) 公表日 平成22年10月28日 (2010.10.28)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2008/070507
 (87) 國際公開番号 WO2009/012467
 (87) 國際公開日 平成21年1月22日 (2009.1.22)
 審査請求日 平成23年3月10日 (2011.3.10)
 (31) 優先権主張番号 60/950,853
 (32) 優先日 平成19年7月19日 (2007.7.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607 オークランド フランクリン ストリート 1111 トゥエルフス フロア
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的化したエチレンシグナル伝達における低下による穀物収量の増加

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 非エチレン結合性エチレン受容体ポリペプチドが、SEQ ID NO:6と少なくとも95%同一の配列を含み、ここで102位のアミノ酸がシスティンではなく：かつ

(b) 非エチレン結合性エチレン受容体ポリペプチドの発現が、植物における緑色保持(staygreen)表現型をもたらす、

非エチレン結合性エチレン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

ポリペプチド配列がSEQ ID NO:6である、請求項1記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 3】

SEQ ID NO:5の配列を含む、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項1記載のポリヌクレオチドに機能的に連結されたプロモーター配列を含む、組換え発現カセット。

【請求項 5】

緑色保持表現型を有する、請求項4記載の発現カセットを含むトランスジェニック植物。

【請求項 6】

穀類植物である、請求項5記載のトランスジェニック植物。

20

【請求項 7】

トウモロコシである、請求項5記載のトランスジェニック植物。

【請求項 8】

(a) プロモーターに機能的に連結された請求項1記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現カセットを導入する工程；および

(b) 低下したエチレン感受性を有する植物を選択する工程を含む、植物におけるエチレン感受性を低下させる方法。

【請求項 9】

(a) プロモーターに機能的に連結された請求項1記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現カセットを導入する工程；および

(b) 緑色保持特徴を有する植物を選択する工程を含む、植物における緑色保持表現型を生じさせる方法。

【請求項 10】

植物がバイオマーカーの検出に基づき選択される、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

植物が穀類植物である、請求項9記載の方法。

【請求項 12】

植物がトウモロコシである、請求項9記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0001】****発明の背景**

エチレンは、植物発達中のプログラム細胞死 (PCD) の調節因子であることが公知であり (Campbell and Drew, *Planta* 157:350-357(1983) ; Drew et al., *Planta* 147:83-88(1979) ; He et al., *Plant Physiol.* 112:1679-1685(1996))、発達中の穀類内乳におけるPCDの編成において役割を果たしている。外因性エチレンは、発達中の内乳における細胞死プログラムの開始を加速することができ、エチレンの生合成または感知の阻害剤は、プログラムを遅延させる (Young et al., *Plant Physiol.* 119:737-751(1997) ; Young and Gallie, *Plant Mol. Biol.* 39:915-926(1999) ; Young and Gallie, *Plant Mol. Biol.* 42:397-414(2000))。エチレンは、果実の発達、根および葉の成長、ならびに種子発芽のような、植物の成長および発達の多くの局面を制御する。

【0002】

アラビドブシス (*Arabidopsis*) においては、ETR1、ERS1、ETR2、ERS2、およびEIN4を含む膜局在型受容体が、エチレン感知に関与している (Chang et al, *Science* 262:539-544(1993) ; Hua et al, *Science* 269:1712-1714(1995)、Hua et al., *Plant Cell* 10:1321-1332(1998)、Sakai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5812-5817(1998))。ETR1、ETR2、およびEIN4は、3個のドメイン、N末端膜貫通エチレン結合ドメイン (Schaller and Bleeker, *Science* 270:1809-1811(1995))、ヒスチジンプロテインキナーゼドメイン、およびC末端レシーバードメインから構成される。ERS1およびERS2は、レシーバードメインを欠く。これらの遺伝子は、相同性に基づき二つのサブファミリーへ分類され、ETR1およびERS1が一方のサブファミリーを構成し、ETR2、ERS2、およびEIN4が他方を構成する (Hua et al, *Plant Cell* 10:1321-1332(1998))。ETR1およびERS1は、いずれも、機能的なヒスチジンキナーゼドメインを含有しており、ヒスチジン残基を自己リン酸化するが、その他のファミリーメンバーは、ヒスチジンキナーゼ活性に必要とされる特定の残基を欠く。しかしながら、インピトロ研究は、ETR2、ERS2、およびEIN4が、セリン残基およびトレオニン残基において自己リン酸化可能であることを示している (Moussatche and Klee(2004), *J. Biol. Chem.*, 279:48734)。

【0003】

アラビドブシスにおいては5つの型が同定されているのに対し、トウモロコシにおいては、2種のエチレン受容体遺伝子しか同定されていない (即ち、ZmETR2およびZmERS1) (G

10

20

30

40

50

allie and Young(2004) Mol Genet Genomics 271:267-281)。ZmETR2は、ZmETR9およびZmETR40と名付けられた2種のバリアントを有する。いずれのエチレン受容体ファミリーメンバーも、内乳と比べて、発達中の胚において実質的により高いレベルで発現している。内乳および胚が各々エチレンの合成に寄与しているという事実にも関わらず、発達中の内乳はエチレンにより誘導される細胞死への低い閾値を示し、その一方で胚は保護されているのは、このためである。

【0004】

穀類の内乳は、穀物の主要な貯蔵器官として機能するが、種子発達の中期～後期に細胞死を経る。エチレンが、発達中の内乳における細胞死の開始のタイミングを調節する。エチレンは、膜を自由に通過することができる気体であるため、特定の器官から発生し、発生源からの距離によってのみ希釈されるエチレンに、発達中の穀粒の全ての器官が曝されると予想することができる。細胞死を発達中の穀粒内の特定の器官に限定する能力は、エチレンの生合成および感知の機構の発現の厳密な制御を示唆する。

【0005】

光合成におけるエチレンの役割は不明である。光合成は、ストレス、例えば、乾燥、オゾン曝露、または低温の条件においてしばしば阻害される (Flexas and Medrano(2002), Annals Bot. 89:183-189 ; Chaves et al. (2002), Annals Bot. 89:907-916 ; Ramachandra et al. (2004), J Plant Physiol. 161:1189-1202)。光合成能は、葉の拡大の間に増加し、葉齢と共に減衰し、葉老化の開始前に低レベルに達する (Gay and Thomas(1995), New Phytol. 130:159-168)。老化プログラムの開始および実行の速度は、葉が植物に対して行うことができる最終の寄与に有意に影響する。これは、早発の葉老化を誘導する有害な環境条件により収穫高が低下する、穀類のような作物に特に関連がある。

【0006】

光合成に対するエチレンの効果については、効果がないこと、または阻害効果があることを示唆する報告があり、議論の余地がある (Pallaghy and Raschke(1972), Plant Physiol. 49:275-276 ; Kays and Pallas(1980), Nature 285:51-52 ; Pallas and Kays(1982), Plant Physiol. 70:598-601 ; Squier et al. (1985), Environ Sci Technol 19:432-437 ; Taylor and Gunderson(1986), Merr. Plant Physiol. 86:85-92 ; Woodrow et al. (1988), Mill. J Exp Bot. 39:667-684)。種、成長条件、完全な葉対切り取られた葉、および使用された外因性エチレンの濃度の差が、観察された効果の変動に寄与した可能性がある。トウモロコシにおける光合成活性および穀物発達に対するエチレンの効果を調査するため、変異体アプローチが用いられた (Young et al. (2004), Plant J 40:813-825)。この研究の著者らは、欠陥のあるエチレン生成を有するトウモロコシ変異体が、野生型植物に比べて増加したクロロフィルの量およびCO₂同化速度を有することを見出した。

【0007】

エチレンは、植物の成長および発達においてそのような大きい役割を果たすため、エチレン応答経路に関与している遺伝子の同定は、緑色保持 (staygreen) 形質を有する植物のような、改変されたエチレン関連過程に関連した表現型を有する植物を作出するため有用である。従って、穀類エチレンシグナル伝達経路に関与している遺伝子の同定の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、植物におけるエチレンシグナル伝達経路に影響を与える組成物および方法を提供する。

【0009】

本発明は、ドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチド、例えば、(それぞれ、SEQ ID NO:2、4、および6により表される)ドミナントネガティブなZmERS1、ZmETR9、またはZmETR40をコードすることができる単離された核酸を提供する。さらに、本発明は、これらのポリペプチドの各々をコードするポリヌクレオチド配列 (例えば、SEQ ID NO:1、3、および5) を含む。本発明のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1、3、および5との少

10

20

30

40

50

なくとも90%、より典型的には少なくとも95%、99%、または100%の同一性を有する配列を含む。本発明のいくつかの態様において、単離された核酸は、アミノ酸65がシスティンではない、SEQ ID NO:2との少なくとも90%、より典型的には95%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、SEQ ID NO:2のアミノ酸65はチロシンである。いくつかの態様において、単離された核酸は、アミノ酸102がシスティンではない、SEQ ID NO:4との少なくとも90%、より典型的には95%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、SEQ ID NO:4のアミノ酸102はチロシンである。いくつかの態様において、単離された核酸は、アミノ酸102がシスティンではない、SEQ ID NO:6との少なくとも90%、より典型的には95%、99%、または100%の同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、SEQ ID NO:6のアミノ酸102はチロシンである。10

【0010】

いくつかの態様において、核酸は、(例えば、SEQ ID NO:2のアミノ酸1-110またはSEQ ID NO:4および6のアミノ酸1-147を含む)ZmERS1およびZmETR2の短縮変異体をコードする。そのような態様において、短縮変異体は、わずかに長く、例えば、SEQ ID NO:2の1-150、1-200、1-250、1-300、1-325、もしくは1-350、またはSEQ ID NO:4もしくは6のアミノ酸1-200、1-250、1-300、1-350、または1-375であってもよい。

【0011】

いくつかの態様において、本発明は、ドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチド、例えば、(それぞれ、SEQ ID NO:2、4、および6により表される)ドミナントネガティブなZmERS1、ZmETR9、またはZmETR40をコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列を含む組換え発現カセットを提供する。いくつかの態様において、核酸は、(例えば、SEQ ID NO:2のアミノ酸1-110またはSEQ ID NO:4もしくは6のアミノ酸1-147を含む)ZmERS1およびZmETR2の短縮変異体をコードする。さらに、本発明は、SEQ ID NO:1、3、および5のポリヌクレオチド配列、ならびにSEQ ID NO:1、3、および5との少なくとも90%、より典型的には少なくとも95%、99%、または100%の同一性を有する核酸配列を含む。20

【0012】

いくつかの態様において、本発明は、本発明のドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチドをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列を含む組換え発現カセットを含むトランスジェニック植物を提供する。いくつかの態様において、核酸は、(それぞれ、SEQ ID NO:2、4、および6により表される)ZmERS1、ZmETR9、またはZmETR40をコードする。他の態様において、ドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸1-110またはSEQ ID NO:4もしくは6のアミノ酸1-147を含む。いくつかの態様において、核酸配列はSEQ ID NO:1、3、または5、ならびにSEQ ID NO:1、3、および5と少なくとも90%、より典型的には少なくとも95%、99%、または100%同一の核酸配列である。いくつかの態様において、トランスジェニック植物は、コムギ、イネ、オオムギ、ライムギ、キビ、モロコシ、またはオートムギのような穀類植物である。いくつかの態様において、トランスジェニック植物はトウモロコシである。30

【0013】

さらなる態様において、本発明は、(a)ドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む構築物を導入する工程；および(b)低下したエチレン感受性を有する植物を選択する工程を含む、植物におけるエチレン感受性を低下させる方法を提供する。好みのドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチドには、(それぞれ、SEQ ID NO:2、4、および6により表される)ZmERS1、ZmETR9、またはZmETR40が含まれる。他の態様において、ドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸1-110またはSEQ ID NO:4もしくは6のアミノ酸1-147を含む。いくつかの態様において、核酸配列は、SEQ ID NO:1、3、または5、ならびにSEQ ID NO:1、3、および5と少なくとも90%、より典型的には少なくとも95%、99%、または100%同一の核酸配列である。40

【0014】

もう一つの局面において、本発明は、植物における緑色保持表現型を生じさせる方法を提供する。その方法は、(a) ドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む構築物を導入する工程；および(b) 緑色保持特徴を有する植物を選択する工程を含む。いくつかの態様において、エチレン受容体ポリペプチドには、(それぞれ、SEQ ID NO:2、4、および6により表される) ZmERS 1、ZmETR9、またはZmETR40が含まれる。他の態様において、ドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸1-110またはSEQ ID NO:4もしくは6のアミノ酸1-147を含む。いくつかの態様において、核酸配列は、SEQ ID NO:1、3、または5、およびSEQ ID NO:1、3、または5と少なくとも90%、より典型的には少なくとも95%、99%、または100%同一の核酸配列である。いくつかの態様において、植物は、老化遅延、增加した光合成能、または單一種子中の多胚により選択される。

【0015】

本発明のその他の目的、利点、および態様は、以下の詳細な説明を参照することにより明白になると思われる。

[請求項1001]

(a) 非エチレン結合性エチレン受容体ポリペプチドが、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、およびSEQ ID NO:6からなる群より選択される配列と少なくとも95%同一の配列を含み：かつ

(b) 非エチレン結合性エチレン受容体ポリペプチドの発現が、植物における緑色保持(staygreen)表現型をもたらす、
非エチレン結合性エチレン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

10

20

[請求項1002]

ポリペプチド配列がSEQ ID NO:2である、請求項1001記載のポリヌクレオチド。

[請求項1003]

ポリペプチド配列がSEQ ID NO:4である、請求項1001記載のポリヌクレオチド。

[請求項1004]

ポリペプチド配列がSEQ ID NO:6である、請求項1001記載のポリヌクレオチド。

[請求項1005]

SEQ ID NO:1の配列を含む、請求項1001記載のポリヌクレオチド。

30

[請求項1006]

SEQ ID NO:3の配列を含む、請求項1001記載のポリヌクレオチド。

[請求項1007]

SEQ ID NO:5の配列を含む、請求項1001記載のポリヌクレオチド。

[請求項1008]

請求項1001記載のポリヌクレオチドに機能的に連結されたプロモーター配列を含む、組換え発現力セット。

40

[請求項1009]

緑色保持表現型を有する、請求項1008記載の発現力セットを含むトランスジェニック植物。

[請求項1010]

穀類植物である、請求項1009記載のトランスジェニック植物。

[請求項1011]

トウモロコシである、請求項1009記載のトランスジェニック植物。

[請求項1012]

(a) プロモーターに機能的に連結された請求項1001記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現力セットを導入する工程；および

(b) 低下したエチレン感受性を有する植物を選択する工程
を含む、植物におけるエチレン感受性を低下させる方法。

50

[請求項1013]

(a) プロモーターに機能的に連結された請求項1001記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現カセットを導入する工程；および

(b) 緑色保持特徴を有する植物を選択する工程

を含む、植物における緑色保持表現型を生じさせる方法。

[請求項1014]

植物が、増加した光合成能に基づき選択される、請求項1013記載の方法。

[請求項1015]

植物が單一種子中の多胚表現型に基づき選択される、請求項1013記載の方法。

[請求項1016]

植物が老化遅延に基づき選択される、請求項1013記載の方法。

[請求項1017]

植物がバイオマーカーの検出に基づき選択される、請求項1013記載の方法。

[請求項1018]

植物が穀類植物である、請求項1013記載の方法。

[請求項1019]

植物がトウモロコシである、請求項1013記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】ある範囲のACC濃度におけるアラビドプシスにおける変異体ZmERS1またはZmETR2の発現により付与されたエチレン非感受性の定量。変異体ZmERS1 (MS1-11) またはZmETR2 (MT2-9) を発現する種子を、示された濃度のACC上で発芽させ、5日間、暗所で成長させた。野生型種子 (WT) が対照として含まれた。

20

【発明を実施するための形態】

【0017】

発明の詳細な記載

A. 序論

本発明は、植物におけるエチレン応答を阻害することにより、トウモロコシ植物における老化を遅延させる新たな方法を提供する。老化の遅延は、エチレン受容体タンパク質の変異によっても、野生型または変異型のエチレン受容体タンパク質の過剰発現によっても、達成され得る。本発明は、老化遅延のパターンまたは特徴を有する穀類植物を選択する方法も提供する。老化遅延パターンは、野生型植物と比較して改変された表現型を有する穀類植物をもたらすと考えられる。改変された表現型には、緑色保持形質、例えば、成長期の後期に緑色を維持している葉、増加した光合成能、改善された乾燥耐性、改善されたサイレージ、増加した穀物収量、および比較的高密度での植え付けに対する増加した耐性、および複数の胚を有する穀粒が含まれるが、これらに限定はされない。従って、単独の、または他の方法と組み合わせられた、変異型エチレン受容体タンパク質の產生を通して、エチレン応答を阻害することにより、増加したバイオマスおよび／または収量を有する植物が同定され得る。

30

【0018】

B. 定義

「核酸」または「ポリヌクレオチド配列」という語句は、5'末端から3'末端へと読まれたデオキシリボヌクレオチド塩基またはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖の重合体をさす。核酸には、ポリメラーゼによる正確な通読を可能にし、その核酸によりコードされたポリペプチドの発現を改変しない、修飾されたヌクレオチドが含まれていてもよい。

40

【0019】

「～をコードする核酸配列」という語句は、特定のタンパク質またはペプチドの発現を指図する核酸をさす。核酸配列には、RNAへ転写されるDNA鎖配列、およびタンパク質へ翻訳されるRNA配列の両方が含まれる。核酸配列には、全長核酸配列、および全長配列に由

50

来する非全長配列の両方が含まれる。さらに、配列には、特定の宿主細胞におけるコドン優先を提供するために導入され得るネイティブ配列の縮重コドンが含まれることが理解されるべきである。

【0020】

「プロモーター」という用語は、転写の開始点から上流または下流に位置し、転写を開始させるためのRNAポリメラーゼおよびその他のタンパク質の認識および結合に関する領域または配列決定要素をさす。「植物プロモーター」とは、植物細胞における転写を開始させることができるプロモーターである。そのようなプロモーターは、植物起源のものある必要はなく、例えば、CaMV35Sプロモーターのような植物ウイルスに由来するプロモーターが、本発明において使用され得る。

10

【0021】

「植物」という用語には、完全な植物体、苗条栄養器官 / 構造（例えば、葉、幹、および塊茎）、根、花および花の器官 / 構造（例えば、苞葉、萼片、花弁、雄蕊、心皮、薬、および胚珠）、種子（胚、内乳、および種皮を含む）および果実（成熟した子房）、植物組織（例えば、維管束組織、基本組織等）および細胞（例えば、孔辺細胞、卵細胞、トリコーム等）、ならびにそれらの子孫が含まれる。本発明の方法において使用され得る植物のクラスは、一般に、被子植物（単子葉植物および双子葉植物）、裸子植物、シダ、蘚苔類、および多細胞藻類を含む、形質転換技術が可能な高等植物および下等植物のクラスのように広範囲である。それは、異数体、倍数体、二倍体、半数性、およびヘミ接合性を含む、多様な倍数性レベルの植物を含む。

20

【0022】

「宿主細胞」という語句は、任意の生物に由来する細胞をさす。好ましい宿主細胞は、植物、細菌、酵母、真菌、昆虫、またはその他の動物に由来する。様々な型の宿主細胞へポリヌクレオチド配列を導入する方法は、当技術分野において周知である。

【0023】

ポリヌクレオチド配列は、外来種に起因する場合、または同一種に起因するが、元の型から人為的に修飾されている場合、第2のポリヌクレオチド配列に対して「異種」である。例えば、異種コーディング配列に機能的に連結されたプロモーターとは、プロモーターが由来する種とは異なる種に由来するコーディング配列、または同一種に由来するが、天然に存在する対立遺伝子バリエントとは異なるコーディング配列をさす。

30

【0024】

個々の植物に対して「外因性の」ポリヌクレオチドとは、有性交雑以外の手段によって植物または植物の前世代へ導入されたポリヌクレオチドである。これが達成され得る手段の例は、以下に記載され、アグロバクテリウム (Agrobacterium) により媒介される形質転換、微粒子銃法、電気穿孔、インプランタ技術等を含む。

【0025】

本発明の特定のポリペプチドまたは核酸の「増加したまたは増強された発現または活性」とは、強化されたポリペプチドの活性の変化をさす。そのような増加した活性または発現の例には、以下のものが含まれる。ポリペプチドの活性またはポリペプチドをコードする遺伝子の発現が、野生型非トランスジェニック対照植物におけるそれらのレベルより増加している（またはより長い期間存在する）。ポリペプチドの活性または遺伝子の発現が、野生型非トランスジェニック対照植物において通常は検出されない器官、組織、または細胞に存在する（即ち、ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする遺伝子の発現の空間的分布が改変されている）。

40

【0026】

本発明のポリペプチドまたは核酸の「減少した発現または活性」とは、ポリペプチドの活性の減少をさす。そのような減少した活性または発現の例には、以下のものが含まれる。ポリペプチドの活性または遺伝子の発現が、野生型非トランスジェニック対照植物におけるそれらのレベルより減少している。

【0027】

50

「生殖構造」または「生殖組織」という用語には、本明細書において使用されるように、果実、胚珠、種子、花粉、花、または雌ずい、雄ずい、薬、萼片、花弁、心皮、もしくは任意の胚性組織のような花部分が含まれる。

【0028】

本明細書において使用されるような「栄養構造」または「栄養組織」という用語には、葉、幹、塊茎、根、維管束組織、または根および苗条の分裂組織が含まれる。

【0029】

「発現力セット」とは、宿主細胞へ導入された場合に、それぞれRNAまたはポリペプチドの転写および/または翻訳をもたらす核酸構築物をさす。翻訳されない、または翻訳され得ないアンチセンス構築物またはセンス構築物が、この定義に明らかに含まれる。

10

【0030】

トランスジーンの発現の場合にも、（例えば、アンチセンス抑制またはセンス抑制による）内因性遺伝子の阻害の場合にも、当業者は、挿入されるポリヌクレオチド配列が、それが由來した遺伝子の配列と同一である必要はなく、「実質的に同一」であってもよいことを認識すると考えられる。以下に説明されるように、これらのバリエントは、この用語に特に内含される。

【0031】

挿入されたポリヌクレオチド配列が、機能的なポリペプチドを産生するよう転写され翻訳される場合、当業者は、コドン縮重のため、多数のポリヌクレオチド配列が同一のポリペプチドをコードするであろうということを認識すると考えられる。これらのバリエントは、「本発明の遺伝子に由来するポリヌクレオチド配列」という用語に特別に内含される。さらに、この用語には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子配列と実質的に同一であり（以下に記載されるように決定される）、本発明のポリペプチドの機能を保持しているタンパク質をコードする配列（例えば、全長配列）が特に含まれる。

20

【0032】

内因性遺伝子の発現を阻害するために使用されるポリヌクレオチドの場合、導入される配列は、標的内因性遺伝子の配列と完全に同一である必要はない。導入されるポリヌクレオチド配列は、典型的には、（以下に決定されるように）標的内因性配列と少なくとも実質的に同一であると考えられる。

【0033】

30

二つの核酸配列またはポリペプチドは、以下に記載されるように、一致が最大となるよう整列化された場合に、二つの配列のそれぞれヌクレオチドまたはアミノ酸残基の配列が同一であるならば、「同一である」と言われる。「～に相補的」という用語は、配列が参照ポリヌクレオチド配列の全部または一部に相補的であることを意味するために本明細書において使用される。

【0034】

比較のための配列の最適の整列化は、Smith and Waterman, Add. APL. Math. 2:482(1981)のローカルホモロジーアルゴリズムにより、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970)のホモロジーアラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444(1988)の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実行 (Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA) により、または視察により実施され得る。

40

【0035】

「配列同一の割合」は、比較ウィンドウにおいて二つの最適に整列化された配列を比較することにより決定される。比較ウィンドウにおいてポリヌクレオチド配列の一部は、二つの配列の最適の整列化のための（付加または欠失を含まない）参照配列と比較して、付加または欠失（即ち、ギャップ）を含む場合がある。該割合は、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数を決定して、一致する位置の数を与え、一致する位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数により割り、その結果に100を乗じて配列

50

同一の割合を与えることにより計算される。

【0036】

ポリヌクレオチド配列の「実質的同一性」という用語は、ポリヌクレオチドが、ドミナントネガティブエチレン受容体ポリヌクレオチド（例えば、SEQ ID NO:1、3、または5）との少なくとも85%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。または、同一割合は85%～100%の任意の整数であり得る。大部分の態様は、本明細書において記載されたプログラム、好ましくは以下に記載されるような標準的なパラメーターを使用したBLASTを使用して、参照配列と比較された85%、90%、95%、または99%を少なくとも含む。従って、本発明の方法において使用されるポリペプチドをコードする配列は、ここに開示された配列との実質的な同一性を有する核酸配列を含む。当業者は、コドン縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレームの位置付け等を考慮することにより、二つのヌクレオチド配列によりコードされたタンパク質の対応する同一性を決定するために適切にこれらの値が調整され得ることを認識すると考えられる。10

【0037】

これらの目的のため、アミノ酸配列の実質的同一性とは、通常、ドミナントネガティブエチレン受容体ポリペプチド（例えば、SEQ ID NO:2、4、または6）との少なくとも90%の配列同一性を意味する。ポリペプチドの同一割合は、90%～100%の任意の整数、例えば、90%、95%、または99%であり得る。「実質的に類似」しているポリペプチドは、同一でない残基位置が保存的なアミノ酸変化によって異なっていてもよいことを除き、上述のように配列を共有している。保存的なアミノ酸置換とは、類似した側鎖を有する残基の交換可能性をさす。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリンおよびトレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニン、およびヒスチジンであり；硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システインおよびメチオニンである。保存的なアミノ酸置換の群には：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、アスパラギン酸-グルタミン酸、およびアスパラギン-グルタミンが含まれる。20

【0038】

ヌクレオチド配列が実質的に同一であることのもう一つの指標は、二つの分子が、ストリンジエントな条件の下で、相互に、または第三の核酸にハイブリダイズするか否かである。ストリンジエントな条件は、配列依存性であり、異なる状況において異なると考えられる。一般に、ストリンジエントな条件は、明確なイオン強度およびpHにおける特定の配列の熱融点（T_m）より約5 低くなるよう選択される。T_mとは、標的配列の50%が完全に一致するプローブにハイブリダイズする（明確なイオン強度およびpHの下での）温度である。典型的には、ストリンジエントな条件は、塩濃度がpH7において約0.02Mであり、温度が少なくとも約60 または65 であるようなものと考えられる。30

【0039】

この開示の目的のため、ハイブリダイゼーションのためのストリンジエントな条件は、20分間の63 における0.2×SSCによる少なくとも1回の洗浄を含むもの、または等価な条件である。中程度にストリンジエントな条件は、20分間の、少なくとも約50 、通常約55 の温度における0.2×SSCによる少なくとも1回の洗浄（通常2回）、または等価な条件を含む。40

【0040】

「エチレン関連過程に関連した表現型」という語句は、エチレンによりモジュレートされる表現型をさす。例示的な表現型には、改善された乾燥耐性、改善されたサイレージ、季節の後期に緑色を維持している葉、および比較的高密度での植え付けに対する増加した耐性のような緑色保持形質が含まれるが、これらに限定はされない。エチレン関連過程のモジュレーションは、例えば、エチレンの過剰産生、エチレンの過少産生、細胞における50

エチレンに対する増加した感受性、または細胞におけるエチレンに対する減少した感受性に起因し得る。

【0041】

「エチレン受容体」または「エチレン受容体タンパク質」という用語は、植物に存在するエチレン受容体ファミリーのうちのいずれかに由来するエチレン受容体をさす。例として、アラビドプシスにおいて、エチレン受容体タンパク質には、ETR1、ERS1、ETR2、ERS2、およびEIN4が含まれる。ジー・メイズ (Zea mays) エチレン受容体タンパク質には、ZmERS1およびZmETR2が含まれる (ZmETR2バリアントZmETR9およびZmETR40を含む)。本明細書において使用されるように、「ETR2」、「ZmETR2」、「ZmETR9」、および「ZmETR40」は、同義的に使用され得る。同様に、「ERS1」および「ZmERS1」は同義的に使用され得る

10

。

【0042】

本発明のエチレン受容体は、植物の任意の種から単離され得、例示的なエチレン受容体の種ホモログを含む。エチレン受容体には、挿入変異、欠失変異、および点変異を含む、天然に存在する変異および誘発された変異を有するタンパク質も含まれる。

【0043】

「ドミナントネガティブ」とは、細胞がヘテロ接合性 (野生型およびドミナントネガティブ) の場合ですら、同一細胞内の正常な野生型遺伝子産物の機能に有害な影響を及ぼす遺伝子産物をさす。ドミナントネガティブ変異体の発現は、一般に、正常な機能の減少をもたらす。「ドミナントネガティブエチレン受容体」は、二量化ドメインを保存し、タンパク質のその他の機能ドメインを破壊または短縮することにより形成され得る。例えば、(「非エチレン結合性エチレン受容体」と本明細書において呼ばれる) エチレンと結合しないエチレン受容体変異体は、ドミナントネガティブな様式で作用する。本発明の非エチレン結合性エチレン受容体には、SEQ ID NO:2、4、および6のポリペプチドが含まれ、SEQ ID NO:2の残基65またはSEQ ID NO:4もしくは6の残基102がシステインでない限り、それらの実質的に同一のバリアントが含まれる。

20

【0044】

エチレン受容体ポリペプチドは、ポリペプチドのN末端でジスルフィド結合を介して二量化する (例えば、Schaller et al. (1995) J.Biol.Chem.270:12526-30を参照のこと)。エチレン受容体の目的のため、「二量化ドメイン」とは、この二量化を媒介するN末端システイン残基のうちの少なくとも1個をさす。二量化に関与するシステインは、エチレン結合を媒介するシステイン残基とは異なる。ZmERS1における二量化ドメインは、SEQ ID N 0:2のアミノ酸4および6に見出される。ZmETR9およびZmETR40の二量化ドメインは、それぞれSEQ ID NO:4の残基37および40、SEQ ID NO:6のアミノ酸38および40に位置している。

30

【0045】

「エチレン結合ドメイン」という用語は、エチレン受容体ポリペプチドのN末端に見出される膜貫通ドメインにおよそ相当する。ZmERS1におけるエチレン結合に関与する残基は、SEQ ID NO:2のアミノ酸20-119にかかる。ZmETR2におけるエチレン結合に関与する残基は、SEQ ID NO:4および6のアミノ酸53-156にかかる。受容体のエチレン結合能は本明細書に記載された方法を使用して試験され得る。

40

【0046】

エチレン受容体の「膜貫通ドメイン」または「膜間領域」という用語は、エチレン受容体ポリペプチドの3個または4個の膜貫通ヘリックスにかかる領域をさす。大部分の膜貫通ドメインと同様に、エチレン受容体膜貫通ドメインは概して疎水性である。大部分のエチレン受容体ポリペプチドにおいて、膜貫通ドメインは、およそ「エチレン結合ドメイン」に相当する。例として、ZmERS1膜貫通ドメインは、およそSEQ ID NO:2のアミノ酸20-107にかかる。ZmETR2の膜貫通ドメインは、およそSEQ ID NO:4および6の5-144にかかる。

【0047】

エチレン受容体の「ヒスチジンキナーゼドメイン」または「キナーゼドメイン」とは、シグナル伝達経路に関与する領域をさす。ETR1受容体およびERS1受容体は、エチレンに応

50

答して領域内の保存されたヒスチジン残基において自己リン酸化する。その他のエチレン受容体ファミリータンパク質(ETR2、ERS2、およびEIN4)は、ヒスチジンキナーゼ活性に必要とされる残基を欠く。しかしながら、これらのタンパク質は、やはり植物細胞にエチレン応答性を付与することができる。

【0048】

「C末端レシーバードメイン」は、ETR1、ETR2、およびEIN4エチレン受容体にのみ見出される。レシーバードメインは、キナーゼドメインとの組み合わせで、応答の調節において役割を果たす。キナーゼドメインおよびレシーバードメインは、エチレン応答性をモジュレートするためにCTR1と相互作用する。例として、ETR2におけるC末端レシーバードメインは、およそSEQ ID NO:4および6のアミノ酸612-767にかかる。

10

【0049】

「緑色保持」という用語は、野生型植物と比較して、成長期の後期に植物の健康を維持するハイブリッド植物の能力をさす。緑色保持形質は、増加した穀物収量、増加した光合成能、改善された乾燥耐性、改善されたサイレージ、および比較的高密度での植え付けに対する耐性の増加に関連付けられている。緑色保持表現型は、標準的なアッセイを使用して便利にアッセイされ得る。例えば、暗所誘導老化アッセイが使用され得る。そのようなアッセイは、典型的には、1週間、植物に付着させたまま葉を覆うことを含む。光の欠如は葉の老化を誘導するが、それが、本発明の植物においては、対照と比較して遅延し得る。

【0050】

20

「光合成能」という用語は、光エネルギーを化学エネルギーに変換する植物の能力をさす。光合成能は、例えば、植物構造中のクロロフィルの量またはCO₂同化の量を測定することにより決定され得る。そのような技術は当技術分野において公知である。

【0051】

「バイオマーカー」とは、関心対照の形質または遺伝子の存在を示す検出可能なマークターである。いくつかの場合において、バイオマーカーは、関心対照の形質または遺伝子と連鎖しているか、または同時に分離する、容易に検出可能な表現型である。例えば、いくつかのバイオマーカーは、化学的または栄養的なストレスに対する耐性を付与する。いくつかの態様において、バイオマーカーは、容易に検出可能なタンパク質、例えば、フルオロフォアまたは類似のレポーター構築物である。いくつかの態様において、バイオマーカーは、特有の制限部位または容易に増幅される配列のようなヌクレオチド配列である。バイオマーカーは、トランスジーンまたは内因性遺伝子、例えば、特定の対立遺伝子の存在を示すために使用され得る。バイオマーカーの使用は、当技術分野において公知であり、技術は特定の状況に適合するよう修飾され得る。

30

【0052】

C. 本発明のポリペプチドの阻害活性

本発明は、植物におけるエチレン受容体タンパク質の活性を阻害することにより、エチレン関連過程をモジュレートする方法を提供する。いくつかの態様において、本発明は、エチレン受容体をコードする核酸配列、例えば、SEQ ID NO:1、3、もしくは5の配列、またはそれらのバリエントもしくは短縮変異体に機能的に連結されたプロモーターを含む構築物を導入することを含む、植物におけるエチレン受容体活性を阻害する方法を提供する。

40

【0053】

いくつかの態様において、本発明のポリペプチドの非機能性のまたはドミナントネガティブな変異は、変異型ドミナントネガティブポリペプチドをコードするトランスジーンの発現により調製され得る。上で説明されたように、ドミナントネガティブ変異体ポリペプチドは、細胞がヘテロ接合性(野生型およびドミナントネガティブ)の場合ですら、同一細胞内の正常な野生型遺伝子産物の機能に有害な影響を及ぼす。理論によって拘束されることは望まないが、ドミナントネガティブ遺伝子産物は、野生型遺伝子産物と同一の要素のうちの少なくともいくつかと共に機能し、それらと相互作用すると考えられるが、野生

50

型機能の何らかの局面を阻止する。

【0054】

ドミナントネガティブ変異の一例は、二量体として機能性のタンパク質である。機能ドメインを除去し、二量化ドメインを保持する変異は、野生型タンパク質のある画分に非機能性タンパク質が結合し、非機能性の二量体をもたらすため、ドミナントネガティブ表現型を引き起こす。エチレン受容体タンパク質は、細胞膜においてホモ二量体として機能するため、このモデルを受け入れられる。従って、一例として、ドミナントネガティブエチレン受容体は、二量化ドメインを保存し、タンパク質のその他の機能ドメインを破壊または短縮することにより形成され得る。

【0055】

非エチレン結合性エチレン受容体は、ドミナントネガティブな様式で作用する。従って、ZmERS1またはZmETR2のエチレン結合ドメインにおける少なくとも1個の残基の破壊が、エチレン非感受性をもたらし得る。例えば、本発明者らは、ZmERS1のCys65およびZmETR2のCys102の破壊が、植物におけるエチレン非感受性をもたらすことを見出した。エチレン結合ドメインのその他の残基、例えば、ZmERS1の残基20-119、25-36、もしくは61-91、またはZmETR2の残基53-156、58-67、もしくは90-120のうちのいずれかの破壊も、エチレン結合に干渉することができる。

10

【0056】

トランスジェニック植物における不活性標的遺伝子を産生するドミナントネガティブ変異体の使用は、Mizukami et al, Plant Cell 8:831-845(1996)に記載されている。上述のように、このアプローチは、エチレン受容体のドミナントネガティブ変異体を植物へ導入することにより、植物におけるエチレン感受性を減少させるために使用され得る。例えば、改変されたアラビドプシスERS遺伝子は、優性のエチレン非感受性を付与するために使用され得る (Hua et al, Science 269:1712-4(1995))。アラビドプシスETR1変異体も使用されている (Wilkinson et al., Nat Biotechnol., 15:444-7(1997) およびChang et al, Science, 262:539-44(1993))。

20

【0057】

もう一つの戦略は、それ自体または他の分子と相互作用する本発明のポリペプチドの能力を阻害することである。これは、例えば、特異的な抗体を使用して達成され得る。例えば、抗体の細胞特異的な発現が、抗体：抗原認識を通して機能ドメインを不活性化するために使用され得る (Hupp et al, Cell 83:237-245(1995) 参照)。

30

【0058】

いくつかの態様において、本発明は、低下したエチレン応答性を有するエチレン受容体を含む。エチレンの非存在下で、エチレン受容体はエチレン応答経路を負に調節する。エチレン受容体タンパク質の下流のシグナル伝達は、哺乳動物RAF型セリン/トレオニンキナーゼに関連したエチレン応答の負の調節因子CTR1によって媒介される (Kieber et al, Cell, 72:427-441(1993))。エチレン結合は、CTR-1の減少した活性をもたらし、その結果として、エチレン応答性の増加に最終的に通じる (CTR-1の下流で作用する) EIN2活性の増加をもたらす (Bleeker and Schaller, Plant Physiol., 111:653-660(1996) ; Hua and Meyerowitz, Cell, 72:427-441(1998))。従って、エチレン結合は、負の受容体シグナル伝達を阻害する。

40

【0059】

従って、ドミナントネガティブエチレン非感受性は、エチレンの受容体との結合を防止する変異、またはCTR-1を介した構成的シグナル伝達を引き起こす変異によって付与され得る。ドミナントネガティブエチレン非感受性変異体の具体例は、アラビドプシスETR1遺伝子のetr1-1変異体である。それは、エチレンが受容体に結合するのを防止する第2膜貫通領域におけるCysからTyrへの変異を有する。エチレン結合に干渉するか、またはエチレンの存在下ですらCTR-1シグナル伝達を可能にする付加的なエチレン受容体変異体は、当技術分野において公知である (例えば、Wang et al. (2006), Plant Cell, 18:3429-3442 参照)。

50

【0060】

いくつかの態様において、エチレン受容体タンパク質の短縮変異体は、エチレン非感受性を付与するために使用される。短縮は、エチレン受容体のN末端もしくはC末端、またはその両方でなされ得る。一例は、ヒスチジンプロテインキナーゼドメインおよびC末端レスリバードメインを欠くエチレン受容体である。もう一つの例は、膜貫通領域の後、例えば、およそSEQ ID NO:2の残基110またはSEQ ID NO:4もしくは6の残基147の後、細胞内ドメインを欠く短縮変異体である。これらの短縮変異体は、単独で、またはエチレン応答性を低下させるその他の変異と組み合わせて使用され得る。いくつかの態様において、短縮変異体は、わずかに長く、例えば、SEQ ID NO:2の1-150、1-200、1-250、1-300、1-325、もしくは1-350、またはSEQ ID NO:4もしくは6のアミノ酸1-200、1-250、1-300、1-350、もしくは1-375であってもよい。

10

【0061】

部位特異的変異誘発技術を、本発明のヌクレオチド配列に関して利用することができる。例えば、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.) のセクション15.3に記載されるように、DNA制限エンドヌクレアーゼ消化に続くライゲーションを、エチレン受容体の欠失バリアントを作成するために使用することができる。Sambrookら (前記) のセクション15.3に記載されるように、類似した戦略を、挿入バリアントを構築するために使用することができる。さらに最近、Zhu et al. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8768-73は、キメラRNA/DNAオリゴヌクレオチドを使用して、インビボで植物遺伝子に変異をターゲティングする方法を考案した。

20

【0062】

オリゴヌクレオチド特異的変異誘発を、本発明の置換バリアントを調製するために利用することができる。それは、本発明の欠失バリアントおよび挿入バリアントを調製するためにも便利に使用され得る。この技術は、Adelman et al. (1983) DNA 2:183; Sambrook et al. (前記); "Current Protocols in Molecular Biology", 1991, Wiley(NY), F.T. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D. D. Moore, J. D. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl, edsによって記載されているように、当技術分野において周知である。

【0063】

PCR技術も、標的ヌクレオチド配列へ変異を導入するために使用することができる。例えば、PCRプライマーは、標的とされた配列へ挿入変異、欠失変異、または点変異を導入するために設計され得る。そのような方法は、当技術分野において十分に理解されている。

30

【0064】

上記の技術は、植物におけるエチレン応答性を低下させるその他の方法と組み合わせられてもよい。例えば、明記されたプロモーターを使用して、熟練した実務者は、外因性エチレン受容体 (例えば、ERS1、ERS2、ETR1、ETR2、またはEIN4) の発現を指図し、望ましい表現型特徴、例えば、緑色保持形質を有する植物を作出することができる。構成的であるか、誘導性であるか、組織特異的であるかに関わらず、熟練した実務者は、多様な公知のプロモーターから選ぶことができる。好みの態様において、エチレン感受性は、機能性のエチレン受容体の発現を増加させる方法を使用して低下させられる。さらに好みの態様において、エチレン感受性は、内因性エチレン受容体の発現を減少させる方法を使用して低下させられる。これらの方法は、参照により完全に組み入れられる米国特許出願第10/876,086号に詳細に記載されている。

40

【0065】

D. 本発明において使用される核酸の単離

いくつかの態様において、本発明は、エチレン受容体タンパク質またはそれらの変異バージョンをコードする単離された核酸を提供する。単離された核酸は、エチレン受容体遺伝子の野生型ポリヌクレオチド配列と少なくとも90%同一である。一つの態様において、単離された核酸は、ジー・メイズエチレン受容体に由来する配列を含む。例示的な態様に

50

おいて、ポリヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:1、3、または5と少なくとも90%、より典型的には95%、99%、または100%同一である。他の態様において、全長未満のエチレン受容体タンパク質を含む短縮変異体が使用され得る。いくつかの態様において、短縮変異体は、N末端膜貫通ドメインを含む。好ましい態様において、短縮変異体は、およそ(SEQ ID NO:2のアミノ酸1-110をコードする)SEQ ID NO:1のヌクレオチド1-330を含む。もう一つの好ましい態様において、短縮変異体は、(それぞれ、SEQ ID NO:4および6のアミノ酸1-147をコードする)SEQ ID NO:3または5の1-441を含む。

【 0 0 6 6 】

本発明において使用される核酸の単離は、多数の技術によって達成され得る。例えば、もう一つの植物種におけるエチレン受容体遺伝子の公知の配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブが、所望の植物種に由来するcDNAライブラリーまたはゲノムDNAライブラリーにおいて所望の遺伝子を同定するために使用され得る。ゲノムライブラリーを構築するためには、ゲノムDNAの大きなセグメントを、例えば、制限エンドヌクレアーゼを使用したランダムな断片化によって作成し、適切なベクターへパッケージングされ得るコンカテマーが形成されるよう、ベクターDNAとライゲートさせる。胚特異的cDNAのライブラリーを調製するためには、mRNAを胚から単離し、遺伝子転写物を含有しているcDNAライブラリーをmRNAから調製する。

【 0 0 6 7 】

次いで、cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーを、クローニングされたエチレン受容体遺伝子の配列に基づくプローブを使用してスクリーニングすることができる。プローブは、同一のまたは異なる植物種における相同遺伝子を単離するため、ゲノムDNA配列またはcDNA配列とハイブリダイズさせるために使用され得る。

【 0 0 6 8 】

または、関心対照の核酸は、増幅技術を使用して核酸試料から増幅され得る。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術が、mRNAから、cDNAから、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから直接、遺伝子の配列を増幅するために使用され得る。PCRおよびその他のインビトロ増幅法は、例えば、発現されるタンパク質をコードする核酸配列をクローニングするため、試料中の所望のmRNAの存在を検出するためのプローブとして使用する核酸を作成するため、核酸配列決定のため、またはその他の目的のためにも、有用である可能性がある。

【 0 0 6 9 】

植物組織から本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を同定するための適切なプライマーおよびプローブは、公知のエチレン受容体タンパク質の配列の比較から作成される。PCRの一般的な概説に関しては、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T., eds.), Academic Press, San Diego(1990)を参照のこと。増幅条件は、プライマーの長さ、プライマーと標的配列との間の同一度、および増幅される標的配列の長さを含む多くの因子に依る。典型的な反応条件は以下の通りである。反応成分: 10mM トリスHCl、pH8.3、50mM 塩化カリウム、1.5mM 塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、200 μM dATP、200 μM dCTP、200 μM dGTP、200 μM dTTP、0.4 μM プライマー、および100単位/mL Taqポリメラーゼ。プログラム: 96 3分、30サイクルの96 45秒、50 60秒、72 60秒、続いて72 5分。

【 0 0 7 0 】

ポリヌクレオチドは、技術文献に記載されるような周知の技術によって合成されてもよい。例えば、Carruthers et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418(1982)およびAdams et al, J. Am. Chem. Soc. 105:661(1983)を参照のこと。次いで、相補鎖を合成し、適切な条件の下で鎖をアニールすることにより、または適切なプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を付加することにより、二本鎖DNA断片が入手され得る。

【 0 0 7 1 】

本発明の配列の属には、SEQ ID NO:1、3、および5を含む核酸配列、ならびにSEQ ID NO

10

20

30

40

50

:2、4、および6を含むタンパク質配列を使用した分析によって同定され特徴決定された遺伝子および遺伝子産物が含まれる。本発明において使用されるポリペプチドをコードする配列には、SEQ ID NO:1、3、および5との実質的同一性を有する核酸配列が含まれる。本発明において使用されるポリペプチドをコードする配列には、SEQ ID NO:2、4、および6との実質的同一性を有するポリペプチド配列をコードするものが含まれる。

【0072】

上記の方法を使用して、核酸が単離された後は、核酸がエチレン受容体タンパク質をコードするか否かを決定するため、標準的な方法が使用され得る。本発明のポリペプチドをコードする核酸は、緑色保持形質を有するトランスジェニック植物を作出するために使用され得る。例えば、SEQ ID NO:2、4、もしくは6と同一もしくは実質的に同一であるエチレン受容体ポリペプチド、またはそれらの短縮変異体の、増強されたまたは増加した発現を有するトランスジェニック植物は、植物内の改変されたエチレン過程に関連した表現型、例えば、老化遅延を示すと考えられる。

【0073】

標準的な方法を使用して、熟練した実務者は、例えば、推定核酸が実際のエチレン受容体ポリペプチドをコードするか否かを決定するため、エチレン受容体ポリペプチドをコードすると考えられる推定核酸配列の配列を、エチレン受容体ポリペプチドをコードする核酸配列と比較することができる。エチレン受容体ポリペプチドをコードする核酸、例えば、SEQ ID NO:1、3、もしくは5と同一もしくは実質的に同一である配列、またはそれらの短縮変異体を含む核酸は、本発明の方法において使用され得る。

【0074】

E. 組換えベクターの調製

本発明は、エチレン受容体ポリペプチド配列をコードする核酸配列と機能的に連結されたプロモーター配列を含む組換え発現カセットを提供する。いくつかの態様において、エチレン受容体は、ERS、例えば、SEQ ID NO:1によって表されるERS1ヌクレオチドまたはSEQ ID NO:1の短縮変異体である。いくつかの態様において、エチレン受容体は、ETR、例えば、SEQ ID NO:3もしくは5によって表されるETR2ヌクレオチド、またはSEQ ID NO:3もしくは5の短縮変異体である。

【0075】

上記の技術において単離された配列を使用するため、植物細胞の形質転換に適した組換えDNAベクターが調製される。多様な高等植物種を形質転換するための技術は周知であり、技術的、科学的な文献、例えば、Weising et al., Ann. Rev. Genet. 22:421-477(1988)に記載されている。所望のポリペプチドをコードするDNA配列、例えば、全長タンパク質をコードするcDNA配列は、好ましくは、形質転換植物の意図された組織における遺伝子からの配列の転写を指図するであろう転写および翻訳の開始調節配列と組み合わせられると考えられる。

【0076】

例えば、過剰発現のため、再生した植物の全ての組織における遺伝子の発現を指図すると考えられる植物プロモーター断片が利用され得る。そのようなプロモーターは、本明細書において「構成的」プロモーターと呼ばれ、大部分の環境条件および発達または細胞分化の状態の下で活性である。

【0077】

または、植物プロモーターは、特異的な組織（組織特異的プロモーター、器官特異的プロモーター）または特異的な環境条件（誘導性プロモーター）で、本発明のポリヌクレオチドの発現を指図する場合がある。

【0078】

適切なポリペプチド発現が望まれる場合には、コーディング領域の3'末端にポリアデニル化領域が含まれるべきである。ポリアデニル化領域は、天然の遺伝子、多様なその他の植物遺伝子、またはT-DNAに由来し得る。

【0079】

10

20

30

40

50

本発明の遺伝子に由来する配列（例えば、プロモーターまたはコーディング領域）を含むベクターは、典型的には、植物細胞に選択可能な表現型を付与するマーカー遺伝子を含むと考えられる。例えば、マーカーは、殺生物剤耐性、特に、カナマイシン、G418、ブレオマイシン、ハイグロマイシンに対する耐性のような抗生物質耐性、またはグリホセート、クロロスルフロン、もしくはグルホシネートに対する耐性のような除草剤耐性をコードし得る。

【0080】

本発明の核酸配列、例えば、エチレン受容体タンパク質をコードする核酸配列は、内因性植物転写因子のレベルを増強し、増加させるため、植物細胞において組換え発現される。例えば、本発明のエチレン受容体核酸配列は、内因性エチレン受容体ポリペプチドのレベルを増強し、増加させるため、植物細胞において組換え発現される。植物細胞の形質転換に適した発現力セットおよびベクターのような多様な異なる発現構築物が調製され得る。多様な高等植物種を形質転換するための技術は、周知であり、技術的、科学的な文献、例えば、Weising et al., *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477(1988)に記載されている。本発明において記載されたポリペプチドをコードするDNA配列、例えば、全長エチレン受容体タンパク質をコードするcDNA配列は、形質転換植物の意図された組織における転写のタイミング、組織型、およびレベルを指図するため、シス作用性（プロモーターおよびエンハンサー）転写調節配列と組み合わせられ得る。翻訳調節要素も使用され得る。

【0081】

本発明は、いくつかの態様において、植物においてコーディング配列の転写を駆動することができるプロモーターに機能的に連結されたエチレン受容体ポリペプチドをコードする核酸を提供する。プロモーターは、例えば、植物起源またはウイルス起源に由来し得る。プロモーターは、例えば、構成的に活性であってもよいし、誘導性であってもよいし、または組織特異的であってもよい。本発明の組換え発現力セット、ベクター、トランスジェニックの構築において、種々のプロモーターが、例えば、植物または動物のいくつかまたは全ての組織においてディファレンシャルに遺伝子発現を指図するために選ばれ利用され得る。典型的には、上述のように、所望のプロモーターは、本明細書に記載された胚特異的遺伝子に相当するゲノムクローンの5'配列を分析することにより同定される。

【0082】

1. 構成的プロモーター

例えば、再生した植物のものとして、全ての形質転換された細胞または組織においてエチレン受容体タンパク質をコードする核酸の発現を指図すると考えられるプロモーター断片が利用され得る。そのようなプロモーターは、本明細書において「構成的」プロモーターと呼ばれ、大部分の環境条件および発達または細胞分化の状態の下で活性である。構成的プロモーターの例には、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S転写開始領域（例えば、Dagless, *Arch. Virol.* 142:183-191(1997) 参照）；アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のT-DNAに由来する1'-プロモーターまたは2'-プロモーター（例えば、Mengiste(1997)（前記）；O'Grady, *Plant Mol. Biol.* 29:99-108(1995) 参照）；タバコモザイクウイルスのプロモーター；ゴマノハグサモザイクウイルス (*Figwort mosaic virus*) のプロモーター（例えば、Maiti, *Transgenic Res.* 6:143-156(1997) 参照）のような植物に感染するウイルスに由来するもの；アラビドプシスアクチン遺伝子プロモーター（例えば、Huang, *Plant Mol. Biol.* 33:125-139(1997) 参照）のようなアクチンプロモーター；アルコール脱水素酵素 (Adh) 遺伝子プロモーター（例えば、Millar, *Plant Mol. Biol.* 31:897-904(1996) 参照）；アラビドプシス由来のACT11 (Huang et al, *Plant Mol. Biol.* 33:125-139(1996))、アラビドプシス由来のCat3 (GenBank No.U43147, Zhong et al, *Mol. Gen. Genet.* 251:196-203(1996))、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 由来のステアロイルアシルキャリアタンパク質不飽和化酵素をコードする遺伝子 (Genbank No.X74782, Solocombe et al, *Plant Physiol.* 104:1167-1176(1994))、トウモロコシ由来のGpc1 (GenBank No.X15596, Martinez et al, *J. Mol. Biol.* 208:551-565(1989))、トウモロコシ由来のGpc2 (GenBank No.U45855, Manjunath et al, 50

Plant Mol. Biol. 3 3:97-112(1997))、当業者に公知の様々な植物遺伝子に由来するその他の転写開始領域が含まれる。Holtorf et al, Plant Mol. Biol. 29:637-646(1995)も参考のこと。

【 0 0 8 3 】

2. 誘導性プロモーター

または、植物プロモーターは、変化する環境条件または発達条件の影響下で、本発明において記載された核酸、例えば、エチレン受容体タンパク質をコードする核酸の発現を指図してもよい。誘導性プロモーターにより転写をもたらし得る環境条件の例には、嫌気条件、上昇した温度、乾燥、または光の存在が含まれる。誘導性プロモーターにより転写をもたらし得る発達条件の例には、老化が含まれる。そのようなプロモーターは、本明細書において「誘導性」プロモーターと呼ばれる。例えば、本発明には、トウモロコシの乾燥により誘導性プロモーター (Busk(1997) (前記)) ; ジャガイモ由来の冷温、乾燥、および高塩濃度誘導性プロモーター (Kirch et al, Plant Mol Biol. 33:897 909(1997)) が組み入れられる。発達条件の例には、細胞の加齢および胚発生が含まれる。例えば、本発明には、アラビドプシスSAG12の老化誘導性プロモーター (Gan and Amasino, Science 27 0:1986-1988(1995)) 、ならびにLEC1 (Lotan et al, Cell, 93:1195-1205(1998)) 、LEC2 (Stone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11806-11811(2001)) 、FUS3 (Luerssen, Plant J. 15:755-764(1998)) 、AtSERK1 (Hecht et al, Plant Physiol 127:803-816(2001)) 、およびAGL15 (Heck et al, Plant Cell 7:1271-1282(1995)) の胚発生関連プロモーターが組み入れられる。

10

【 0 0 8 4 】

または、オーキシンまたはサイトカイニンのような植物ホルモンへの曝露により誘導性である植物プロモーターが、本発明の核酸を発現させるために使用される。例えば、本発明は、ダイズ (グリシン・マックス (Glycine max) L.) のオーキシン応答要素E1プロモーター断片 (AuxRE) (Liu, Plant Physiol. 115:397-407(1997)) ; オーキシン応答性アラビドプシスGST6プロモーター (サリチル酸および過酸化水素に対しても応答性) (Chen, Plant J. 10:955-966(1996)) ; タバコ由来のオーキシン誘導性parCプロモーター (Sakai, Plant Cell Physiol. 37:906-913(1996)) ; 植物ビオチン応答要素 (Streit, Mol Plant Microbe Interact. 10:933-937(1997)) ; およびストレスホルモンアブシジン酸に対して応答性のプロモーター (Sheen, Science 274:1900-1902(1996)) を使用することができる。本発明は、ARR5 (Brandstatter and Kieber, Plant Cell 10:1009-1019(1998)) 、ARR6 (Brandstatter and Kieber, Plant Cell 10:1009-1019(1998)) 、ARR2 (Hwang and Sheen, Nature 413:383-389(2001)) のサイトカイニン誘導性プロモーター、ERF1のエチレン応答性プロモーター (Solano et al, Genes Dev. 12:3703-3714(1998)) 、およびXVEの -エストラジオール誘導性プロモーター (Zuo et al, Plant J 24:265-273(2000)) も使用することができる。

20

【 0 0 8 5 】

除草剤または抗生物質のような植物に適用され得る化学物質試薬への曝露により誘導性である植物プロモーターも、本発明の核酸を発現させるために使用される。例えば、ベンゼンスルホンアミド除草剤解毒剤によって活性化されるトウモロコシIn2 2プロモーター (De Veylder, Plant Cell Physiol. 38:568-577(1997)) が、デキサメタゾン適用によって誘導性であるグルココルチコイド受容体タンパク質融合のプロモーター (Aoyama, Plant J. 11:605-612(1997)) と同様に使用され得；異なる除草剤解毒剤の適用は、根、排水組織、および苗条頂端分裂組織における発現を含む別個の遺伝子発現パターンを誘導する。記載された核酸のコーディング配列は、例えば、アベナ・サチバ (Avena sativa) L. (オートムギ) アルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子を含有しているトランスジェニックタバコ植物に関して記載されたようなテトラサイクリン誘導性プロモーター (Masgrau, Plant J. 11:465-473(1997)) ; またはサリチル酸応答要素 (Stange, Plant J. 11: 1315-1324(1997)) の制御下にあってもよい。

30

【 0 0 8 6 】

40

50

3. 組織特異的プロモーター

または、植物プロモーターは、特定の組織において本発明のポリヌクレオチドの発現を指図してもよい（組織特異的プロモーター）。組織特異的プロモーターは、栄養組織または生殖組織のような、植物発達中の特定の時点の特定の細胞または組織においてのみ活性である転写制御要素である。

【0087】

発達的な制御下にある組織特異的プロモーターの例には、栄養組織、例えば、根、葉、もしくは幹、または果実、胚珠、種子、花粉、雌ずい、花、薬、もしくは任意の胚性組織のような生殖組織のようなある種の組織でのみ（または主としてそれらでのみ）転写を開始させるプロモーターが含まれる。生殖組織特異的プロモーターは、例えば、胚珠特異的、胚特異的、内乳特異的、珠皮特異的、種子および種皮に特異的、花粉特異的、花弁特異的、萼片特異的、薬特異的、またはそれらの何らかの組み合わせであり得る。

10

【0088】

適当な種子特異的プロモーターは、以下の遺伝子に由来する：トウモロコシ由来のMAC1 (Sheridan, Genetics 142:1009-1020(1996)) ; トウモロコシ由来のCat3 (GenBank No.L 05934, Abler Plant Mol. Biol. 22:10131-10138(1993)) ; アラビドプシス由来のビブパラス (viviparous) -1 (Genbank No.U93215) ; アラビドプシス由来のatmyc1 (Urao, Plant Mol. Biol. 32:571-576(1996) ; Conceicao Plant 5:493-505(1994)) ; セイヨウアブラナ由来のnapAおよびBnCysP1 (GenBank No.J02798, Josefsson, JBL 26:12196-12201(1987)) ; Wan et al., Plant J 30:1-10(2002)) ; ならびにセイヨウアブラナ由来のナピン (napin) 遺伝子ファミリー (Sjodahl, Planta 197:264-271(1995)) 。果実特異的プロモーターには、CYP78A9遺伝子由来のプロモーターが含まれる (Ito and Meyerowitz, Plant Cell 12:1541-1550(2000)) 。

20

【0089】

Reiser, Cell 83:735-742(1995), GenBank No.U39944に記載された胚珠特異的BEL1遺伝子も使用され得る。Ray, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5761-5765(1994)も参照のこと。卵および中心細胞に特異的なFIE1プロモーターも、有用な生殖組織特異的プロモーターである。

【0090】

萼片および花弁に特異的なプロモーターも、生殖組織特異的な様式で本発明の核酸を発現させるために使用される。例えば、アラビドプシス花ホメオティック遺伝子アペタラ (APETALA) 1(AP1)は、若い花原基において発現され、後に萼片および花弁に局在するようになる推定転写因子をコードする（例えば、Gustafson Brown, Cell 76:131-143(1994) ; Mandel, Nature 360:273-277(1992)を参照のこと）。花輪生における萼片および花弁の正常な発達に必要な花ホメオティック遺伝子AP2の関連プロモーターも、有用である（例えば、Drews, Cell 65:991-1002(1991) ; Bowman, Plant Cell 3:749-758(1991)参照）。もう一つの有用なプロモーターは、発現が萼片と花弁原基との間のジャンクションに制限されているアラビドプシスのアンユージュアルフローラルオーガン (unusual floral organs) (ufo) 遺伝子の発現を制御するものである (Bossinger, Development 122:1093-1102 (1996)) 。

30

【0091】

花粉特異的プロモーターは、トウモロコシにおいて同定されている (Guerrero, Mol. Gen. Genet. 224:161-168(1990)) 。花粉において特異的に発現されるその他の遺伝子は、例えば、Wakeley, Plant Mol. Biol. 37:187-192(1998) ; Ficker, Mol. Gen. Genet. 257 :132-142(1998) ; Kulikauskas, Plant Mol. Biol. 34:809-814(1997) ; Treacy, Plant Mol. Biol. 34:603-611(1997) によって記載されている。

40

【0092】

雌ずいおよび長角果弁、花序分裂組織、茎生葉、ならびに幹および花柄の維管束に特異的なプロモーターには、FUL遺伝子由来のプロモーターが含まれる (Mandel and Yanofsky , Plant Cell, 7:1763-1771(1995)) 。発達中の心皮、胎座、隔壁、および胚珠に特異的

50

なプロモーターも、組織特異的な様式でLEC2核酸を発現させるために使用される。それには、SHP1遺伝子およびSHP2遺伝子に由来するプロモーターが含まれる (Flanagan et al. Plant J 10:343-353(1996)、Savidge et al, Plant Cell 7(6):721-733(1995))。薔薇科タマムに特異的なプロモーターは、TA29遺伝子に由来し得る (Goldberg et al., Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 350:5-17(1995))。

【0093】

その他の適当なプロモーターには、胚貯蔵タンパク質をコードする遺伝子に由来するものが含まれる。例えば、セイヨウアブラナ由来の2S貯蔵タンパク質をコードする遺伝子 (Dasgupta, Gene 133:301-302(1993)) ; アラビドプシス由来の2s種子貯蔵タンパク質遺伝子ファミリー ; セイヨウアブラナ由来のオレオシン20kDをコードする遺伝子 (GenBank No. M63985) ; ダイズ由来のオレオシンA (Genbank No.U09118) およびオレオシンB (Genbank No.U09119) をコードする遺伝子 ; アラビドプシス由来のオレオシンをコードする遺伝子 (Genbank No.Z17657) ; トウモロコシ由来のオレオシン18kDをコードする遺伝子 (Gen Bank No.J05212, Lee, Plant Mol. Biol. 26:1981-1987(1994)) ; およびダイズ由来の低分子量硫黄リッチタンパク質をコードする遺伝子 (Choi, Mol Gen Genet. 246:266-268(1995)) が使用され得る。トマト由来の組織特異的E8プロモーターは、所望の遺伝子産物が果実に位置するよう遺伝子発現を指図するために特に有用である。適当なプロモーターには、ATHB-8、AtPIN1、AtP5K1、またはTED3遺伝子のような維管束組織において発現される遺伝子に由来するものも含まれ得る (Baima et al, Plant Physiol. 126:643-655(2001) 、Galweiler et al., Science 282:2226-2230(1998)、Elge et al., Plant J. 26:561-571(2001)、Igarashi et al, Plant Mol. Biol. 36:917-927(1998))。

【0094】

果実登熟、老化、および落葉の間に活性で、比較的程度は低いが、落花の間にも活性なトマトプロモーターが、使用され得る (Blume, Plant J. 12:731-746(1997))。他の例示的なプロモーターには、雌ずい特異的な塩基性エンドキチナーゼをコードするジャガイモ (ソラナム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*) L.) SK2遺伝子の雌ずい特異的プロモーター (Ficker, Plant Mol. Biol. 35:425-431(1997)) ; トランスジェニックアルファルファの栄養期茎頂および花茎頂の上皮組織において活性なエンドウマメ (ピサム・サチバム (*Pisum sativum*) cv. アラスカ (Alaska)) 由来のBlec4遺伝子が含まれる。従って、それは、活発に成長中の苗条の上皮層に外来遺伝子の発現をターゲティングするための有用なツールである。

【0095】

葉、幹、根、および塊茎のような栄養組織において特異的に活性な多様なプロモーターも、本発明の方法において使用される核酸を発現させるために使用され得る。例えば、ジャガイモ塊茎の主要貯蔵タンパク質パタチンを制御するプロモーターが使用され得る (例えば、Kim, Plant Mol. Biol. 26:603-615(1994) ; Martin, Plant J. 11:53-62(1997))。根において高い活性を示すアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) 由来のORF13プロモーターも使用され得る (Hansen, Mol. Gen. Genet. 254:337-343(1997))。その他の有用な栄養組織特異的プロモーターには、以下のものが含まれる：主要タロイモ (コロカシア・エスキュレンタ (*Colocasia esculenta*) L. ショット (Schott)) 球茎タンパク質ファミリーに属するグロブリン、タリン (tarin) をコードする遺伝子のタリンプロモーター (Bezerra, Plant Mol. Biol. 28:137-144(1995)) ; タロイモ球茎発達の間に活性なクルクリン (curculin) プロモーター (de Castro, Plant Cell 4:1549-1559(1992))、ならびに根分裂組織および未熟な中心シリンドー領域に発現が局在しているタバコ根特異的遺伝子TobRB7のプロモーター (Yamamoto, Plant Cell 3:371-382(1991))。

【0096】

リブロースニリン酸カルボキシラーゼ (RBCS) プロモーターのような葉特異的プロモーターが使用され得る。例えば、トマトRBCS1遺伝子、RBCS2遺伝子、およびRBCS3A遺伝子は、葉および明所で成長した実生において発現され、RBCS1およびRBCS2のみが発達中のトマ

10

20

30

40

50

ト果実に発現される (Meier, FEBS Lett. 415:91-95(1997))。Matsuoka, Plant J. 6:31 1-319(1994) によって記載された、葉身および葉鞘の葉肉細胞においてほぼ排他的に高レベルに発現されるリブロースニリン酸カルボキシラーゼプロモーターが使用され得る。もう一つの葉特異的プロモーターは、集光性クロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子プロモーターである (例えば、Shiina, Plant Physiol. 115:477-483(1997); Casal, Plant Physiol. 116:1533-1538(1998)を参照のこと)。Li, FEBS Lett. 379:117-121(1996) によって記載された、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) myb関連遺伝子プロモーター (Atmyb5) は、葉特異的である。Atmyb5プロモーターは、発達中の葉トリコーム、托葉、若い花紋板および茎生葉の端にある上皮細胞、ならびに未熟な種子において発現される。At myb5 mRNAは、受精と胚発生の16細胞期との間に出現し、ハート型期を越えて持続する。B usk, Plant J. 11:1285-1295(1997) によってトウモロコシにおいて同定された葉プロモーターも使用され得る。 10

【 0 0 9 7 】

有用な栄養組織特異的プロモーターのもう一つのクラスは分裂組織 (根端および茎頂) プロモーターである。例えば、Di Laurenzio, Cell 86:423-433(1996); およびLong, Nature 379:66-69(1996) によって記載された、発達中の苗条または根の頂端分裂組織において活性である「シュートメリスティムレス (SHOOTMERISTEMLESS)」プロモーターおよび「スケアクロウ (SCARECROW)」プロモーターが使用され得る。もう一つの有用なプロモーターは、分裂組織および花 (柱頭の分泌帯、成熟した花粉粒、雌ずい群維管束組織、および受精胚珠) の組織に発現が制限されている3ヒドロキシ3メチルグルタルリル補酵素AレダクターゼHMG2遺伝子の発現を制御するものである (例えば、Enjuto, Plant Cell. 7:517-527(1995) 参照)。分裂組織特異的な発現を示すトウモロコシおよびその他の種に由来するkn1関連遺伝子も有用である (例えば、Granger, Plant Mol. Biol. 31:373-378(1996); Kerstetter, Plant Cell 6:1877-1887(1994); Hake, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 350:45-51(1995) 参照)。例えば、シロイヌナズナKNAT1またはKNAT2のプロモーター。茎頂において、KNAT1転写物は主として茎頂分裂組織に局在し; 苗条分裂組織におけるKNAT1の発現は、花成の間に減少し、花序茎の皮質に制限される (例えば、Linco In, Plant Cell 6:1859-1876(1994) 参照)。 20

【 0 0 9 8 】

当業者は、組織特異的プロモーターが、標的組織以外の組織において、機能的に連結された配列の発現を駆動し得ることを認識すると考えられる。従って、本明細書において使用されるように、組織特異的プロモーターは、標的組織において優先的に発現を駆動するが、その他の組織においてもある程度の発現をもたらし得るものである。 30

【 0 0 9 9 】

もう一つの態様において、本発明において記載された核酸は、転位因子を通して発現される。これは、構成的に活性のポリペプチドの、構成的であるが、間欠的で、低頻度の発現を可能にする。本発明は、例えば、トバモウイルスサブゲノムプロモーター (Kumagai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1679-1683(1995)) 強い節部特異的なレポーター遺伝子の発現を駆動するプロモーターにより、感染イネ植物の節部細胞においてのみ複製するイネツングロ桿状ウイルス (RTBV); 維管束要素、葉肉細胞、および根端において最も高い活性を有するキャッサバ葉脈モザイクウイルス (CVMV) プロモーター (Verdaguer, Plant Mol. Biol. 31:1129-1139(1996)) を含み得る、ウイルス由来の組織特異的プロモーターの使用も提供する。 40

【 0 1 0 0 】

F. トランスジェニック植物の作製

さらなる局面において、本発明は、単離された核酸がそれらポリヌクレオチド配列と少なくとも90%同一である、(例えば、SEQ ID NO:1により表される) ERSまたは(例えば、SEQ ID NO:3もしくは5により表される) ETRのようなエチレン受容体をコードする核酸配列と機能的に連結されたプロモーター配列を含む組換え発現力セットを含むトランスジェニック植物を提供する。または、単離された核酸は、SEQ ID NO:1、3、または5の短縮変 50

異体である。

[0 1 0 1]

本発明のDNA構築物は、多様な従来の技術によって、所望の植物宿主のゲノムへ導入され得る。例えば、DNA構築物は、植物細胞プロトプラストの電気穿孔および微量注入のような技術を使用して植物細胞のゲノムDNAへ直接導入されてもよいし、または、DNA構築物は、微粒子銃、例えば、DNA粒子衝撃を使用して植物組織に直接導入されてもよい。

【 0 1 0 2 】

微量注入技術は、当技術分野において公知であり、科学文献および特許文献に十分に記載されている。ポリエチレングリコール沈殿を使用したDNA構築物の導入は、Paszkowski et al. *Embo J.* 3:2717-2722(1984)に記載されている。電気穿孔技術は、Fromm et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824(1985)に記載されている。微粒子銃形質転換技術は、Klein et al. *Nature* 327:70-73(1987)に記載されている。

【 0 1 0 3 】

または、DNA構築物は、適当なT-DNA隣接領域と組み合わせられ、従来のアグロバクテリウム・ツメファシエンス宿主ベクターへ導入され得る。細菌が細胞に感染した時、アグロバクテリウム・ツメファシエンス宿主の病原機能が、植物細胞DNAへの構築物および隣接マーカーの挿入を指図すると考えられる。無毒化 (disarming) およびバイナリーベクターの使用を含む、アグロバクテリウム・ツメファシエンスにより媒介される形質転換技術は、科学文献に十分に記載されている。例えば、Horsch et al. *Science* 233:496-498(1984) および Fraley et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803(1983) および *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995) を参照のこと。

〔 0 1 0 4 〕

上記の形質転換技術のいずれかに由来する形質転換植物細胞は、形質転換された遺伝子型を保有し、従って、減少したファルネシルトランスフェラーゼ活性のような所望の表現型を保有する完全な植物を再生させるために培養され得る。そのような再生技術は、典型的には、所望のヌクレオチド配列と共に導入された殺生物剤および／または除草剤マーカーに頼った、組織培養成長培地中のある種の植物ホルモンの操作に頼る。培養プロトプラストからの植物再生は、Evans et al, Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp.124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983 ; およびBinding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp.21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985に記載されている。再生は、植物カルス、外植片、器官、またはそれらの一部からも入手され得る。そのような再生技術は、Klee et al., Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486(1987)に一般に記載されている。

〔 0 1 0 5 〕

achia) 属、エンドウ (Pisum) 属、ナシ (Pyrus) 属、アオネカズラ属 (Polypodium) 、ヤマザクラ (Prunus) 属、ワラビ (Pteridium) 属、ダイコン (Raphanus) 属、ヒマ (Ricinus) 属、ライムギ (Secale) 属、キオン (Senecio) 属、カラシ (Sinapis) 属、ナス (Solanum) 属、モロコシ (Sorghum) 属、カカオノキ (Theobromus) 属、トリゴネラ (Trigonella) 属、パンコムギ (Triticum) 属、ソラマメ (Vicia) 属、ブドウ (Vitis) 属、アズキ (Vigna) 属、およびトウモロコシ (Zea) 属の種を含む広範囲の植物で使用され得る。

【 0 1 0 6 】

G. 本発明のトランスジェニック植物の検出

本発明は、植物におけるエチレン受容体活性をモジュレートする方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、生殖植物構造における老化遅延の表現型を有する植物を選択することをさらに含む。いくつかの態様において、生殖構造は種子である。いくつかの態様において、表現型は單一種子中の多胚である。いくつかの態様において、構築物は有性交雑により導入される。

【 0 1 0 7 】

いくつかの態様において、スクリーニングは、望ましい表現型を有する植物を検出することをさらに含む。例えば、植物の光合成寿命が影響を受けているか否かを決定するため、葉色を調査することができる。延長された光合成生活環を有する植物は、野生型植物と比較して、より長い期間、緑色を維持する葉を特徴とする。さらに、クロロフィルレベルおよびCO₂同化を、周知の技術を使用して測定することができる。植物の栄養構造および生殖構造のサイズを、それらが野生型植物のものより大きいか否かまたは小さいか否かを決定するために調査することができる。本発明のトランスジェニック植物は、より大きい果実、胚珠、種子、花粉、胚組織、花、雌ずい、雄ずい、萼片、花弁のような花部分、心皮、葉、幹、塊茎、根、維管束組織、前形成層組織、または根もしくは幹の分裂組織を保有する場合がある。結果として生じたトランスジェニック植物を、増加した乾燥耐性についてアッセイすることができる。増加した乾燥耐性についてアッセイする方法は公知であり、脱離葉 (detached leaf) アッセイにおいてトランスジェニック植物の蒸散速度、気孔伝導度、水分損失速度を測定すること、または葉膨圧を調査することを含む。減少した蒸散速度を有するトランスジェニック植物は、例えば、増加した乾燥耐性を有する。

【 0 1 0 8 】

比較的高密度で成長する植物の能力を試験することによっても、低下したエチレン感受性を有する植物を選択することができる。このエチレン抵抗性表現型を有する植物は、選択過程に関わらず、高密度で有利に植え込まれる。同様に、エチレン抵抗性表現型を有する植物は、選択過程に関わらず、乾燥条件で有利に植え込まれる。

【 0 1 0 9 】

バイオマーカー、例えば、マーカー遺伝子の存在を検出することによっても、低下したエチレン感受性を有する植物を選択することができる。マーカー遺伝子は、一般に、直ちに検出可能ではない場合がある緑色保持表現型と同時に分離する容易に検出可能な表現型を与える。

【 0 1 1 0 】

胚軸の放射状の拡大、根および胚軸の伸長の阻害、ならびに頂端フック (apical hook) の誇張 (exaggeration) を含む「三重応答」表現型によって、エチレン感受性を観察することができる (Neljubow (1901), Pflanzen Beih. Bot. Zentralbl., 10:128-139)。構成的エチレンシグナル伝達を引き起こす変異体は、野生型植物と比較して低下した丈を特徴とする (Guzman and Ecker (1990), Plant Cell, 2:513-523; Kieber et al. (1993) Cell 72:427-441)。

【 0 1 1 1 】

反対に、暗所により誘導されるクロロフィル喪失の遅延および/または植物サイズの増加によって、エチレン非感受性が観察されることもある。最適条件下で、即ち、包囲された成長施設で蓄積し得る微量レベルのエチレンの非存在下で成長した野生型植物と比較し

10

20

30

40

50

た場合ですら、エチレン非感受性植物の方が大きい可能性がある。しかしながら、エチレン応答は、植物種および環境条件によって変動することが、当業者によっては認識されると考えられる。緑色保持表現型は、標準的なアッセイを使用して便利にアッセイされ得る。例えば、暗所誘導老化アッセイが使用され得る。そのようなアッセイは、典型的には、1週間、葉を植物に付着させたまま覆うことを含む。光の欠如は葉老化を誘導するが、それが、本発明の植物においては、対照と比較して遅延し得る。

【0112】

トランスジェニック植物を検出するための生化学的手段、例えば、トランスジェニック構築物に挿入されたレポーター遺伝子のようなバイオマーカーの発現、または植物中のトランスジェニック核酸配列もしくはトランスジェニックタンパク質配列の検出も、周知である。mRNAおよびタンパク質を検出し定量化するための手段、例えば、ノーザンプロット、PCR、ウェスタンプロット、および活性アッセイが、当技術分野において周知である。例えば、植物への発現カセットの導入後、植物をトランスジーンの存在についてスクリーニングし、近交系またはハイブリッド系と交雑させることができる。次いで、子孫植物を、トランスジーンの存在についてスクリーニングし、自家受粉させる。自家受粉植物からの子孫を成長させる。結果として生じたトランスジェニック植物を、改変されたエチレン関連過程に関連した表現型特徴のうちのいずれか、例えば、緑色保持形質または老化遅延に関連した特徴について調査することができる。例えば、本発明の方法を使用して、本発明において記載された核酸またはタンパク質の阻害は、栄養植物構造または生殖植物構造の細胞において老化を遅延させる場合がある。

10

20

【0113】

本明細書に記載された例および態様は、例示のみを目的とし、それらを考慮して、様々な修飾または変化が当業者に示唆されると考えられること、および、それらが本願の本旨および趣旨ならびに添付の特許請求の範囲の範囲に含まれることが理解される。本明細書中に引用された全ての刊行物、特許、および特許出願が、全ての目的のため参照により完全に本明細書に組み入れられる。

【0114】

実施例

標準的な方法を、以下に簡潔に記載される方法において使用した。

【0115】

実施例1：ジー・メイズにおけるアラビドブシスetr1-1の発現はエチレン応答の遅延をもたらす

30

構築物設計および植物形質転換

アラビドブシスetr1-1変異体は、以前に記載されている。それは、エチレン非感受性をもたらすドミナントネガティブ変異体エチレン受容体である。pACH18 (Christensen and Quail (1996), Transgenic Res., 5:213-218) 中にトウモロコシユビキチン (Ub) プロモーターの制御下でコムギアラビドブシスetr1-1を含有しているトランスジェニックトウモロコシを、記載されたようにして (Gordon-Kamm et al. (1990), Plant Cell, 2:603-618) 、胚形成性A188 × B73 (Hill) カルスの粒子衝撃によって作成した。bar遺伝子との同時形質転換は、形質転換カルスのビアラホス選択を提供した (De Block et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2518)。Ub-etr1-1構築物を含有している再生体を、PCRを使用して同定した。

40

【0116】

結果

エチレン非感受性の状態を導入することにより、トウモロコシにおいてエチレンにより媒介される事象が改変され得るか否かを決定するため、トウモロコシユビキチン (Ub) プロモーターの制御下でアラビドブシスetr1-1を発現するトランスジェニックトウモロコシ系を、温室条件下で成長させた。etr1-1トランスジーンを保持していることがPCRによって確認されたT₀子孫の葉は、改変された成長表現型を示した。etr1-1トランスジーンからの発現が葉老化または緑色保持表現型の改変をもたらしたか否かを調査するため、成体T₀世代植物からの第6葉および第7葉を、植物に付着させたまま、光が葉に到達するのを防止

50

するため、1週間、覆った。光の欠如は、通常、葉老化を誘導し、これは、暗所により誘導される老化と呼ばれ、緑色保持可能性の尺度としてしばしば使用される。

【0117】

*etr1-1*を発現するトランスジェニック葉は、葉老化の遅延を示し、このことから、トウモロコシにおけるエチレン非感受性の状態が緑色保持表現型をもたらすことが示唆された。これらの結果は、例えば、第2膜貫通におけるCysからTyrへの変異、または類似の効果を有するその他の変異の後、ドミナントネガティブ変異体エチレン受容体の発現を通して、トウモロコシにおけるエチレン非感受性の状態を工作することにより、エチレンにより媒介される過程、例えば、葉の加齢および老化が改変され得ることを証明している。

【0118】

実施例2：アラビドプシスにおけるドミナントネガティブなZmERS1およびZmETR2の発現はエチレン非感受性をもたらす

本発明者らは、次に、変異体ジー・メイズエチレン受容体の発現が、同一の様式で、アラビドプシスにおいてエチレン非感受性をもたらすか否かを決定することにした。

【0119】

構築物設計および植物形質転換

アラビドプシスを、実施例1に記載された方法に従い、pBI121構築物により形質転換した。構築物は、以下のコーディング配列のうちの一つに機能的に連結された35Sプロモーターを含んでいた：ein2-5 (Alonso et. al. (1999) *Science* 284:2148-52に記載された、エチレン非感受性アラビドプシス変異）；変異体ZmERS1；または変異体ZmETR2 (ZmETR40)。ZmERS1変異体およびZmETR2変異体は、ドミナントネガティブエチレン受容体（非エチレン結合性）であり、それらの配列は本明細書に記載されている。野生型植物をエチレン感受性対照として使用した（WTと表記される）。エチレンの前駆物質ACC上の発芽は、実生成長を阻害する。エチレン非感受性形質転換体を、20 μ M ACCを含有している培地上で暗所で形質転換体を発芽させることによりスクリーニングした。（MS1-11、MS2-12、およびMS1-15と表記される）ZmERS1形質転換体の3種の独立の系、および（MT2-4、MT2-5、またはMT2-9と表記される）ZmETR2形質転換体の3種の独立の系を、さらなる研究のために選択した。

【0120】

結果

変異体ZmETR2エチレン受容体および変異体ZmERS1エチレン受容体が、エチレン非感受性の状態を付与することを示すため、20 μ M ACCを含有している培地で、またはアラビドプシスにおいてエチレン非感受性の状態を化学的に付与する20 μ M Agを含有している培地で、変異体系を発芽させた。データは、変異体ZmERS1または変異体ZmETR2のいずれかを発現している種子が、エチレンに対する古典的な「三重応答」を示さず、頂端フックのない長く細い胚軸を示すという点で、エチレン非感受性であることを示している。類似した結果が、エチレン非感受性変異体ein2-5についても観察された。対照的に、野生型実生は、エチレンに対する古典的な応答を示す。Agの存在下では、WT実生もエチレン非感受性である。5日齢の実生についての定量的測定を表1に示す（特記しない限り、p < 0.001）。これらのデータは、変異体ZmERS1エチレン受容体および変異体ZmETR2エチレン受容体が、アラビドプシスにおいてエチレン非感受性を付与し得ることを示している。

【0121】

（表1）変異体ZmETR2受容体および変異体ZmERS1受容体の発現はアラビドプシスにおいてエチレン非感受性を付与する

10

20

30

40

	20mM ACC		5mM Ag	
	胚軸長 (mm)	根長 (mm)	胚軸長 (mm)	根長 (mm)
WT	5.0 ± 0.71	3.00 ± 1.03	14.7 ± 1.12	6.69 ± 1.41
<i>ein2-5</i>	13.9 ± 1.71	7.43 ± 2.63	11.0 ± 3.13	6.27 ± 1.93 p = 0.371
MT2-4	14.2 ± 1.61	6.05 ± 1.36	13.0 ± 3.20	7.33 ± 1.81 p = 0.122
MT2-5	14.4 ± 1.97	4.87 ± 1.16	11.5 ± 2.87	5.39 ± 1.27
MT2-9	13.8 ± 2.36	6.27 ± 1.76	12.1 ± 2.40	7.07 ± 1.58 p = 0.354
WT	6.6 ± 133	3.10 ± 0.92	16.9 ± 2.41	5.48 ± 0.94
<i>ein2-5</i>	17.0 ± 2.98	6.51 ± 1.56	14.7 ± 3.78	5.97 ± 1.56 p = 0.349
MS1-11	17.6 ± 3.10	4.60 ± 0.88	10.9 ± 3.68	6.35 ± 1.87 p = 0.086
MS1-15	18.0 ± 1.38	5.88 ± 1.40	11.7 ± 5.01	5.51 ± 1.45 p = 0.921
MS1-12	8.8 ± 1.37	3.33 ± 0.97 p = 0.406	17.3 ± 1.95 p = 0.561	7.14 ± 1.97

10

20

【 0 1 2 2 】

ある範囲のACC濃度で付与されるエチレン非感受性のレベルを調査するため、一つのZmERS1系 (MS1-11) からの種子および一つのZmETR2系 (MT2-9) からの種子を、様々なレベルのACC (1.0 ~ 20 μ M) を含有している培地で発芽させた。変異体エチレン受容体の発現は、そのACC濃度範囲の全域でエチレン非感受性を付与した。より高いACC濃度で達成されたエチレン非感受性のレベルには、ある程度の減少が存在したが、それはWT実生より実質的に大きいままであった。定量的測定は図1に示される。

【 0 1 2 3 】

明所で20 μ M ACC上で実生を発芽させた場合にも、エチレン非感受性が示された。WT実生は拡大しない子葉を示し、変異体ZmERS1または変異体ZmETR2のいずれかを発現する系は、エチレン非感受性変異体 $ein2-5$ に類似していた。明所における10 μ M ACC上でその後の成長は、WT実生が、Ag上で成長したものより実質的に小さく、その一方で、変異体ZmERS1または変異体ZmETR2のいずれかを発現する系は、Ag上で成長したWT実生、または $ein2-5$ エチレン非感受性変異体に類似していることを示した。

30

【 0 1 2 4 】

変異体ZmERS1または変異体ZmETR2のいずれかを発現する植物は、 $ein2-5$ およびetr1-1エチレン非感受性変異体に類似した、より大きい葉のサイズを有していた。7週齢において、変異体ZmERS1または変異体ZmETR2のいずれかを発現する植物は、 $ein2-5$ について観察されたものに類似した、葉老化遅延および緑色保持表現型を示した。4週目にアッセイした時、クロロフィル含有量の違いはほとんど観察されなかった (表2)。しかしながら、変異体ZmERS1または変異体ZmETR2のいずれかを発現する植物は、ある程度の開花の遅延を示し、その結果として葉数の増加を示した。

40

【 0 1 2 5 】

(表2) 変異体ジー・メイズエチレン受容体を発現するアラビドプシスの表現型

	開花時期 (日)	葉数	クロロフィルa (ng/mg FW)	クロロフィルb (ng/mg FW)	a/b比
WT	22.0	11.1 ± 1.7	960 ± 92	281 ± 21	3.42
<i>ein2-5</i>	22.5	12.1 ± 2.0	923 ± 67	296 ± 21	3.11
MT2-4	22.5	12.9 ± 1.9	988 ± 86	298 ± 27	3.32
MT2-5	22.5	13.8 ± 2.0	903 ± 93	271 ± 16	3.33
MT2-9	28.0	16.2 ± 1.2	965 ± 104	304 ± 39	3.18
MS1-11	24.0	12.5 ± 1.7	1016 ± 144	312 ± 33	3.25

【 0 1 2 6 】

本発明者らは、次に、ホモ接合性状態で存在する場合と、ヘミ接合性状態で存在する場合とを比較しながら、変異体ZmERS1の発現が、エチレン非感受性の状態の付与に関して完全に優性であるか否かを決定することを試みた。ZmERS1変異体に関してヘミ接合性の種子を入手するため、ZmERS1変異体（MS1-11）ホモ接合体種子と野生型種子との間の交雑を実施した。これらを、変異体ZmERS1に関してホモ接合性の種子に対して試験した。植物を暗所で5日間20 μM ACC上で成長させた。表3に示されるように、ヘミ接合性実生は、この三重反応アッセイにおいてホモ接合性実生と同等にエチレン非感受性である（p < 0.001）。ヘミ接合性変異体およびホモ接合性変異体は、20 μM ACC上で明所で成長した場合にも同等に非感受性であった。

【 0 1 2 7 】

（表3）ZmERS1変異体は、アラビドプシスにおいてそのヘミ接合性発現の後に優性である

	胚軸長 (mm)	根長 (mm)
WT	8.52 ± 0.65	2.78 ± 0.83
ヘミ接合性MS1-11	16.5 ± 4.78	4.78 ± 1.60
ホモ接合性 MS1-11	17.3 ± 4.77	4.77 ± 0.92

【 0 1 2 8 】

配列表

SEQ ID NO:1

ジー・メイズERS1様コーディング配列 (Cys Tyr65)

10

20

30

ATGGACGGATGCGATTGCATAGAGCCACTATGGCCTACCGATGATCTTCTCGTCA
 AGTATCAGTACATCTCAGACTTCTCATAGCCCTGCGTACTTCTCGATTCCATTG
 GAGCTCATATATTGTGAAGAAGTCGTCCTCTTCCATACAGATGGGTCTGA
 TCCAGTTGGTGCCTTATAGTTCTTATGGGCAACCCATCTGATAAACCTGTGG
 ACGTTACACACACATACAAAGACCGTTGCGATGGTCATGACCATAGCGAAGATT
 CTACAGCAGTCGTCCTGTCAACTGCTTGTGATGCTCGTCATATCATTCCGAC
 TTGTTGAGCGTGTAAAAGTAGGGAGTTGTTCTGAAGAATAAGCTGAGGAGCTT
 GATAGAGAGATGGGACTTATAAGGACGCAAGAGGAGACTGGTAGACATGTTAGG
 ATGCTTACACATGAAATCAGAAGTACTCTTGATAGACATACAATTGAAGACTA
 CTCTCGTTGAGCTAGGAAGGACCTGGGTCTGGAAGAATGTCATTGTGGATGCC
 ATCTCGAAGTGGCTCAAGCCTCAGCTTCTCATACTTGCGCCACCAAGATTACTG
 TTGGATCATCGGTGCCAATGAATCTTCTGTGTCATCAATCAAGTGTTCAGTAGCAA
 CCGGGCAATCATAATACCCCACACATCTTCTGGCGGGTTCGACCTCTGCA
 GGGCGATATGTTCCACCAGAAGTGGCCGAGTCCGTGTACCTCTACATCTT
 CAAACTTCAAATAATGATTGGCCTGAGCTCTCAGCAAAAAGCTTGAATCAT
 GGTGTTGATGCTCCATCTGATAGTGCTAGAAAATTGCATGTGCATGAATTGGAG
 CTGGTTGAGGTGCTGCTGATCAGGTAGCAGTTGCACTATCTCATGAGCTATT
 TCGAAGAGTCCAATGGGGCACGTGATTACTAATGGAGCAGAATGTTGCCCTGG
 ATTTAGCTCGAAGAGAGGCTGAGATGGCTATCCGTGCTGCAATGATTCCCTAGC
 TGTTATGAATCAGAAATGAGAACACCCATGAATGCAATAATAGCCCTTCCTCC
 TTGCTTTGGAAACTGAGCTACTCCTGAGCAGCGTCTAATGGTGGAAACAGTAC
 TGAAAAGCAGCAATTGTTAGCAACACTCATCAATGATGTTCTGGATTTCAA
 ACTCGAGGAAGCCTGAACGGAGATTAAAGCATTCAATCTCATGCTGTT
 TTCAAAGAAGTAATGGGTTTCATTAACCAATTGCATCTATCAAGAGGCTATCTG
 TATCGGTTATGTTGGCACAGATCTGCCATTGTGCAATTGGTGTGAAAGAG
 ACTCATGCAAACATTCTGAACATCTCTGGCAATGCTGTAAGTTACCAAGGAG
 GGACACATCACGCTTAGCTTCCATTGTGAGGCTGACTCTTGAGAGAGTTCA
 GAACCCCAGAATTCTCATCCAATGCAAGTGTGATGAACATTCTATTGAAAGTTCA
 GGTAAAAGATAACAGGCTGAGGTTAGTCTCAGGATCTACCTCATGTATTACA
 AAGTTGCTCATCCTCAAAGTGGAGGAAACCGAGGGTTAATGGTAGTGGCTTG
 GCCTTGCCATATGCAAGAGGTTGTTAGTCTTATGGGAGGGCACATCTGGATCGA
 CAGCGAAGGAACCGGAAGAGGTTGCAACATTCGTCTAAGCTCGCGT
 GTGTGACAACACAAACACCTACCAAAAGCAGCTGTTCTTAATCTGGCCAAG
 CAGTGCAGACTCCAATTGTCGCTCCGAAAGTGCTGCTGCCGACGGGAGAGGATCT
 GTTCCCTGAAATCTCGGTACCAAAAGAAGCGTA

10

20

30

SEQ ID NO:2

ジー・メイズERS1様タンパク質配列 (Cys Tyr65)

MDGCDCIEPLWPTDDLLVKYQYISDFFIALAYFSIPLLEIYFVKKSSFPYRWVLIQFG
 AFIVLYGATHLINLWTFTTHKTVAMVMTIAKVSTAVVSCATALMLVHIIPDLSVK
 TRELFLKNKAELDREMGLIRTQEETGRHVRMLTHEIRSTLDRHMLKTTLVELGRTL
 GLEECALWMPSRSGSSLQLSHTLHHQITVGSSVPINLPVINQVFSSNRRIIPHTSPLARI
 RPLTGRYVPPEVAARVPLLHLSNFQINDWPELSAKSFAIMVMLPSDSARKWHVHE
 LELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRARDLLMEQNVALDLARREAEMAIRARNDL
 AVMNHEMRTPMNAIIALSSLLTELTPEQRLMVETVLKSSNLLATLINDVLDLSKLE
 DGSLELEIKAFLNHAVFKEVMGFIKPIASIKRLSVSMLAPDPLPLCAIGDEKRLMQTIL
 NISGNAVKFTKEGHITLVASIVKADSLREFRTPEFHPTASDDHFYLVQVKDTGCGIG
 PQDLPHVFTKFAHPQSGGNRGFNGSGLAICKRFVSLMGGHIWIDSEGTGRGCTAT
 FVVKLGVCDNTNTYQQQLIPLVWPSSADSLRAPKPLPDGRGSTPLKSRYQRSV

40

SEQ ID NO:3

ジー・メイズETR2様 (ZmETR9) コーディング配列 (Cys Tyr102)

ATGGTGGTGGAACGGCACTGCTGCGGGGTTCCCTCCGCGTGGATCCTCCTGT
 TCCTCTCCTCCCTGCTCCTCGCCGTACAGCGCGTCTGTCGATTCCGGCACTGC
 GGCAGCTGCGACGACGCCACGACGGCGCCCTCTCCAGCACCTATAACATCCTG
 CAATGCCAGAAGGTACAGCGACTTCCTCATCGCCGCGCTACTTCTCCATCCCAC
 TCGAGCTGCTACTTCGCCACCTGCTCCGACCTCTCCCCCTCAAATGGATCGTG
 CTGCAGTTCGGCCCTCATCGTCTACTCGGCCACGACCCATCAGCACCTCACTGTGTT
 CACCTACGAGCCGACTCCTCCACCTCGTACTCGCCCTACCGTCGCCAAGTCC
 TGACGGCACTGGTCTCCTCGCAGGCCATCACCGTCTGACGCTGATACCA
 GCTCCTGAGGGTAAGGTCAAGGAAAATTCTGATGAAACAAGGCCGTGAGCT
 GGACCGGGAGGTGGGGAGGATGAAAAGGAAAGAAGAGGCGAGCTGGCATGTGC
 GCATGCTCACACAGGAGATCCGCAAGTCGCTCGACAGACATACCATCTGTACAC
 CACCATGGTTGAGCTCTCGAAGGCACTGGAAC TGCAAGAATTGTGCTGTGGATg
 CCTGATGAGACCAGGAGCACGATGATCTAACACATCAGCTGAGGGAAAGGGAT
 ATAATGGACCCACAGAAACACTCGATTCTATTGATGATCCGGATGTTCAAGAAA
 TAAAGGCAACCAAGGATGCAAAAGTTCTGGCCAGATTGGCGCTAGGGTTT
 CTAGCCGAAGCAAGCATGAAGCAGGGCTGTGGCTGCAATAAGGATGCCGATGT
 TAAGGGTGTCAAATTCAAAGGAGGGACTCCGAAGTGATGCGAGACGAGCTATG
 CTATCTGGTTCTGGTTGCCTAATGATGGTCATTAGGGTGGGGTGAAGAGA
 GTTGGAGATTGTTGAGGTAGTTGCTGACCAAGTGCAGTCGCTCTGTCACATGCT
 GCACTCCTAGAGGAGTCTCAGCTGATGCGAGAGAAGCTTGGCGAGCAGCATAGG
 GACTTGCTGCAGGCAAGGATGAAAGCCATGAGGGCAGGGGACGCTAGGAATTCC
 TTCCAGACTGCAATGTACGATGGAATGCGAAGGCCAATGCACTCAATCCTGGTC
 TCGTCTCAATGATGCAACAGGAGAGCATGAATCCAGAGCAAAGGCTGTGATGG
 ATGCCATTGCCAAGACAAGCAGTGTGCA TCCACACTGATGAAACGATGTGATGC
 AAACATCGACAATGAACTGTGAGCAGTGTCTTGGTCAGGAGGCCGTTCAACCT
 TCATTCTTCATTAAAGAAGTTGGAGTGGTCAGATGTCATACTGGTTGCAAG
 GGTGTGGAGTTGAGTTCAAGTGGAGAAATTCTTGCAGAAAGGATCATTGGTG
 ATGAGAAGAGAGTCTTCCATATTGTCCTGCACATGGTAGGCAGTCTAACAGACCG
 ATGTAATGCTGGCTGTCTCATTATGTAATGTCCATAATGAGGTGAAGAT
 AGGCATAATCATGACTGGATGCTGCGAAGAGCAAACCTCTGGGGCTATGTAT
 GTGTGAAATTGAGATTAGGATTAGAAAATCAAAGGGCTATCTGTTGAGTTCATC
 AAGCAGTCAGATAAGTCAGGGATCCAAACCCAAACAATTCTGAGATGGGGCTTAG
 CTTCAATATGTGCAAGAAGATTGTCAGATGATGAATGGCAATATTGGTCAGTA
 TCAGATTCTAAAGCATCGGAGAAACTATCATGCTAGTCCTCCAGTCCAGTTGG
 AACCTGTGACTCCGGTCTCTGGAGCGTCCTCAGATTGTACAGATCATCCGCAAT
 TCCCAACTTAATGGGCTCAGAGTCCTCCTGCGGACAGCGACTGCACCAACCGA
 GCTGTAACTCACAGGCTCTAGAGAAGCTGGTTGCCAGTCCTTCGGTCGCTT
 CTGGCGTCCAATGCATCAGCTCCTCGCTGCGGAGTCGTCTCCAGCTGGTGGT
 TCTTGATCTTGACATGCAGACGATGGATGGATTGCAAGTAGCCCGCGATCAGG
 AAGTTCACTGAGCAATAGTTGGCTGCCGTTGATTATTGCCCTAGCAGCAAGAATCG
 ACGACAAACATCCGGGATCGTTGCCAGAGGTCAGGAGTAATGGCCTGATCCAGA
 AACCGGTACATTAGCCGCGCTGGGAGATGAACTGTATAGAGTCCTTCAGAACAA
 AT

SEQ ID NO:4

ジー・メイズETR2様 (ZmETR9) タンパク質配列 (Cys Tyr102)

10

20

30

40

MVVG TALLRGVSSA WILLFLSSLLLPSA ASVDFGHCGGCDDADDGALSSTYNILQC
QKVSDFLIAAYFSIPEL LLYFATCSDFPLKWIVLQFGAFIVLYGLTHLITVFTYEPHS
FHLVLALTVAKF LTA LVSF A TITLLT LIPQLL RVK VRENFLMN KAREL DREVGRMK
RKEEASWHVRMLTQEIRKSLDRHTILYTTMVELSKALELQNCAVWMPDETRSTMIL
THQLRERDIMDPQKHSIPIDDPDVQEIKATKDAKVLGPDSALGVSSRSKHEAGPVAI
RMPMLRVSNFKG GTPEVMQTSY AILVLVLPNDGSLGWRRELEIVEVVA DQV AVAL
SHA ALLEESQLMREKLA EQH RDLLQAKDEAMRAGDAR NSF QTAMYDGMRRPMHSI
LGLVSM MQQESMNPEQRLVMDAIAKTSSVASTLMNDVMQTSTMCEHLSLVRRPF
NLHSFIKEVVG VV RCLTGCKGV EFEFQVENS LPERIIGDEKRVF HIVLHMVGTLTDRC
NAGCISLYVN VHNEVEDRH NHDWMLRRA NFGG YVCVKF EIRIRKSKGYLLSSSSQ
ISQGSKPNNSEMGLSFNMCKKIVQMMNGNIWSVSDSKSIGETIMVLQFQLEPVTPVS
GASSDLYRSSAIPNFNGLRVLLADSDCTNRAVTHRLL EKL GCRVLSV ASGVQCISFA
AESSFQLVVLDDM QTMDGFEVARAIRKFSSNSWLPLI AALA RIDDNIR DRCQRSGV
NGLIQKPVT LAALGDELYRVLQNN

10

SEQ ID NO:5

ジー・メイズETR2様 (ZmETR40) コーディング配列 (Cys Tyr102)

ATGGTGGTGGGACGGCGCCGTGCGGGGCTCCGTCTCCTCCGTGGATCCTCC
 TGCTCCTTCCTCCCTGCTCCTCTCGCCGTGGCGGTCCCGTCAATTCCGGCAC
 TCGGGCTCGACGACGCCACGACGGCGCCCTCTCGAGCACCTACAACATCCTG
 CAATGCCAGAAGGTAGCGACTTCTCATCGCCGCGCTACTTCTCCATCCC
 TCGAGCTGCTACTTCGCCACCTGCTCCGACCTTCTCCCTCAAATGGATCGT
 CTGCAGTTGGCGCCTTCATCGTGCCTACGGCCTACGCACCTCATCACCGTGT
 CACCTACGACCCGCACTCCTCCACCTCGTGCCTGCCCTACCGTCGCCAAGTTC
 ATGACGGCACTAGTCTCCTCGCCACAGCCATCACGCTGCTGACACTGATACC
 AGCTCCTGAGGGTAAGGTAGGGAAAATGAAAGAAGAGGGCAGCTGGCATGT
 TGGACCGGGAGGTGGGATGATGAAAATGAAAGAAGAGGGCAGCTGGCATGT
 CGTATGCTCACACAGGAGATCCGCAAGTCGCTCGACAGGCACACCACCTTG
 CCACCATGGTTGAGCTCTCGAAAGCGCTGGAACTGCAGAATTGTGCTGTCTGG
 GCGCGATGAAACCAAGGAGCGAGATGATCTTAACCTCATCAGCCAAGGGAAAGGG
 TATAATGGACCAGCAGAACTGCTGATTCTATTGATGATCCAGATGTTCAAGAA
 ATAAAGGCTACCAAGGACGCAAAGTTCTGGGCCAGATTGGCACTAGGGGTT
 GCTACCCGCAAGCTTGACGTGGGCCTGTGGCTGCAATAAGGATGCCGATGTT
 AGGGTGTCAAATTCAAAGGAGGGACTCCAGAAGTGATGAGACGAGCTATGCT
 ATCTTGGTTCTGGTTGCCTAATGATGGTTCATTGGGGTGGGTAGAAGAGAGT
 TGGAGATTGTAAGTAGTTGCTGACCAAGTTGCGGTCGCTTGTACATGCTGC
 ACTCCTAGAGGAGTCTCAGCTGATGCGAGAGAAACTTGCTGAGCAGTATAGGG
 CTTGCTGCAGGCAAAGCATGAAGCCATGAGGGCAGGGGAAGCTCGGAATTCTT
 CCAGACTGCAATGTACGACGGAATGCGAAGGCCAATGCACTCAATCTTGGTCTT
 GTCTCAATGCAACAGGAGAGCATGAATCCAGAGCAAAGGGTTGTATGGAT
 GCCATTGCCAAGACAAGCAGTGTGCGTCCACACTGATGAATGATGTGATGCAA
 ACATCGACAATGAACTGTGAGCACTTGTCTTGGTGAAGGAGGCCGTTCAATCTC
 ATTCTTTATTAAAGAAGCTGTTGGAGTGGTCAGATGTCTAATGGTTGCAAGGG
 TGTAGAGTTGAGTTCAAGTGGATAATTCTTGCCAGAAAGGATCATTGGTGAT
 GAGAAGAGAGTCTCCACATTGTCCTGCACATGGTAGGCACCCCTAATAACCGAT
 GTAATGTCGGCTGTATCTCGTTATATGTCAATGGTCATAATGAGGTTGAAGAGAG
 GCATAATCATGACTGGATGCTGCGGAGAACAAACTCTCTGGGGCTATGTTGT
 GTGAAATTGAGATTAGGATTAGAAAATCCAAGGACTATCTTGAGTTCAAACG
 GTCAGATAAGTCATGGGCCAACCAAACAATTCTGAGATGGGCTAGCTCA
 ATATGTGCAAGAAGATTGTGAGATGATGAACGGCAACATTGGTCAGTATCAG
 ATTCTAAAAGCGTTGGAGAAACCATCATGCTGGTCCCTCAGTTCCAGCTGCA
 TCTGACTCGGTCTCCTCCGCGCGTCTCAGACTGAGCCGATCGCCGAATC
 CCCAACTTCAACGGGCTCAGACTCCTGGAGAACGCTGGCTGCCGGCTTCCGGT
 CGCGTAAACACACAGGCTCCTGGAGAACGCTGGCTGCCGGCTTCCGGT
 CGCGTGTCCAATGCACGAGCTCCTCGCCGCCAGCCGCTTCCAGCTGGT
 CCTGGACCTCGCCTTGCAGAGGACGGACGGCTCGAAGTGCCCCGGCGATCAG
 GAAGTTCAAGTCAATAGCTGGCTGCCGCTGATCGTCGCCCTAGCTCGAGGATC
 GATGACAAGGTCCGAGACGGATGCCAGAGGTGGGATAAGCGGCCTGATCCAG
 AAACCGGCCACGTTAGCTCGCTGGAGATGAGCTGTATAAGGGCTTCAGAAC
 AGT

SEQ ID NO:6

ジー・メイズETR2様 (ZmETR40) タンパク質配列 (Cys Tyr102)

10

20

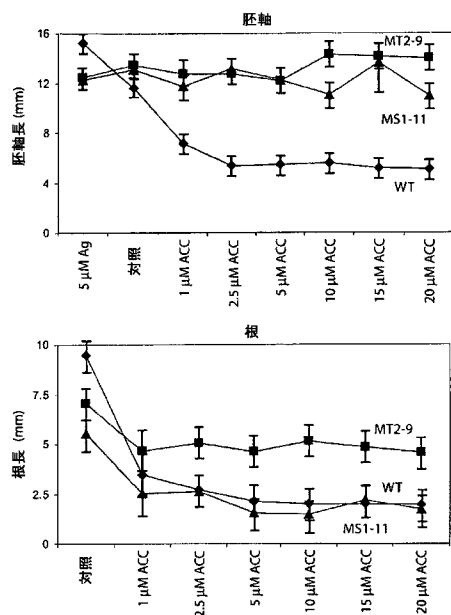
30

40

MVVGTA PCGVSSVWILLLSSLLPSAASVDFGHC GCDADDGALSSTYNILQC
 QKVSDFLIAAAYFSIPELLYFATCSDLFPLKWIVLQFGAFIVLYGLTHLITVFTYDPHS
 FHLVLALTVAKFMTALVSFATAITLLTLPQLLRVKVRENFLVNKA RELDREVGMMK
 MKEEASWHVRMLTQEIRKSLDRHTILYTTMVELSKALELQNCAVWMPDET RSEMIL
 THQPRERDIMDQQNCISI PDDPDVQEIKATKDAKVLGPDSALGVATRKL DVGPVAI
 RMPMLRVSNFKG GTPEVMQTSY AILVLVLPNDGSLGWRRELEIVEVVA DQVAVAL
 SHAALLEESQLMREKLA EQYRDLLQAKHEAMRAGEA RNSFQTAMYDGMRRPMHSI
 LGLVSMQQESMNPEQRVVMDAI AKTSSVASTLMNDVMQTSTMNCEHLSLVRRPF
 NLHSFIKEAVGVVRCLTGCKGVEF QVDNSLPERIIGDEKRVFHIVLHMVGTLINRC
 NVGCISLYVNGHNEVEERHNHDWMLRRTNFSGGYVCVKFEIRIRKSKD YLLSSNGQI
 SHGSKPNNSEMGLSFNMCKKIVQMMNGNIWSVSDSKSVGETIMVLQFQLQPLTAV
 SSAASSDLSRSSAIPNFNGLRVLLADSDDTNRAVTHRLL EKL GCRVLSVASGVQCTSS
 FAAEPSFQLVVL DALQRTDGLEVARAIRKFSSNSWLPLIV ALAARIDD KVRDGCQR
 SGISGLI QKPATLAALGDELYRVLQNS

10

【図1】



【配列表】0005337800000001.app0005337800000002.xml

フロントページの続き

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ガリー ダニエル アール。
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リバーサイド ニューウェル ドライブ 3121

審査官 水落 登希子

(56)参考文献 Plant Physiol. , 2002年, Vol.129, p.1557-1567
Plant Physiol. , 2006年, Vol.142, p.1690-1700

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90
A 01 H 5/00
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / W P I X (S T N)
G e n B a n k / G e n e S e q