

(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2008-523821

(P2008-523821A)

(43) 公表日 平成20年7月10日(2008.7.10)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 B 0 3 0
C 1 2 N 9/02	(2006.01)	C 1 2 N 9/02		4 B 0 2 4
A O 1 H 5/00	(2006.01)	A O 1 H 5/00	A	4 B 0 5 0

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁)

(21) 出願番号	特願2007-547015 (P2007-547015)	(71) 出願人	501383750 ビーエーエスエフ プラント サイエンス ゲーエムベーハー ドイツ連邦共和国 デー-67056 ル ートビヒシャフェン (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成17年12月19日 (2005.12.19)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成19年8月9日 (2007.8.9)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/046027	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02006/073787	(72) 発明者	ハーテル, ヘイコ アメリカ合衆国 27713 ノースカロ ライナ州, ダラム, チェストナット ブラ フス レーン 24
(87) 国際公開日	平成18年7月13日 (2006.7.13)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/637, 531		
(32) 優先日	平成16年12月20日 (2004.12.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 植物由来の脂肪酸デサチュラーゼ遺伝子をコードする核酸分子およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、一般的には、植物中の種子貯蔵化合物の存在に関連するタンパク質をコードする核酸配列に関する。より具体的には、本発明は、脂質代謝調節タンパク質をコードするFAD2様核酸配列およびトランスジェニック植物におけるそれら配列の使用に関する。特に、本発明は、脂質代謝関連化合物を操作する方法、ならびに植物および種子中の油レベルを増加させ、脂肪酸組成を変化させる方法に関する。本発明はさらに、これらの新規植物ポリペプチドを用いて、植物の成長を刺激し、ならびに / または種子貯蔵化合物の収量および / もしくは組成を増加させる方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

$X^1X^2X^3LX^4X^5X^6X^7LX^8X^9PX^{10}YL$ (式中、 X^1 はMではなく、 X^3 はTではなく、 X^6 はFではなく、 X^7 はVではない)、

$GX^{11}X^{12}X^{13}X^{14}X^{15}X^{16}X^{17}X^{18}HX^{19}X^{20}PX^{21}X^{22}X^{23}X^{24}X^{25}X^{26}X^{27}X^{28}ER$ (式中、 X^{15} はGではなく、 X^{20} はFではなく、 X^{21} はNではなく、 X^{22} はAではない)、

$HX^{29}X^{30}PX^{31}X^{32}X^{33}X^{34}X^{35}X^{36}X^{37}X^{38}ER$ (式中、 X^{30} はFではなく、 X^{31} はNではなく、 X^{32} はAではない)、

$LX^{39}X^{40}X^{41}X^{42}X^{43}X^{44}X^{45}GX^{46}X^{47}X^{48}X^{49}X^{50}X^{51}X^{52}YX^{53}X^{54}P$ (式中、 X^{41} はYではなく、 X^{45} はQではなく、 X^{48} はSではなく、 X^{49} はMではなく、 X^{50} はIではない)、

$TX^{55}X^{56}X^{57}X^{58}HX^{59}X^{60}X^{61}X^{62}X^{63}X^{64}X^{65}X^{66}X^{67}X^{68}X^{69}X^{70}X^{71}T$ (式中、 X^{67} はNではない)、
および

$PX^{72}X^{73}X^{74}X^{75}X^{76}X^{77}X^{78}X^{79}X^{80}X^{81}X^{82}X^{83}X^{84}X^{85}X^{86}$ (式中、 X^{84} はWではなく、 X^{85} はYではなく、 X^{86} はVではない)、

からなる群より選択されるアミノ酸配列(式中、Xは、上記で別途定義されていない場合、任意のアミノ酸を意味する)を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

AWYT、

$PYX^{87}YNNPX^{88}GRLVHIX^{89}VQLTLGWPLYLAX^{90}NX^{91}SGRPYPRFACHFDPYGP IYND RER$ 、

FISDVGV、

$ALX^{92}KLX^{93}SX^{94}FGFWWWVRVYGV P$ 、

$ILGEYYQFDX^{95}TPVAKAT$

からなる群より選択されるアミノ酸配列(式中、Xは任意のアミノ酸を意味する)を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする単離された核酸配列。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の核酸配列によりコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

a) 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、または配列番号35に示されるポリヌクレオチド配列と、

b) 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、

上記a)またはb)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列と、

上記a)またはb)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列と、

上記a)またはb)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列と、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のポリヌクレオチド配列によりコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

単離された核酸が、微生物または植物中で種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能するポリペプチドをコードする、請求項 5 に記載の単離された核酸。

【請求項 8】

単離されたLMPポリペプチド配列が、微生物または植物中で種子貯蔵化合物のモジュレ

10

20

30

40

50

ーターとして機能する、請求項 6 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 3 または 5 に記載の核酸が、種子特異的プロモーター、根特異的プロモーター、および組織非特異的プロモーターからなる群より選択されるプロモーターに機能し得る形で連結されている、該核酸を含む発現ベクター。

【請求項 10】

野生型と比較して種子貯蔵化合物の重量%レベルが改変されたトランスジェニック植物を作製する方法であって、

a. 核酸を含む発現ベクターを植物細胞に導入する第1工程、および

b. 該植物細胞からトランスジェニック植物を生成させる第2工程、

を含み、

ここで、該核酸は該植物中で種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能するポリペプチドをコードし、かつ該核酸は、

a. 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33または配列番号35に示されるポリヌクレオチド配列と、

b. 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、

c. 上記a)またはb)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列と、

d. 上記a)またはb)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列と、

e. 上記a)またはb)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列と、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む、前記方法。

【請求項 11】

前記核酸が、請求項 5 のa)またはb)のポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

オレイン酸のレベルが、該植物の野生型品種と比較して、トランスジェニック植物において増加する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

野生型と比較してオレイン酸の重量%のレベルが増加したトランスジェニック植物を作製する方法であって、

植物細胞を、RNA前駆体構築物を用いて形質転換する第1工程、および

該植物細胞からトランスジェニック植物を作製する第2工程、

を含み、

ここで、該構築物は、前駆体マイクロRNA配列をコードするヌクレオチド配列に機能し得るように連結された植物細胞中での発現を駆動するプロモーターを含み、該マイクロRNA前駆体配列をコードするヌクレオチド配列が、

a. 配列番号47に示されるヌクレオチド配列、

b. 上記a)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、

c. 上記a)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列、および

d. 上記a)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、

からなる群より選択される、前記方法。

【請求項 14】

前駆体マイクロRNA配列をコードするヌクレオチド配列が、配列番号37に示されるマイクロRNAをコードするヌクレオチド配列が配列番号40に示されるマイクロRNAをコードする

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列により置換されるように遺伝子操作されている、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

配列番号47に示されるヌクレオチド配列、

上記a)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、

上記a)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列、

上記a)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列

、
からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 16】

植物における種子貯蔵化合物の重量%のレベルをモジュレートする方法であって、

a. 核酸を含む発現ベクターを植物細胞に導入する第1工程、および

b. 該植物細胞からトランスジェニック植物を作製する第2工程、

を含み、

ここで、該核酸は該植物中で種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能するポリペプチドをコードし、該核酸は請求項 5 に記載のポリヌクレオチド配列を含む、前記方法。

【請求項 17】

オレイン酸の重量%のレベルを改変する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 10、13 または 16 に記載の方法により作製されたトランスジェニック植物。

【請求項 19】

オレイン酸重量%のレベルが、該植物の野生型品種と比較してトランスジェニック植物において増加している、請求項 18 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 20】

前記植物が、ナタネ、カノーラ、亜麻仁、ダイズ、ヒマワリ、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コムギ、コショウ、マンジュギク、ワタ、アブラヤシ、ココヤシ、アマ、トウゴマ、テンサイ、イネおよびラッカセイからなる群より選択される、請求項 18 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 21】

請求項 18 に記載のトランスジェニック植物により生産された種子であって、該植物は、種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能するポリペプチドを発現するものであり、かつ該植物は、該植物の野生型品種と比較して種子貯蔵化合物の改変された重量%レベルについて固定されている、前記種子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2004年12月20日に出願された米国仮出願第60/637531号（これはその全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする）に対する優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本明細書に記載するのは、農業形質、園芸形質および品質形質を改善するための脂肪酸デサチュラーゼ2様(FAD2様)ポリペプチドをコードする単離された核酸分子などの、植物の遺伝子工学の分野における発明である。本発明は、全体的には、植物における種子貯蔵化合物の存在に関連するタンパク質をコードする核酸配列に関する。より具体的には、本発明は、脂質代謝調節タンパク質をコードするFAD2様核酸配列およびトランスジェニック植物におけるこれらの配列の使用に関する。特に、本発明は、脂質代謝関連化合物を操作する方法、ならびに植物および種子中の油レベルを増加させ、脂肪酸組成を変化させる方法に関する。本発明はさらに、植物の成長を刺激し、ならびに/または種子貯蔵化合物の収量および/もしくは組成を増加させるためのこれらの新規植物ポリペプチドの使用方法に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0003】

発明の背景

植物の研究および遺伝子操作には、Gregor Mendelの有名な研究以前に始まった長い歴史がある。この科学を完成させる際に、科学者は、デンプン含量が増加したジャガイモ塊茎から脂肪酸含量が増加または変化したカノーラおよびヒマワリに及ぶ脂肪種子植物までの植物における特定の形質の改変を達成してきた。植物油の消費及び使用の増加に伴い、種子油含量および種子油レベルの改変はますます拡大してきた(例えば、Topferら、1995, Science 268:681-686)。トランスジェニック植物における生合成経路の操作は、分子生物学者および植物生化学者が特定のより高価値の生成物の産生を引き起こすように植物代謝に影響を及ぼす多くの機会を提供する。種子油産生または組成は、ダイズ(米国特許第5,955,650号)、カノーラ(米国特許第5,955,650号)、ヒマワリ(米国特許第6,084,164号)およびナタネ(Topferら、1995, Science 268:681-686)などの多くの伝統的な脂肪種子植物、ならびにタバコ(Cahoonら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11184-11188)などの非伝統的な脂肪種子植物において改変されてきている。

10

【0004】

植物種子油は、中性脂質および極性脂質の両方を含む(表1を参照)。中性脂質は主にトリアシルグリセロールを含むが、これは種子中の油体に蓄積する主要な貯蔵脂質である。極性脂質は、例えば、小胞体、ミクロソーム膜および細胞膜などの種子細胞の各種膜に主に認められる。中性および極性脂質は、いくつかの共通する脂肪酸(表2を参照)および様々な共通でない脂肪酸を含む。膜脂質の脂肪酸組成は高度に調節されており、選択された数の脂肪酸のみが膜脂質中に認められる。一方、多数の通常でない脂肪酸を、多くの植物種の種子中の中性貯蔵脂質に組み入れることができる(Van de Loo F.J.ら、1993, 「植物中の脂質代謝における通常でない脂肪酸(Unusual Fatty Acids in Lipid Metabolism in Plants)」、pp. 91-126, TS Moore Jr. (編) CRC Press; Millarら、2000, Trends Plant Sci. 5:95-101)。

20

【0005】

脂質は脂肪酸から合成され、その合成は2つの部分：原核経路および真核経路に分けられうる(Browseら、1986, Biochemical J. 235:25-31; Ohlrogge & Browse 1995, Plant Cell 7:957-970)。原核経路は、脂肪酸生合成の主要な部位であるプラスチド中に位置する。脂肪酸合成は、アセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACCase)によるアセチル-CoAのマロニル-CoAへの変換から始まる。マロニル-CoAは、マロニル-CoA:ACPトランスアシラーゼによりマロニル-アシル運搬タンパク質(ACP)に変換される。酵素 -ケト-アシル-ACP-シンターゼIII (KAS III)は、アセチル-CoA由来のアシル基をマロニル-ACPに転移させて3-ケトブチリル-ACPを形成させる縮合反応を触媒する。その後の一連の縮合、還元および脱水反応において、ACPコファクター上の新生脂肪酸鎖は、16-または18-炭素飽和脂肪酸鎖が形成されるまで、マロニル-ACPにより提供される2個の炭素原子の段階的付加(縮合)により伸長する。プラスチドの -9-アシル-ACPデサチュラーゼは、第1の不飽和二重結合を脂肪酸に導入する。チオエステラーゼは、ACPコファクターから脂肪酸を切断し、遊離脂肪酸は、それらが真核経路に脂肪酸アシル-CoAエステルとして関与する場である細胞質に輸送される。この経路においては、脂肪酸は、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼおよびリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼによりグリセロール-3-リン酸のsn-1およびsn-2位がそれぞれエステル化されて、ホスファチジン酸(PA)を生じる。PAは、他の極性および中性脂肪酸の前駆体であり、後者はKennedy経路において形成される(Voelker 1996, Genetic Engineering Setlow(編) 18:111-113; Shanklin & Cahoon 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Frentzen 1998, Lipids 100: 161-166; Millarら、2000, Trends Plant Sci. 5:95-101)。

30

40

【0006】

種子中の貯蔵脂質は、炭水化物由来の前駆体から合成される。植物は、細胞質ゾル中に完全な解糖経路を有し(Plaxton 1996, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47

50

: 185-214)、完全な経路はまた、ナタネのプラスチド中にも存在することが示された(Kang & Rawsthorne 1994, Plant J. 6:795-805)。スクロースは炭素およびエネルギーの主要な供給源であり、葉から発達中の種子内へと輸送される。種子の貯蔵中に、スクロースは細胞質ゾル中で変換されて、代謝前駆体グルコース-6-リン酸およびピルビン酸を提供する。これらはプラスチド中に輸送されて、脂肪酸の合成の主要な前駆体として機能するアセチル-CoAに変換される。プラスチド中のアセチル-CoAは脂質生合成の中心的な前駆体である。アセチル-CoAは、様々な反応によりプラスチド中で形成させることができるが、各反応の正確な寄与は依然として議論されている(Ohlrogge & Browse 1995, Plant Cell 7:957-970)。しかしながら、大部分のアセチル-CoAは細胞質からプラスチド中に輸入されるグルコース-6-リン酸およびピルビン酸から誘導されることは受け入れられている。スクロースは、供給器官(葉、または光合成が起こる場所ならどこでも)中で産生され、シンク器官とも呼ばれる発達中の種子に輸送される。発達中の種子においては、スクロースは全ての貯蔵化合物、すなわち、デンプン、脂質および部分的には種子貯蔵タンパク質の前駆体である。従って、スクロースが中心的な役割を果たす炭水化物代謝は、種子貯蔵化合物の蓄積にとって非常に重要であることが明らかである。

10

【0007】

トリアシルグリセロール(種子油)などの貯蔵化合物は、発芽および若い実生の成長の際に用いられる、炭素およびエネルギーの蓄えとして役立つ。種子油(植物油)はまた、ヒトの食事の必須成分および化学産業のための供給原料を提供する価値ある商品でもある。

【0008】

種子油の脂質および脂肪酸含量ならびに/または組成を、伝統的な植物育種法により改変することができるが、組換えDNA技術の出現により、植物の種子油含量のより容易な操作が可能になり、またいくつかの場合においては、育種のみによっては達成することができなかった方法で種子油を変化させることが可能になった(例えば、Topferら、1995, Science 268: 681-686)。例えば、トランスジェニックタバコへの¹²-ヒドロキシラーゼ核酸配列の導入により、新規脂肪酸であるリシノール酸の、タバコ種子油への導入がもたらされた(Van de Looら、1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:6743-6747)。また、タバコ植物を遺伝子操作して、コリアンダー由来のアシル-ACPデサチュラーゼの導入および発現により低レベルのペトロセリン酸を産生させた(Cahoonら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:11184-11188)。

20

30

【0009】

植物中の種子油含量の改変は、重要な医学的、栄養的および経済的効果を有する。医学的効果に関しては、多くの種子油に認められる長鎖脂肪酸(C18以上)は、高コレステロール血症および冠状動脈性心臓病に関連する他の臨床疾患の減少と関連付けられている(Brenner 1976, Adv. Exp. Med. Biol. 83:85-101)。従って、これらの種類の脂肪酸のレベルが増加した植物の消費は、心臓病の危険性を低減させることができる。種子油含量レベルの増加はまた、種子油の大規模産生を増加させ、それによってこれらの油のコストを低減させる。

【0010】

植物中の種子油などの化合物のレベルを増加させるか、または変化させるためには、脂質および脂肪酸代謝を調節する核酸配列およびタンパク質を同定しなければならない。以前に述べたように、⁶-デサチュラーゼ核酸、¹²-デサチュラーゼ核酸およびアシル-ACPデサチュラーゼ核酸などのいくつかのデサチュラーゼ核酸がクローニングされ、種々の植物種における脂肪酸合成にとって必要とされる酵素をコードすることが証明されてきた(Miquel & Browse, 「種子の発達および発芽(Seed Development and Germination)」、Galiliら(編), Marcel Dekker, New York, pp. 169-193, 1994; Ohlrogge & Browse 1995, Plant Cell 7:957-970)。カノーラ、ダイズ、ニンジン、パインおよびシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)などのそのような様々な種に由来するオレオシン核酸配列もクローニングされ、これらの植物中の油体のリン脂質単層膜と結合したタンパク質をコードすることが決定されてきた。

40

50

【 0 0 1 1 】

植物および種子の発達に一般的に影響を及ぼすいくつかの化合物が公知であるが、貯蔵化合物蓄積の発達調節にとってより特異的である因子を具体的に同定し、その宿主植物および他の植物種に対して油生産の変化または増加をもたらす能力を有する遺伝子を同定することの、明確な必要性が存在する。

【 0 0 1 2 】

本発明の根底にある別の課題は、脂肪酸デサチュラーゼをサイレンシングするより効率的な方法を提供することであった。本発明の根底にある別の課題は、脂肪種子の脂肪酸含量を特異的に改変することであった。本発明の根底にある別の課題は、脂肪種子のオレイン酸含量の増加であった。本発明の根底にある別の課題は、脂肪種子のリノール酸含量の減少であった。

10

【 0 0 1 3 】

本発明は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、ダイズ(*Glycine max*)、イネ(*Oryza sativa*)、トウモロコシ(*Zea mays*)、亜麻(*Linum usitatissimum*)、オオムギ(*Hordeum vulgare*)またはコムギ(*Triticum aestivum*)に由来する核酸配列を開示する。これらの核酸配列を用いて、多量の脂質化合物を含有する脂肪種子植物である、カノーラ、亜麻仁、ダイズ、ヒマワリ、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コムギ、イネ、コシヨウ、マンジュギク、ワタ、アブラヤシ、ココヤシ、アマ、トウゴマおよびラッカセイなどの、トランスジェニック植物を含む植物における、タンパク質、糖および油などの種子貯蔵化合物のレベルを変化または増加させることができる。

20

【 発明の開示 】

【 0 0 1 4 】

発明の簡単な説明

本発明は、植物中の種子貯蔵化合物の代謝に関連する新規な単離核酸およびアミノ酸配列、特に、FAD2様である配列を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明の別の対象は、

- $X^1X^2X^3X^4X^5X^6X^7LX^8X^9PX^{10}YL$ (式中、 X^1 はMではなく、 X^3 はTではなく、かつ X^6X^7 はFVではない)、
 - $GX^{11}X^{12}X^{13}X^{14}X^{15}X^{16}X^{17}X^{18}HX^{19}X^{20}PX^{21}X^{22}X^{23}X^{24}X^{25}X^{26}X^{27}X^{28}ER$ (式中、 X^{15} はGではなく、 X^{20} はFではなく、 $X^{21}X^{22}$ はNAではない)、
 - $HX^{29}X^{30}PX^{31}X^{32}X^{33}X^{34}X^{35}X^{36}X^{37}X^{38}ER$ (式中、 X^{30} はFではなく、 $X^{31}X^{32}$ はNAではない)、
 - $LX^{39}X^{40}X^{41}X^{42}X^{43}X^{44}X^{45}GX^{46}X^{47}X^{48}X^{49}X^{50}X^{51}X^{52}YX^{53}X^{54}P$ (式中、 X^{41} はYではなく、 X^{45} はQではなく、 X^{48} はSではなく、 X^{49} はMではなく、 X^{50} はIではない)、
 - $TX^{55}X^{56}X^{57}X^{58}HX^{59}X^{60}X^{61}X^{62}X^{63}X^{64}X^{65}X^{66}X^{67}X^{68}X^{69}X^{70}X^{71}T$ (式中、 X^{67} はNではない)、
 - $PX^{72}X^{73}X^{74}X^{75}X^{76}X^{77}X^{78}X^{79}X^{80}X^{81}X^{82}X^{83}X^{84}X^{85}X^{86}$ (式中、 $X^{84}X^{85}X^{86}$ はWYVではない)
- からなる群より選択されるアミノ酸配列 (式中、Xは上記の他の場所で定義されていない場合、任意のアミノ酸を意味する) を含む、単離されたポリペプチドである。

30

40

【 0 0 1 6 】

請求項1のaからfまでの共通ペプチド配列を決定するための配列アラインメントは、Vector NTI Suite 9.0のAlign X(2003年8月22日)を用いて作製するのが好ましい。多重アラインメントに用いられるパラメーターは以下の通りである：ギャップ開始ペナルティ：10；ギャップ伸長ペナルティ：0.05；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40。

【 0 0 1 7 】

好ましい実施形態において、本発明は、

- AWYPYX⁸⁷YX⁸⁸NPX⁸⁹GRLVHIX⁹⁰VQLTLGWPLYLAX⁹¹NX⁹²SGRPYPRFACHFDPYGPIYNDRE、
- FISDVG、

50

c. ALX⁹³KLX⁹⁴SX⁹⁵FGFWVVVRVYGV、
d. ILGEYYQFDX⁹⁶TPVAKAT

からなる群より選択されるアミノ酸配列(式中、Xは任意のアミノ酸を意味する)を含む単離されたポリペプチドを請求する。

【0018】

請求項2のaからdの共通ペプチド配列を決定するための配列アラインメントは、Vector NTI Suite 9.0のAlign X(2003年8月22日)を用いて作製するのが好ましい。多重アラインメントに用いられるパラメーターは以下の通りである：ギャップ開始ペナルティ：10；ギャップ伸長ペナルティ：0.05；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40。

【0019】

本発明の単離されたポリペプチドは、請求項1のアミノ酸配列のうちの1、2、3、4、5または6つを含んでもよい。本発明の単離されたポリペプチドは、請求項2のアミノ酸配列のうちの1、2、3または4つを含んでもよい。Xは、請求項1中で別途定義されていない場合には、任意のアミノ酸、特に、G、A、V、L、I、F、Y、W、P、D、E、N、Q、S、T、C、M、K、R、Hを表す。

【0020】

X¹はMではない。X¹は、好ましい実施形態においては、G、A、V、L、I、F、Y、W、P、D、E、N、Q、S、T、C、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、F、TおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、さら

【0021】

X³はTではない。X³は、好ましい実施形態においては、G、A、V、L、I、F、Y、W、P、D、E、N、Q、S、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、L、A、V、Fからなる群より選択されるアミノ酸であり、さら

【0022】

X⁶はFではなく、X⁷はVではない。X⁶およびX⁷は、好ましい実施形態においては、互いに独立に、G、A、L、I、Y、W、P、D、E、N、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、P、LおよびTからなる群より選択されるアミノ酸であり、さらにより好ましい実施形態においては、X⁶はPまたはLであり、X⁷はLまたはTであり、さらに好ましい実施形態においては、X⁶はLであり、X⁷はTである。

【0023】

X¹⁵はGではない。X¹⁵は、好ましい実施形態においては、空白(blank)であるか、またはA、V、L、I、F、Y、W、P、D、E、N、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、X¹⁵はRまたは空白であり、さらに好ましくは、X¹⁵はRである。空白はこの位置にアミノ酸が存在しないことを意味する。

【0024】

X²⁰はFではない。X²⁰は、好ましい実施形態においては、G、A、V、L、I、Y、W、P、D、E、N、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、NまたはDであり、さらにより好ましい実施形態においては、Dである。

【0025】

X²¹はNではなく、X²²はAではない。X²¹およびX²²は、好ましい実施形態においては、互いに独立にG、V、L、I、F、Y、W、P、D、E、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸である。より好ましい実施形態においては、D、Y、H、S、G、Iからなる群より選択されるアミノ酸であり、さらにより好ましい実施形態においては、X²¹はD、YまたはHであり、さらに好ましくはYであり、またX²²はSまたはGであり、さらに好ましくはGである。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

X^{30} はFではない。 X^{30} は、好ましい実施形態においては、G、A、V、L、I、Y、W、P、D、E、N、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、 X^{30} はNまたはDであり、さらにより好ましい実施形態においては、 X^{30} はDである。

【 0 0 2 7 】

X^{31} はNではなく、 X^{32} はAではない。 X^{31} および X^{32} は、好ましい実施形態においては、互いに独立にG、V、L、I、F、Y、W、P、D、E、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、D、Y、H、S、Gからなる群より選択されるアミノ酸である。さらにより好ましい実施形態においては、 X^{31} はD、YまたはHであり、さらに好ましくはYであり、また X^{32} はSまたはGであり、さらに好ましくはGである。

10

【 0 0 2 8 】

X^{41} はYではない。 X^{41} は、好ましい実施形態においては、G、A、V、L、I、F、W、P、D、E、N、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、 X^{41} はLである。

【 0 0 2 9 】

X^{45} はQではない。 X^{45} は、好ましい実施形態においては、G、A、V、L、I、F、Y、W、P、D、E、N、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、M、KおよびFからなる群より選択されるアミノ酸であり、さらにより好ましい実施形態においては、 X^{45} はFである。

20

【 0 0 3 0 】

X^{48} はSではなく、 X^{49} はMではなく、 X^{50} はIではない。 X^{48} 、 X^{49} および X^{50} は、互いに独立に、好ましい実施形態においてはG、A、V、L、F、Y、W、P、D、E、N、Q、T、C、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においてはQ、W、LおよびVからなる群より選択されるアミノ酸である。さらにより好ましい実施形態においては、 X^{48} はQまたはWであり、さらに好ましくは X^{48} はWであり、 X^{49} 、 X^{50} は互いに独立にLまたはVであり、さらに好ましくは X^{49} 、 X^{50} は互いに独立にVである。

【 0 0 3 1 】

X^{67} はNではない。 X^{67} は、好ましい実施形態においては、G、A、V、L、I、F、Y、W、P、D、E、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸であり、より好ましい実施形態においては、 X^{67} はHまたはRであり、さらにより好ましい実施形態においては、 X^{67} はHである。

30

【 0 0 3 2 】

X^{84} はWではなく、 X^{85} はYではなく、 X^{86} はVではない。 X^{84} 、 X^{85} および X^{86} は、好ましい実施形態においては、互いに独立にG、A、L、I、F、P、D、E、N、Q、S、T、C、M、K、RおよびHからなる群より選択されるアミノ酸である。 $X^{84}X^{85}X^{86}$ は、より好ましい実施形態においては、互いに独立にS、F、V、P、M、A、L、KおよびGからなる群より選択されるアミノ酸であり、さらにより好ましい実施形態においては、 $X^{84}X^{85}X^{86}$ はVAKである。

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、上記のアミノ酸配列(請求項1または請求項2記載のもの)を含むタンパク質をコードする単離された核酸配列およびそのような核酸配列(請求項3記載のもの)によりコードされる単離されたポリペプチドも提供する。

40

【 0 0 3 4 】

本発明の別の実施形態においては、上記の単離されたポリペプチド(請求項1または請求項2のもの)は、微生物または植物中の種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能する。

【 0 0 3 5 】

本発明の別の実施形態においては、上記の単離されたポリペプチド(請求項1または請求項2のもの)を用いて、植物の野生型品種と比較して、トランスジェニック植物におけるオレイン酸のレベルを、例えば、1重量%、2.5重量%、5重量%、7.5重量%、10重量%、12

50

.5重量%、15重量%、17.5重量%、20重量%、22.5重量%、25重量%またはそれ以上増加させる。

【0036】

好ましい実施形態においては、上記の単離されたポリペプチド(請求項1または請求項2のもの)は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に開示されたポリペプチド配列を有する。

【0037】

さらなる実施形態においては、上記の単離されたポリペプチド(請求項1または請求項2のもの)は、

a. 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に開示されたポリペプチド配列、

b. 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33または配列番号35に開示されたポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド配列、

c. 上記のa)またはb)のポリペプチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列、

からなる群より選択される。

【0038】

本発明はさらに、

a. 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33または配列番号35に開示されたポリヌクレオチド配列、

b. 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に開示されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、

c. 上記のa)またはb)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、

d. 上記のa)またはb)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列；および

e. 上記のa)またはb)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。

【0039】

本発明はさらに、

a. 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33または配列番号35に開示されたポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド配列、

b. 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に開示されたポリペプチド配列、

c. 上記のa)またはb)のポリペプチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチド配列、

からなる群より選択される単離されたポリペプチドを提供する。

【0040】

本発明はまた、脂質代謝タンパク質(LMP)、またはその一部をコードするシロイヌナズ

10

20

30

40

50

ナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギから単離された核酸も提供する。これらの配列を用いて、例えば、オレイン酸のレベルを1重量%、2.5重量%、5重量%、7.5重量%、10重量%、12.5重量%、15重量%、17.5重量%、20重量%、22.5重量%、25重量%またはそれ以上増加させることにより、微生物および植物中の脂質および脂肪酸、コファクターおよび酵素を改変したり、または増加させたりすることができる。

【0041】

シロイヌナズナ植物は、リノール酸およびリノレン酸(例えば、表2を参照)などの脂肪酸を多量に産生すること、および油料作物植物であるアブラナ属(Brassica)に対する多くの態様(遺伝子相同性など)でのそれらの密接な類似性が知られている。従って、シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギなどの植物または近縁の生物に由来する核酸分子が、宿主、特に、微生物および植物における脂質および脂肪酸代謝を改変するのに特に好適である。さらに、シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギ植物または近縁の生物に由来する核酸を用いて、対応する生物における脂肪酸の前駆体分子の生合成を改変するのに有用である、他の種におけるこれらのDNA配列および酵素を同定することができる。

【0042】

本発明はさらに、LMP、またはその一部をコードする植物(シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギ)由来の核酸の少なくとも15ヌクレオチドの断片を含む単離核酸を提供する。

【0043】

本発明は、前記核酸によりコードされるポリペプチド、および前記核酸によりコードされるポリペプチドを含む異種ポリペプチド、およびこれらのポリペプチドに対する抗体も提供する。

【0044】

さらに、本発明は、種子貯蔵化合物のレベルまたは組成が改変されたトランスジェニック植物の作製におけるLMP核酸の使用に関するものであり、これを提供する。変化した組成に関して、本発明を用いて、例えば、リノール酸またはリノール酸などの他の植物油と比較して、オレイン酸の比率を、例えば、1重量%、2.5重量%、5重量%、7.5重量%、10重量%、12.5重量%、15重量%、17.5重量%、20重量%、22.5重量%、25重量%またはそれ以上増加させることができる。種子貯蔵化合物のレベルまたは組成が改変されたトランスジェニック植物を作製する方法は、LMP核酸を含む発現ベクターを用いて植物細胞を形質転換する工程、および該植物細胞から、種子貯蔵化合物のレベルまたは組成が改変された植物を生成させる工程を含む。好ましい実施形態においては、前記植物は、例えば、カノーラ、亜麻仁、ダイズ、ヒマワリ、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コムギ、イネ、コショウ、マンジュギク、ワタ、アブラヤシ、ココヤシ、アマ、トウゴマおよびラッカセイからなる群より選択される油産生種である。

【0045】

本発明に従えば、トランスジェニック植物におけるLMP核酸の発現を増加または減少させることを含む、本明細書に記載の組成物および方法を用いて、トランスジェニック植物におけるLMPの組成を変化させ、該植物におけるLMPのレベルを増加または減少させることができる。LMP核酸の発現の増加または減少を、LMP核酸のトランスジェニック過剰発現、コサプレッション手法、アンチセンス手法およびin vivo突然変異誘発によって達成することができる。本発明を用いて、種子油中の脂質のレベルを1重量%、2.5重量%、5重量%、7.5重量%、10重量%、12.5重量%、15重量%、17.5重量%、20重量%、22.5重量%、25重量%もしくはそれ以上増加もしくは減少させるか、種子油中の脂肪酸のレベルを1重量%、2.5重量%、5重量%、7.5重量%、10重量%、12.5重量%、15重量%、17.5重量%、20重量%、22.5重量%、25重量%もしくはそれ以上増加もしくは減少させるか、または種子もしくは植物中のデンプンのレベルを1重量%、2.5重量%、5重量%、7.5重量%、10重量%、12.5重量%、15重量%、17.5重量%、20重量%、22.5重量%、25重量%もしくはそれ以上増加もしくは減少させることができる。

【 0 0 4 6 】

マイクロRNA(miRNA)は、植物および動物における遺伝子発現の、進化的に保存された、RNAに基づく調節因子として明らかになってきた。miRNA(約21~25ヌクレオチド)は、非タンパク質コード遺伝子から転写されるステムループ構造を有するより大きい前駆体から生じる。miRNAは特定のmRNAを標的として、転写後レベル(すなわち、mRNAを分解する)または翻訳レベル(すなわち、タンパク質合成を阻害する)で遺伝子発現を抑制する(Bartel D 2004, Cell 116, 281-297)。

【 0 0 4 7 】

miRNA前駆体(プレmiRNA)は、プレmiRNAによりコードされる内因性miRNAがmiRNAにより置換されて目的の遺伝子、例えば、dsRedリポーター遺伝子を標的とするように、遺伝子操作することができる。

10

【 0 0 4 8 】

本発明はさらに、野生型と比較してオレイン酸のレベルが増加したトランスジェニック植物を作製する方法であって、

- a. RNA前駆体構築物を用いて植物細胞を形質転換する第1工程、および
- b. 該植物細胞からトランスジェニック植物を生成させる第2工程、

を含み、

ここで該構築物は、前駆体マイクロRNA配列をコードするヌクレオチド配列に機能し得るように連結された、植物細胞中での発現を駆動するプロモーターを含み、該マイクロRNA前駆体配列をコードするヌクレオチド配列が、

20

- a. 配列番号47に示されるヌクレオチド配列、
- b. 上記のa)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、
- c. 上記のa)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列、および
- d. 上記のa)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、

からなる群より選択される、前記方法を提供する。

【 0 0 4 9 】

脂肪酸デサチュラーゼをコードするトウモロコシ遺伝子は、種子などの多くの組織中で発現される。mRNA中のトウモロコシデサチュラーゼコード領域または5'UTRおよび3'UTRに相補的な19~21ヌクレオチド(例えば、配列番号40に示されたACCAGACCCCGAACGCCGC)を用いて、Zm miR166前駆体中の配列番号37および配列番号38に示されるZm miR166 (5' tcgga ccaggcttcattcccc 3')を置換することができる。次いで、トランスジーンをトウモロコシ中に形質転換することができる。遺伝子操作されたZm miR166遺伝子の発現を、トウモロコシの種子特異的プロモーター(例えば、内胚乳特異的10 kD ゼイン(Zein)プロモーターまたはGlob1胚特異的プロモーター)により制御することができる。

30

【 0 0 5 0 】

マイクロRNA(例えば、配列番号40に記載のACCAGACCCCGAACGCCGC)は、一般的には、遺伝子操作されたZm miR166前駆体が処理される際、種子中で生成される。このmiRNAは、該miRNAと相補的なトウモロコシ脂肪酸デサチュラーゼmRNA中の領域に特異的に結合することができ、それは、遺伝子サイレンシング機構により、この標的化されたトウモロコシ・デサチュラーゼ発現の種子中での転写または翻訳レベルでの減少をもたらし得る。結果として、トランスジェニック植物、好ましくはトウモロコシは、例えば、種子中で低い重量%のリノレン酸および/または中程度もしくは高い重量%のオレイン酸のような、望ましい脂肪酸レベルおよび組成を有することができた。

40

【 0 0 5 1 】

本発明はさらに、野生型と比較してオレイン酸のレベルが増加したトランスジェニック植物を作製することにより、脂肪酸デサチュラーゼの発現、特に、FAD2オルソログによりコードされるもの、さらに好ましくは付属書Aに示される核酸によりコードされるもの、その好ましい実施形態では配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番

50

号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33または配列番号35に示される核酸によりコードされるもの、の発現を変化させ、好ましくは減少させる方法であって、

- a. 植物細胞をRNA前駆体構築物を用いて形質転換する第1工程、および
- b. 該植物細胞からトランスジェニック植物を生成させる第2工程、

を含み、

ここで該構築物は、前駆体マイクロRNA配列をコードするヌクレオチド配列に機能し得るように連結された、植物細胞中での発現を駆動するプロモーターを含み、かつ、該マイクロRNA前駆体配列をコードするヌクレオチド配列が、

- a. 配列番号47に示されるヌクレオチド配列、
- b. 上記のa)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、
- c. 上記のa)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列、および
- d. 上記のa)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、

からなる群より選択される、前記方法を提供する。

【0052】

好ましい実施形態においては、前駆体マイクロRNA配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号37に示されるマイクロRNAをコードするヌクレオチド配列が、配列番号40に示されるマイクロRNAをコードするヌクレオチド配列で置換されるように遺伝子操作したものである。

【0053】

遺伝子の発現をモジュレートするための遺伝子操作されたマイクロRNA前駆体およびマイクロRNAの使用はよく知られており、例えば、米国特許第2004/0268441号(その全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載されている。遺伝子操作されたマイクロRNA前駆体を用いて、1つまたは数個の標的遺伝子、例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33または配列番号35に示されたヌクレオチド配列のうちの1、2、3、4または5つの発現をモジュレートすることができる。遺伝子の発現をモジュレートするための遺伝子操作されたマイクロRNA前駆体およびマイクロRNAの使用は、当業者にはよく知られた遺伝子操作の他の方法と組み合わせることができる。

【0054】

前記プロモーターは、普遍的なものであってもよいし、または種子特異的および内胚乳特異的などの組織特異的なものであってもよい。このプロモーターは、種子特異的プロモーターであるのが好ましい。この方法を用いて、種子中のオレイン酸のレベルを効率的に、例えば、1重量%、2.5重量%、5重量%、7.5重量%、10重量%、12.5重量%、15重量%、17.5重量%、20重量%、22.5重量%、25重量%またはそれ以上、増加させることができる。

【0055】

遺伝子の発現をモジュレートするための遺伝子操作されたマイクロRNA前駆体およびマイクロRNAの使用は、全ての植物、特に、本明細書に記載の植物に、好ましい実施形態においては、単子葉植物に、およびより好ましい実施形態においてはトウモロコシに、適用することができる。

【0056】

本発明のさらなる課題は、

- a. 配列番号47に示されるヌクレオチド配列、
- b. 上記のa)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、
- c. 上記のa)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列、
- d. 上記のa)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸である。

【0057】

このヌクレオチド配列を用いて、目的の遺伝子の発現をモジュレートし、特に、標的遺伝子の発現、特に、上記のヌクレオチド配列の発現を下方調節することができる。

【0058】

本発明のさらなる課題は、

- a. 配列番号47に示されるヌクレオチド配列、
- b. 上記のa)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、
- c. 上記のa)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列、および
- d. 上記のa)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列によりコードされるマイクロRNA前駆体である。

【0059】

本発明のさらなる課題は、配列番号40に示されるマイクロRNAである。

【0060】

より具体的には、本発明は、機能し得るように連結された構成要素として、プロモーターおよびFAD2様mRNAまたはFAD2様タンパク質のレベルをモジュレートすることができる核酸配列を含む核酸構築物を用いて植物を形質転換すること、ならびに該植物を成長させることを含む、種子中の総油含量を増加させるための方法を含み、これを提供する。さらに、本発明は、機能し得るように連結された構成要素として、プロモーター、オレイン酸のレベルを増加させることができる構造核酸配列を含む核酸構築物を用いて植物を形質転換すること、および該植物を成長させることを含む、種子中のオレイン酸のレベルを増加させる方法を含み、これを提供する。

【0061】

また、LMP DNA配列により形質転換されたトランスジェニック植物により生産される種子も本発明に含まれるが、ここで、該種子はLMP DNA配列を含み、該植物は種子貯蔵化合物の改変されたレベルについて固定されている。本発明はさらに、上記の種子により産生された種子油を含む。

【0062】

本発明はさらに、前記核酸を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、ならびに該核酸および/またはベクターを用いて植物細胞を形質転換することにより作製された子孫植物材料を提供する。

【0063】

本発明に従えば、本明細書に記載の化合物、組成物、および方法を用いて、例えば、1重量%、2.5重量%、5重量%、7.5重量%、10重量%、12.5重量%、15重量%、17.5重量%、20重量%、22.5重量%、25重量%もしくはそれ以上、種子油中の脂質の相対比率を増加または減少させ、種子油中の脂質のレベルを増加または減少させ、または種子油中の脂肪酸のレベルを増加または減少させ、または種子もしくは植物中のデンプンもしくは他の炭水化物のレベルを増加または減少させ、または種子もしくは植物中のタンパク質のレベルを増加または減少させることができる。本明細書に記載の操作を用いて、種子の発芽ならびに若い実生および植物の成長を改善し、種子貯蔵化合物の植物収量を増大させることもできる。

【0064】

さらに、トランスジェニック植物中のシロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギに由来するLMP核酸を発現するトランスジェニック植物中で正常または通常のレベルよりも高いかまたは低いレベルの貯蔵化合物を産生させる方法であって、該トランスジェニック植物が、シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギ、コムギ、ヒマワリまたはサトウダイコンであるか、あるいはシロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、トウモロコシ、アマ、オオムギ、イネもしくはコムギとは異なる生物種である、前記方法も提供される。また、種子貯蔵化合物の

産生効率の改変のための組成物および方法も含まれる。本明細書で用いられるように、語句「シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギ、コムギ、ヒマワリまたはサトウダイコン」を用いる場合、これはシロイヌナズナおよび／またはアブラナおよび／またはダイズおよび／またはイネおよび／またはトウモロコシおよび／またはアマおよび／またはオオムギおよび／またはコムギおよび／またはヒマワリおよび／またはサトウダイコンをも意味する。

【0065】

従って、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギに由来する新規な単離されたLMP核酸および単離されたLMPアミノ酸配列ならびにその活性を有する断片、類似体、およびオルソログを提供することは、本発明の課題である。これらの活性を有する断片、類似体、およびオルソログはまた、異なる植物種に由来するものであってもよく、これは、当業者であれば、他の植物種もこれらの核酸または関連する核酸を含むであろうことを理解できるからである。

10

【0066】

本発明の別の課題は、種子貯蔵化合物のレベルが改変された、そして特に、脂質、脂肪酸または糖のレベルが改変された、トランスジェニック植物を提供することである。

【0067】

そのアゴニストおよび／または断片を始めとする本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドはまた、植物成長、および潜在的には、植物収量をモジュレートすること、好ましくは、不都合な条件下(乾燥、低温、光、UV)での植物成長を増加させることを含む使用も有する。さらに、本発明のアンタゴニストは、好ましくは、植物成長および収量を増加させることにより、植物成長および／または収量をモジュレートすることを含む使用も有し得る。さらに別の実施形態においては、構成的プロモーターを用いる本発明の過剰発現ポリペプチドは、光利用効率をモジュレートすることにより、ストレス条件(乾燥、光、低温、UV)下で植物収量を増加させるのに有用であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、種子の発芽および種子の休眠を改善し、従って、植物成長および／または種子貯蔵化合物の収量を改善するであろう。

20

【0068】

本発明の単離された核酸分子はさらに、機能し得るように連結されたプロモーターまたは部分的なプロモーター領域を含んでもよい。このプロモーターは構成的プロモーター、誘導性プロモーターまたは組織特異的プロモーターであってよい。構成的プロモーターは、例えば、スーパープロモーターであってよい(Niら、Plant J. 7:661-676, 1995; US595 5646)。組織特異的プロモーターは栄養組織または生殖組織において活性であってよい。生殖組織において活性である組織特異的プロモーターは種子特異的プロモーターでありうる。栄養組織において活性である組織特異的プロモーターは、根特異的、シュート特異的、分裂組織特異的または葉特異的プロモーターであってよい。本発明の単離された核酸分子はさらに、5'非翻訳配列、3'非翻訳配列、イントロン、またはそれらの組合せをなお含んでもよい。

30

【0069】

本発明はまた、LMP、またはその一部をコードするシロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギに由来する単離された核酸を発現する植物の1つ以上の植物器官の数および／または大きさを増加させる方法も提供する。より具体的には、種子の大きさおよび／または種子の数および／または重量を操作することができる。

40

【0070】

本発明のさらなる課題は、そのような上記のトランスジェニック植物を作製する方法を提供することである。

【0071】

本発明の別の課題は、そのような上記のトランスジェニック植物に由来する種子および種子油を提供することである。

50

【0072】

本発明のこれらのおよび他の課題、特徴および利点は、以下の開示された実施形態の詳細な説明および添付の特許請求の範囲の精査後に明らかになるであろう。

【0073】

図面の簡単な説明

本発明は、以下の詳細な説明および添付の図面および本出願の一部を構成する配列表からより十分に理解することができる。

【0074】

(図面の簡単な説明については別節参照)

一般的な定義

本発明は、記載されている特定の方法、プロトコル、細胞系、植物の種または属、構築物、および試薬それ自体には限定されないことは理解されるべきである。また、本明細書で用いられる用語は、特定の実施形態のみを記載する目的のためのものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられるように、単数形の「a」、「and」および「the」は、本文が明確に口述しない限り、複数に言及することを含むことに留意しなければならない。かくして、例えば、「ベクター(a vector)」に対する言及は、1つまたはそれ以上のベクターに対する言及であり、当業者に公知のその等価物などを含む。

【0075】

本明細書で用いられる用語「約」は、約、ほぼ、その前後、またはその辺りを意味する。用語「約」を数値範囲と組み合わせて用いる場合、それは記載の数値の上および下の境界を拡張することによりその範囲を改変する。一般的には、用語「約」は、記述された値より上および下の数値を、20%、好ましくは10%、より好ましくは5%上または下(高いまたは低い)の差異で変更するために、本明細書で用いられる。

【0076】

本明細書で用いられる単語「または」は、特定の羅列のうちの任意の1つのメンバーを意味し、その羅列のうちのメンバーの任意の組合せをも含む。

【0077】

本明細書で用いられる用語「アミノ酸配列」は、アミノ酸残基を表す省略形、文字、符号または単語の羅列を指す。アミノ酸は、本明細書においては、一般的に知られる三文字表記またはIUPAC-IUB生化学命名委員会(Biochemical Nomenclature Commission)により推奨される一文字表記のいずれかにより言及する。同様に、ヌクレオチドは、それらの一般に認められている一文字記号により言及する。本明細書で用いられる省略形はアミノ酸についての標準一文字記号：A、アラニン；B、アスパラギンもしくはアスパラギン酸；C、システイン；D、アスパラギン酸；E、グルタメート、グルタミン酸；F、フェニルアラニン；G、グリシン；H、ヒスチジン；I、イソロイシン；K、リジン；L、ロイシン；M、メチオニン；N、アスパラギン；P、プロリン；Q、グルタミン；R、アルギニン；S、セリン；T、トレオニン；V、バリン；W、トリプトファン；Y、チロシン；Z、グルタミンもしくはグルタミン酸(L. Stryer, Biochemistry, 1988, W. H. Freeman and Company, New Yorkを参照)である。本明細書でアミノ酸配列内に用いる文字「X」は、任意のアミノ酸残基を表すことができる。

【0078】

用語「核酸」は、一本鎖もしくは二本鎖のセンスまたはアンチセンス形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそのポリマーまたはハイブリッドを指す。

【0079】

本明細書で用いられる語句「核酸配列」は、ヌクレオチドを表す省略形、文字、符号または単語の連続的な羅列を指す。一実施形態においては、核酸は、通常は100ヌクレオチド未満の長さの比較的短い核酸である「プローブ」であってよい。プローブ核酸は約50ヌクレオチド長から約10ヌクレオチド長であることが多い。核酸の「標的領域」は、目的の

ものと同一である、核酸の一部である。核酸の「コード領域」は、好適な調節配列の制御下に置かれた場合には配列特異的な様式で転写および翻訳されて特定のポリペプチドまたはタンパク質を産生する、該核酸の一部である。コード領域はそのようなポリペプチドまたはタンパク質をコードすると言われる。特に指摘しない限り、特定の核酸配列はまた、明記された配列だけでなく、保存的に改変されたその変異体(例えば、縮重コドン置換)および相補配列をも默示的に包含する。用語「核酸」は、本明細書においては、「遺伝子」、「cDNA」、「mRNA」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」と互換的に用いられる。

【0080】

本明細書で用いられる用語「相補的」または「相補性」は、塩基対形成規則により関連付けられるヌクレオチド配列を参照して用いられる。例えば、配列5'-AGT-3'は、配列5'-ACT-3'に相補的である。相補性は「部分的」であっても「全体的」であってもよい。「部分的」相補性は、1個またはそれ以上の核酸塩基が塩基対形成規則に従って適合しない場合である。核酸間の「全体的」または「完全」相補性は、各々および全ての核酸塩基が塩基対形成規則の下で別の塩基に適合する場合である。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対し大きな影響を及ぼす。本明細書で用いられる核酸配列の「相補体」は、その核酸が該核酸配列の核酸に対して全体的相補性を示すヌクレオチド配列を指す。

【0081】

用語「ゲノム」または「ゲノムDNA」は、宿主生物の遺伝性の遺伝的情報を指す。前記ゲノムDNAは、核のDNA(染色体DNAとも呼ばれる)だけでなく、プラスチド(例えば、クロロプラスチ)のDNAおよび他の細胞内小器官(例えば、ミトコンドリア)のDNAも含む。好ましくは、用語「ゲノム」または「ゲノムDNA」は、核の染色体DNAを指す。

【0082】

用語「染色体DNA」または「染色体DNA配列」は、細胞周期状態とは独立した細胞核のゲノムDNAとして理解されるべきである。従って、染色体DNAは、染色体または染色分体に組織化されていてもよく、これらは凝縮されていてもよいし、または非コイル状であってもよい。染色体DNA中への挿入を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析、サザンブロット分析、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、およびin situ PCRなどの当技術分野で公知の種々の方法により証明および分析することができる。

【0083】

用語「野生型」、「天然」または「天然起源」は、生物、ポリペプチド、または核酸配列に関して、該生物が天然のものであるか、または、変化したり、突然変異したり、さもなければ人間により操作されていない少なくとも1つの天然の生物中で利用可能であることを意味する。

【0084】

用語「異種核酸配列」または「異種DNA」は、それが天然では連結されていないか、もしくは天然では異なる位置で連結されている核酸配列に、連結されるか、または連結されるようになるように操作されるヌクレオチド配列を指すように互換的に用いられる。異種DNAは、それが導入される細胞に対して内因性ではなく、別の細胞から得られたものである。一般的には、必須ではないが、そのような異種DNAは、それが発現される細胞により通常は産生されないRNAおよびタンパク質をコードする。プロモーター、転写調節配列または他の遺伝的エレメントは、2つの配列がそれらの天然の環境では一緒に存在しないか、または機能し得る形ではなく連結されている場合には、その他方の配列(例えば、マーカ配列もしくは農学的に関連する形質をコードする)に対して「異種」であると考えられる。好ましくは、前記配列はそれらの天然の環境で機能し得る形で連結されていない(すなわち、異なる遺伝子に由来する)。前記調節配列は、その天然の環境で隣接していない核酸に対し共有結合し、隣接しているのが最も好ましい。

【0085】

本明細書で用いられる用語「トランスジーン」は、細胞のゲノム中に導入されるか、ま

10

20

30

40

50

たは人間による実験的操作により操作された任意の核酸配列を指す。好ましくは、前記配列は天然の生物とは異なるゲノムをもたらすものである(例えば、前記生物にとって内因性である場合、前記配列はその天然の位置とは異なる位置に導入されるか、またはそのコピー数が増加もしくは減少する)。トランスジーンは「内因性DNA配列」、「外因性DNA配列」(例えば、外来遺伝子)、または「異種DNA配列」であってよい。用語「内因性DNA配列」は、それが天然の配列と比較して何らかの改変(例えば、点突然変異、選択マーカー遺伝子の存在など)を含まない限り、それが導入される細胞中に天然で認められるヌクレオチド配列を指す。

【0086】

細胞または生物(例えば、オオムギ植物もしくは植物細胞に関して)について用いられる場合の用語「トランスジェニック」または「組換え」とは、トランスジーンを含むか、もしくはそのゲノムがトランスジーンの導入により変化している細胞または生物を指す。トランスジェニック生物または組織は1個以上のトランスジェニック細胞を含む。好ましくは、前記生物または組織は、実質的にトランスジェニック細胞からなる(すなわち、前記生物または組織中の細胞の80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上がトランスジェニックである)。

【0087】

「組換えポリペプチド」は、少なくとも1個のアミノ酸残基について、天然のポリペプチドとは配列において異なっている非天然のポリペプチドである。前記組換えポリペプチドおよび/または核酸を製造する好ましい方法は、部位特異的または部位非特異的突然変異誘発、DNAシャッフリングまたは反復組換え(recursive recombination)の他の方法を含んでもよい。

【0088】

用語「等価」は、目的のハイブリダイゼーション条件に関連するのと同様にハイブリダイゼーション条件に関して用いられる場合、該ハイブリダイゼーション条件および目的のハイブリダイゼーション条件が同範囲の相同性(%)を有する核酸配列のハイブリダイゼーションをもたらすことを意味する。例えば、目的のハイブリダイゼーション条件が、第1の核酸配列と、第1の核酸配列に対して80~90%の相同性を有する他の核酸配列とのハイブリダイゼーションをもたらす場合、別のハイブリダイゼーション条件は、この別のハイブリダイゼーション条件も、第1の核酸配列と、第1の核酸配列に対して80~90%の相同性を有する他の核酸配列とのハイブリダイゼーションをもたらす場合には、その目的のハイブリダイゼーション条件と等価であると言われる。

【0089】

本発明の目的にとって好ましい実施形態においては、別に定義しない限り、2つの核酸またはポリペプチド配列間の配列同一性%を、Vector NTI 7.0(PC)ソフトウェアパッケージ(Informax, 7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814)を用いて決定する。2つの核酸の同一性%を決定するには、ギャップ開始ペナルティとして15およびギャップ伸長ペナルティとして6.66を用いるのが好ましい。2つのポリペプチドの同一性%を決定するには、ギャップ開始ペナルティとして10およびギャップ伸長ペナルティとして0.1を用いるのが好ましい。他のパラメーターは全てデフォルト設定に設定するのが好ましい。多重アライメント(Clustal Wアルゴリズム)のためには、好ましい実施形態においては、blosom62マトリックスを用いる場合、ギャップ開始ペナルティは10であり、ギャップ伸長ペナルティは0.05である。配列同一性を決定する目的では、DNA配列をRNA配列と比較する場合、チミジンヌクレオチド配列はウラシルヌクレオチドと等価であることは理解されよう。

【0090】

核酸ハイブリダイゼーションに関して用いる場合、当技術分野では、多くの等価な条件を用いて、低または高ストリンジェンシー条件を含めることができること;プローブの長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成)、および標的の性質(DNA、RNA、塩基組成、溶液中存在するかまたは固定されているかなど)、ならびに塩および他の成分(例えば、ホルムアミド、硫酸デキストラン、ポリエチレングリコールの存在もしくは非存在)の濃度などの因

10

20

30

40

50

子を考慮し、ハイブリダイゼーション溶液を変化させて、上記で挙げた条件とは異なるが等価である低または高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を生じることができることはよく知られている。当業者であれば、非特異的結合を減少または排除するには、より高ストリンジェンシーが好ましいが、様々な相同性を有するより多数の核酸配列を検出するには、より低ストリンジェンシーが好ましいであろうことを理解している。

【0091】

用語「遺伝子」とは、何らかの様式でポリペプチドの発現を調節することができる好適な調節配列に機能し得るように連結されたコード領域を指す。遺伝子は、コード領域(オープンリーディングフレーム、ORF)の前(上流)および後(下流)のDNAの非翻訳調節領域(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサーなど)、ならびに、必要に応じて、個々のコード領域(すなわち、エクソン)の間の介在配列(すなわち、イントロン)を含む。本明細書で用いられる用語「構造遺伝子」は、mRNAに転写された後、特定のポリペプチドに特有のアミノ酸配列に翻訳されるDNA配列を意味することが意図される。

10

【0092】

本明細書で用いられる用語「コード領域」は、構造遺伝子に関して用いられる場合、mRNA分子の翻訳の結果として新生ポリペプチド中に認められるアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を指す。コード領域は、真核生物においては、5'側は開始メチオニンをコードするヌクレオチドトリプレット「ATG」により、また3'側は停止コドンで規定する3種のトリプレット(すなわち、TAA、TAG、TGA)のうちの1つにより境界付けられる。イントロンを含有することに加えて、ゲノム形態の遺伝子はまた、RNA転写物上に存在する配列の5'および3'末端の両方に位置する配列も含みうる。これらの配列を、「フランキング」配列または領域と呼ぶ(これらのフランキング配列はmRNA転写物上に存在する非翻訳配列に対して5'または3'側に位置する)。5'フランキング領域は、遺伝子の転写を制御するか、またはこれに影響を及ぼすプロモーターおよびエンハンサーなどの調節配列を含んでもよい。3'フランキング領域は、転写の終結、転写後切断およびポリアデニル化を指令する配列を含んでもよい。

20

【0093】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、「オリゴペプチド」、「ポリペプチド」、「遺伝子産物」、「発現産物」および「タンパク質」は、連続的アミノ酸残基のポリマーまたはオリゴマーを指すように本明細書では互換的に用いられる。

30

【0094】

本明細書で用いられる用語「単離された」とは、物質がその元の環境から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物中に存在する天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然の系に共存する物質の一部もしくは全てから分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されている。そのようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であってもよく、および/またはそのようなポリヌクレオチドもしくはポリペプチドは組成物の一部であってもよく、またそのようなベクターもしくは組成物がその元の環境の一部でない点で単離されたものであってもよい。

【0095】

用語「遺伝的に改変された生物」または「GMO」とは、トランスジーンDNAを含む任意の生物を指す。生物の例としては、植物、動物および微生物が挙げられる。

40

【0096】

本明細書で用いられる用語「細胞(cell)」または「植物細胞(plant cell)」は、単独の細胞を指す。用語「細胞(cells)」は細胞の集団を指す。この集団は、1つの細胞型を含む純粋な集団であってよい。同様に、この集団は2つ以上の細胞型を含んでもよい。本発明においては、細胞集団が含みうる細胞型の数に制限はない。細胞は同調していても、同調していなくてもよい。本発明の意図において植物細胞は、単離されたものであってもよい(例えば、懸濁培養状態)、または植物組織、植物器官もしくは任意の発達段階の植物に含まれていてもよい。

【0097】

50

植物に関する用語「器官」(または「植物器官」)は、植物の一部を意味し、また、例えば(限定されるものではないが)、根、実、シュート、茎、葉、葯、萼片、花弁、花粉、種子などが挙げられる。

【0098】

植物に関する用語「組織」(または「植物組織」)は、分化した、および未分化の植物の組織を含む複数種の植物細胞の配置を意味する。植物組織は、植物器官の一部(例えば、植物の葉の表皮)を構成するものでありうるが、また腫瘍組織(例えば、カルス組織)および培養状態の様々な型の細胞(例えば、単独の細胞、プロトプラスト、胚、カルス、プロトコーム様体など)を構成するものでもよい。植物組織は、in planta系、器官培養系、組織培養物、または細胞培養物であってよい。

10

【0099】

本明細書で用いられる用語「植物」とは、植物の発達のいずれかの段階で存在する構造におおむね分化している複数の植物細胞を指す。そのような構造としては、限定されるものではないが、実、シュート、茎、葉、花弁などの1種以上の植物器官が挙げられる。

【0100】

用語「染色体DNA」または「染色体DNA配列」は、細胞周期状態とは独立した細胞核のゲノムDNAとして理解されるべきである。従って、染色体DNAは染色体または染色分体に組織化されていてもよく、これらは凝縮されていてもよいし、または非コイル状であってもよい。染色体DNAへの挿入を、当技術分野で公知の様々な方法、例えば、PCR分析、サザンブロット分析、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、およびin situ PCRにより証明および分析することができる。

20

【0101】

本明細書で用いられる用語「構造遺伝子」は、mRNAに転写された後、特定のポリペプチドに特有のアミノ酸配列に翻訳されるDNA配列を意味することが意図される。

【0102】

用語「発現」とは、遺伝子産物の生合成を指す。例えば、構造遺伝子の場合、発現は、該構造遺伝子のmRNAへの転写、および、必要に応じて、mRNAの1種以上のポリペプチドへのその後の翻訳を伴う。

【0103】

本明細書で用いられる用語「発現カセット」または「発現構築物」は、機能し得る形で連結させた、プロモーター配列、および必要に応じて、核酸配列の発現を容易にする追加のエレメント(例えば、ターミネーターおよび/またはポリアダニル化配列など)と、発現させようとする任意の核酸配列との組合せを意味することが意図される。

30

【0104】

本明細書で用いられる「プロモーター」、「プロモーターエレメント」または「プロモーター配列」とは、転写の開始を指令する(すなわち、ヌクレオチド配列のmRNAへの転写を制御することができる)、ヌクレオチド配列の5'末端に位置するヌクレオチド配列を指す。プロモーターは、典型的には、必須ではないが、mRNAへの転写を制御し、RNAポリメラーゼによる特異的結合部位および転写の開始のための他の転写因子を提供する目的のヌクレオチド配列の5'側(すなわち、上流)に位置する(例えば、構造遺伝子の転写開始部位に近接する)。プロモーター配列は、下流の遺伝子の発現を駆動するのに必要であるが、それだけで常に十分というわけではない。一般的には、真核プロモーターは、慣例により+1と番号付けされる転写開始(キャップ)部位よりも約10~30 bp 5'側のコンセンサス5'-TATAA T-3' (TATA)ボックスに相同な特徴的なDNA配列を含む。キャップ部位の3'側の塩基は正の数を与えられるが、キャップ部位の5'側の塩基は負の数を与えられ、それはキャップ部位からのそれらの距離を反映する。別のプロモーター成分であるCAATボックスは、TATAボックスの約30~70 bp 5'側に認められることが多く、標準形態5'-CCAAT-3'(Breathnach 1981)に対する相同性を有する。植物においては、CAATボックスは、トリプレットG(またはT)NGに対称的にフランキングするアデニン残基を有する領域であるAGGAボックスとして知られる配列により置換されていることがある(Messing 1983)。転写に調節的な影響もたらす

40

50

他の配列は、プロモーター領域内に認められ、キャップ部位から1000 bp以上5'側に伸びている。プロモーターに関して用いられる場合、用語「構成的」は、プロモーターが、刺激(例えば、熱ショック、化学物質、光など)の非存在下で、機能し得るように連結された核酸配列の転写を指令することができることを意味する。通常は、構成的プロモーターは、実質的にいかなる細胞およびいかなる組織中でもトランスジーンの発現を指令することができる。

【0105】

調節制御とは、そこだけではないが、主として転写開始部位の上流(5'側)に位置するDNA配列エレメントにより誘導される、遺伝子発現のモジュレーションを指す。調節は、環境刺激に対する全か無かの応答をもたらしてもよいし、または遺伝子発現レベルの変化をもたらしてもよい。本発明においては、熱ショック調節エレメントは、突然の温度上昇に

10

【0106】

ポリアデニル化シグナルとは、通常は、mRNA前駆体の3'末端にポリアデニル酸区域を付加することを特徴とする、mRNAプロセッシングをもたらすことができる任意の核酸配列を指す。ポリアデニル化シグナルDNAセグメントは、それ自身、いくつかの起源から誘導されたセグメントの複合物であってもよく、天然のものまたは合成のものであってもよく、またゲノムDNAまたはRNA由来cDNAに由来するものであってもよい。ポリアデニル化シグナルは、一般的には、標準形態の5'-AATAA-3'に対する相同性の存在により認識されるが、距離の変動、部分的な「読み過ごし」、および複数のタンデム標準配列も珍しくない(Messing 1983)。標準的な「ポリアデニル化シグナル」は、実際、転写終結を引き起こすが、ポリアデニル化自体を引き起こさないことは認識されるべきである(Montell 1983)。

20

【0107】

熱ショックエレメントは、突然の温度上昇ストレスに応答して遺伝子発現を調節するDNA配列を指す。この応答は、下流遺伝子の発現のレベルにおける一過性であるが即時の増強として認められる。熱ショック遺伝子に対する最初の研究は、ショウジョウバエ(*Drosophila*)を用いて行われたが、植物などの多くの他の種(Barnett 1980)がストレスに対する類似する応答を示した。熱ショックエレメントの必須の主成分は、コンセンサス配列5'-CTGGAATNTTCTAGA-3'(式中、N=A、T、CまたはGである)を有し、転写開始部位の上流の残基-66~-47 bpの間の領域に位置することがショウジョウバエにおいて記載された(Pelham 1982)。このコンセンサス配列の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドコピーは、熱ショック誘導性の付与において天然の配列を置換することができる。

30

【0108】

リーダー配列とは、転写開始部位と翻訳開始部位の間に位置する約100ヌクレオチドを含むDNA配列を指す。リーダー配列内で具体化されるのは、リボソーム結合部位を特定する領域である。

【0109】

イントロンまたは介在配列とは、本研究においては、コード配列(エクソン)と共に転写されるが、その後成熟mRNAの形成時に除去されるDNA配列の領域を指す。イントロンは、転写された配列内の任意の部位、すなわち、同じかもしくは異なる遺伝子のコード配列間、そのアミノ酸配列を中断し分割するような遺伝子のコード配列内、およびプロモーター領域(翻訳開始部位の5'側)内にあってよい。一次転写物中のイントロンは切り出され、そのコード配列は同時におよび正確に連結されて成熟mRNAを形成する。イントロンとエクソンの結合部はスプライス部位を形成する。イントロンの塩基配列はGUで始まり、AGで終わる。同じスプライシングシグナルが多く的高等真核生物中に認められる。

40

【0110】

用語「機能し得る連結」または「機能し得るように連結された」とは、例えば、調節エレメント(例えば、プロモーター)、発現させようとする核酸配列、そして必要に応じてさらなる調節エレメント(例えば、ターミネーターなど)を、該調節エレメントのそれぞれが、該核酸配列の発現を可能にし、改変し、促進するか、またはさもないければそれに影響を

50

及ぼすその意図された機能を果たすことができるように、連続的に配置したものを意味するものとして理解されるべきである。その発現はセンスまたはアンチセンスRNAに関連して核酸配列の配置に応じて生じうる。この目的のために、化学的な意味での直接的連結は必ずしも必要であるわけではない。例えば、エンハンサー配列などの遺伝子制御配列は、他のDNA分子からさらに離れた位置から標的配列に対してその機能を発揮することもでき、また実際に発揮している。好ましい配置は、組換え的に発現させようとする核酸配列がプロモーターとして作用する配列の後ろに位置するものであり、その2つの配列が互いに共有結合されているものである。プロモーター配列と、組換え的に発現させようとする核酸配列との間の距離は、200塩基対未満であるのが好ましく、特に好ましくは100塩基対未満であり、特に非常に好ましくは、50塩基対未満である。機能し得る連結、および発現カセットは、記載されているような慣用的な組換え技術およびクローニング技術(例えば、Maniatis 1989; Sihavy 1984; Ausubel 1987; Gelvin 1990)を用いて生成することができる。しかしながら、例えば、制限酵素の特異的切断部位を有するリンカーとして、またはシグナルペプチドとして作用するさらなる配列を、その2つの配列の間に配置することもできる。配列の挿入はまた、融合タンパク質の発現をもたらす。好ましくは、プロモーターと、発現させようとする核酸配列との連結からなる発現カセットは、ベクターに組込まれた形態で存在していてもよく、例えば、形質転換により、それを植物のゲノム中に挿入することもできる。

10

【0111】

本明細書で用いられる用語「形質転換」は、細胞中への遺伝物質(例えば、トランスジェーン)の導入を指す。細胞の形質転換は安定的であっても、一過性であってもよい。用語「一過性形質転換」または「一過性に形質転換された」とは、宿主細胞のゲノムへのトランスジェーン組込みが無い場合の、細胞中への1個以上のトランスジェーンの導入を指す。一過性形質転換を、例えば、1個以上のトランスジェーンによりコードされるポリペプチドの存在を検出する酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により検出することができる。あるいは、一過性形質転換は、本明細書で証明されたトランスジェーン(例えば、uid A遺伝子)によりコードされるタンパク質(例えば、 β -グルクロニダーゼ)の活性を検出すること[例えば、GUS酵素の存在下で青色の沈降物を与えるX-glucを用いる染色によるGUS酵素活性の組織化学アッセイ; およびGUS-Lightキット(Tropix)を用いるGUS酵素活性の化学発光アッセイ]により、検出することができる。用語「一過性形質転換体」は、1個以上のトランスジェーンが一過性に組込まれた細胞を指す。対照的に、用語「安定的形質転換」または「安定に形質転換された」とは、好ましくは減数分裂による染色体組込みおよび安定的な遺伝をもたらす、細胞のゲノム中への1個以上のトランスジェーンの導入および組込みを指す。細胞の安定的形質転換を、細胞のゲノムDNAと、1個以上のトランスジェーンに結合することができる核酸配列とのサザンブロットハイブリダイゼーションにより検出することができる。あるいは、細胞の安定的形質転換を、トランスジェーン配列を増幅する細胞のゲノムDNAのポリメラーゼ連鎖反応により検出することもできる。用語「安定的形質転換体」とは、ゲノムDNA(プラスチドおよび核のDNAを含む)中に1個以上のトランスジェーンが安定的に組み込まれた細胞、好ましくは、核の染色体DNA中に組み込まれた細胞を指す。かくして、安定的形質転換体は、安定的形質転換体由来するゲノムDNAは1個以上のトランスジェーンを含むが、一過性形質転換体由来するゲノムDNAはトランスジェーンを含まないという点で、一過性形質転換体とは区別される。形質転換はまた、染色体外(epichromosomal)複製を伴う植物ウイルスベクターの形態での植物細胞への遺伝物質の導入、および減数分裂安定性に関して可変的特性を示しうる遺伝子発現をも含む。形質転換はまた、染色体外複製を伴う植物ウイルスベクターの形態での植物細胞への遺伝物質の導入、および減数分裂安定性に関して可変的特性を示しうる遺伝子発現をも含む。好ましくは、用語「形質転換」は、減数分裂による染色体組込みおよび安定的な遺伝をもたらす、植物細胞への遺伝物質の導入を含む。

20

30

40

【0112】

細菌に関する用語「感染すること」および「感染」とは、細菌内に含まれる核酸配列が

50

標的生物学的サンプルの1個以上の細胞中に導入されるような条件下での、標的生物学的サンプル(例えば、細胞、組織など)と該細菌との同時インキュベーションを指す。

【0113】

用語「アグロバクテリウム」は、クラウンゴールを生じる、土壌性のグラム陰性で桿状の植物病原性細菌を指す。用語「アグロバクテリウム」は、限定されるものではないが、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)(通常は、感染植物中でクラウンゴールを生じる)、およびアグロバクテリウム・リゾジェネス(*Agrobacterium rhizogenes*)(感染した宿主植物中で毛根病を引き起こす)の菌株を含む。アグロバクテリウムによる植物細胞の感染は、一般的には、感染細胞によるオパイン(例えば、ノパリン、アグロパイン、オクトピンなど)の産生をもたらす。かくして、ノパリンの産生を引き起こすアグロバクテリウム株(例えば、LBA4301、C58、A208株)を「ノパリン型」アグロバクテリウムと呼び；オクトピンの産生を引き起こすアグロバクテリウム株(例えば、LBA4404、Ach5、B6株)を「オクトピン型」アグロバクテリウムと呼び；およびアグロパインの産生を引き起こすアグロバクテリウム株(例えば、EHA105、EHA101、A281株)を「アグロパイン型」アグロバクテリウムと呼ぶ。

10

【0114】

用語「ボンバーディング」、「ボンバードメント」および「バイオリスティックボンバードメント」とは、標的生物学的サンプル(例えば、細胞、組織など)に向けて粒子を加速させて、標的生物学的サンプル中の細胞の細胞膜の損傷を生じ、および/または標的生物学的サンプル中へその粒子を導入させる方法を指す。バイオリスティックボンバードメントの方法は当技術分野で公知であり(例えば、その内容が参照により本明細書に組み入れられるものとする米国特許第5,584,807号)、商業的に利用可能である(例えば、ヘリウムガス駆動型マイクロプロジェクトイルアクセラレーター(PDS-1000/He)(BioRad))。

20

【0115】

本明細書で用いられる用語「ハイブリダイゼーション」は、「核酸の鎖が塩基対形成により相補鎖と結合する任意のプロセス」を含む(Coombs 1994)。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強度(すなわち、核酸間の結合強度)は、核酸間の相補性の程度、用いる条件のストリンジェンシー、形成されたハイブリッドのT_m、および核酸内のG:C比などの因子により影響される。

【0116】

本明細書で用いられる用語「T_m」は、「融点」に関して用いられる。融点は、二本鎖の核酸分子の集団が一本鎖へと半分が解離されるようになる温度である。核酸のT_mを算出するための式は当技術分野でよく知られている。標準的な参考文献により示されるように、T_m値の簡単な見積もりを、核酸が1M NaClの水性溶液中にある場合、式： $T_m = 81.5 + 0.41(G + C\%)$ により算出することができる[例えば、AndersonおよびYoung, 「定量的フィルターハイブリダイゼーション(Quantitative Filter Hybridization)」、Nucleic Acid Hybridization(1985)を参照]。他の参考文献は、T_mの算出に構造特性および配列特性を考慮に入れるより洗練された計算を含む。

30

【0117】

別途定義しない限り、核酸ハイブリダイゼーションに関して用いられる場合の低ストリンジェンシー条件は、約100～約1000ヌクレオチド長のDNAプローブを用いる場合、5 x SSPE(43.8 g/L NaCl、6.9 g/L NaH₂PO₄・H₂Oおよび1.85 g/L EDTA、NaOHでpHを7.4に調整)、1% SDS、5x Denhardt's試薬[50x Denhardt'sは500 mLあたり以下のもの：5 gのFicoll(Type 400, Pharmacia)、5 gのBSA(Fraction V; Sigma)を含む]および100 μg/mLの変性サケ精子DNAからなる溶液中、68 °Cでの結合またはハイブリダイゼーションの後、室温での0.2 x SSPE、および0.1% SDSを含む溶液中での洗浄を行うことと等価な条件を含む。

40

【0118】

別途定義しない限り、核酸ハイブリダイゼーションに関して用いられる場合の高ストリンジェンシー条件は、約100～約1000ヌクレオチド長のDNAプローブを用いる場合、5 x SSPE、1% SDS、5x Denhardt's試薬、および100 μg/mLの変性サケ精子DNAからなる溶液中、

50

68 での結合またはハイブリダイゼーションの後、68 での0.1x SSPE、および0.1% SDSを含む溶液中での洗浄を行うことと等価な条件を含む。

【0119】

用語「等価」は、目的のハイブリダイゼーション条件に関連するのと同様にハイブリダイゼーション条件に関して用いられる場合、ハイブリダイゼーション条件および目的のハイブリダイゼーション条件が、同範囲の相同性(%)を有する核酸配列のハイブリダイゼーションをもたらすことを意味する。例えば、目的のハイブリダイゼーション条件が、第1の核酸配列と、この第1の核酸配列に対して80~90%の相同性を有する他の核酸配列とのハイブリダイゼーションをもたらす場合、別のハイブリダイゼーション条件を、この別のハイブリダイゼーション条件も、第1の核酸配列と、この第1の核酸配列に対して80~90%の相同性を有する他の核酸配列とのハイブリダイゼーションをももたらす場合には、その目的のハイブリダイゼーション条件と等価であると言う。

【0120】

核酸ハイブリダイゼーションに関して用いられる場合、当技術分野では、多くの等価な条件を用いて、低または高ストリンジェンシー条件を含めることができること；プローブの長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成)、および標的の性質(DNA、RNA、塩基組成、溶液中で存在するかまたは固定されているかなど)、ならびに塩および他の成分(例えば、ホルムアミド、硫酸デキストラン、ポリエチレングリコールの存在もしくは非存在)の濃度などの因子を考慮し、ハイブリダイゼーション溶液を変化させて、上記で挙げた条件と異なるが等価である低または高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を生じることができるとはよく知られている。当業者であれば、非特異的結合を減少または排除するには、より高ストリンジェンシーが好ましいが、様々な相同性を有するより多数の核酸配列を検出するには、より低ストリンジェンシーが好ましいであろうことを理解している。

【0121】

発明の詳細な説明

本発明を、本発明の好ましい実施形態の以下の詳細な説明およびそこに含まれる実施例を参照することにより、より容易に理解することができる。

【0122】

本発明の化合物、組成物および方法を開示し、説明する前に、本発明が特定の核酸、特定のポリペプチド、特定の細胞型、特定の宿主細胞、特定の条件、または特定の方法などに限定されず、同様に、勿論、変化しうることが理解されるべきであり、またその多くの改変および変更が当業者には明らかであろう。また、本明細書で用いられる用語は、特定の実施形態のみを記載する目的のためのものであり、限定されることを意図するものではない。本明細書および特許請求の範囲において用いられる「a」または「an」は、それが用いられる文脈に依存して、1またはそれ以上を意味しうる。かくして、例えば、「細胞(a cell)」に対する言及は、少なくとも1個の細胞を用いることができることを意味しうる。

【0123】

本発明は、部分的には、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、ダイズ(*Glycine max*)、イネ(*Oryza sativa*)、トウモロコシ(*Zea mays*)、アマ(*Linum usitatissimum*)、オオムギ(*Hordeum vulgare*)およびコムギ(*Triticum aestivum*)などの植物、ならびにトウモロコシ、オオムギ、アマ、テンサイもしくはヒマワリなどの他の近縁な作物種に由来するFAD2様LMPをコードする核酸分子の単離および特性解析に基づく。

【0124】

本発明の目的に従って、本明細書で具体化され、かつ広く記載されるように、本発明は、一態様においては、脂質代謝タンパク質(LMP)、またはその一部をコードする植物(シロイヌナズナ、ダイズ、トウモロコシ、イネ、アマ、オオムギもしくはコムギ)に由来する単離された核酸を提供する。

【0125】

本発明の一態様は、LMPポリペプチドまたは生物学的に活性なその一部をコードする単

離された核酸分子、ならびにLMPをコードする核酸(例えば、LMP DNA)の同定もしくは増幅のためのハイブリダイゼーションプローブまたはプライマーとしての使用にとって十分な核酸断片に関する。本明細書で用いられる用語「核酸分子」は、DNA分子(例えば、cDNAもしくはゲノムDNA)およびRNA分子(例えば、mRNA)およびヌクレオチド類似体を用いて作製されたDNAもしくはRNAの類似体を含むことが意図される。この用語はまた、遺伝子のコード領域の3'および5'末端の両方に位置する非翻訳配列、すなわちその遺伝子のコード領域の5'末端から上流の少なくとも約1000ヌクレオチドの配列およびコード領域の3'末端から下流の少なくとも約200ヌクレオチドの配列をも含む。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。「単離された」核酸分子は、該核酸の天然の起源において存在する他の核酸分子から実質的に分離されたものである。好ましくは、「単離された」核酸は、該核酸が由来する生物のゲノムDNA中で該核酸に天然でフランキングする配列(すなわち、核酸の5'および3'末端に位置する配列)を実質的に含まない。例えば、様々な実施形態においては、単離されたLMP核酸分子は、該核酸が由来する細胞(例えば、シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギの細胞)のゲノムDNA中で該核酸分子に天然でフランキングする約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kbまたは0.1 kb未満のヌクレオチド配列を含んでもよい。さらに、cDNA分子などの「単離された」核酸分子は、他の細胞材料、または、組換え技術により産生される場合には培養培地、または、化学的に合成される場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。

10

20

30

40

50

【0126】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aのヌクレオチド配列、またはその一部を有する核酸分子を、標準的な分子生物学技術を用いて単離し、その配列情報をここに提供することができる。例えば、シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのLMP cDNAは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列のうち1つの全体または一部をハイブリダイゼーションプローブとして用い、標準的なハイブリダイゼーション技術を用いて(例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載のように)、シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのライブラリーから単離することができる。さらに、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列のうち1つの全体または一部を含む核酸分子は、この配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応により単離することができる(例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aのこの同じ配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応により単離することができる)。例えば、mRNAを植物細胞から単離し(例えば、Chirgwinら、1979, Biochemistry 18:5294-5299のグアニジン-チオシアネート抽出法により)、cDNAを逆転写酵素(例えば、Gibco/BRL, Bethesda, MDから入手可

能なモノクロームMLV逆転写酵素；またはSeikagaku America, Inc., St. Petersburg, FLから入手可能なAMV逆転写酵素)を用いて調製することができる。ポリメラーゼ連鎖反応増幅のための合成オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示されるヌクレオチド配列のうち1つに基づいて設計することができる。本発明の核酸を、cDNAまたは、その代わりにゲノムDNAを鋳型として用い、および好適なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、標準的なPCR増幅技術に従って増幅することができる。そのように増幅された核酸を好適なベクター中にクローニングし、DNA配列分析により特性解析することができる。さらに、LMPヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば、自動DNA合成装置を用いる標準的な合成技術により調製することができる。

10

【0127】

好ましい実施形態においては、本発明の単離された核酸は、配列番号5、配列番号9、配列番号13、配列番号17、配列番号21、配列番号25、配列番号29、または配列番号33に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示されるヌクレオチド配列のうち1つを含む。配列番号5、配列番号9、配列番号13、配列番号17、配列番号21、配列番号25、配列番号29、または配列番号33に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列は、本発明のシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのLMP cDNAに対応する。これらのcDNAは、LMPをコードする配列(すなわち、付属書Aに示される「コード領域」、)ならびに5'非翻訳配列および3'非翻訳配列を含む。あるいは、核酸分子は、配列番号7、配列番号11、配列番号15、配列番号19、配列番号23、配列番号27、配列番号31、または配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書A中の配列のいずれかのコード領域のみを含んでもよく、またはゲノムDNAから単離された全ゲノム断片を含んでもよい。

20

【0128】

本出願の目的のために、付属書Aに示される配列の各々は、識別登録番号(例えば、TaFA D-01)を有することが理解されるであろう。これらの配列の各々は、一般的には、3つの部分：5'上流領域、コード領域、および下流領域を含みうる。これらの配列のコード領域を、「ORF位置」として示す(表3)。

30

【0129】

別の好ましい実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示されるヌクレオチド配列の1つの相補体、またはその一部である核酸分子を含む。配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示されるヌクレオチド配列の1つに相補的である核酸分子は、付属書Aに示されるヌクレオチド配列の1つにハイブリダイズすることができ、それにより安定な二重鎖を形成することができるように、付属書Aに示されるヌクレオチド配列の1つに十分相補的であるものである。

40

【0130】

さらに別の好ましい実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に開示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示されるヌクレオチド配列、またはその一部に対して、少なくとも約50~60%、好ましくは少なくとも約60~70%、より好ましくは少なくとも約70~80%、80~90%、もしくは90~95%、また好ましくは少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%

50

、もしくは94%、およびさらにより好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同であるヌクレオチド配列を含む。ヌクレオチド配列の相同性を、Vector NTI Suite 9.0のAlign X (Aug. 22, 2003)を用いて、以下のパラメーター：ギャップ開始ペナルティ：15；ギャップ伸長ペナルティ：6.66；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40を用いて決定するのが好ましい。

【0131】

さらなる好ましい実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、付属書Aに示されるヌクレオチド配列の1つ、またはその一部にハイブリダイズする(例えば、ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする)ヌクレオチド配列を含む。これらのハイブリダイゼーション条件は、約60℃、pH7で約0.02モル濃度の塩濃度を有する溶液を用いる洗浄を含む。

【0132】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33または配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書A中の配列の1つのコード領域の一部のみ、例えば、プローブもしくはプライマーとして用いることができる断片、またはLMPの生物学的に活性な一部をコードする断片を、含んでもよい。シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギに由来するLMP遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列により、他の細胞型および生物におけるLMP相同体、ならびに他の植物もしくは近縁種に由来するLMP相同体の同定および/またはクローニングにおける使用のために設計されたプローブおよびプライマーの作製が可能になる。従って、本発明はまた、本明細書に開示された核酸、またはその断片を含む化合物も提供する。これらの化合物には、ある成分に結合された核酸を含む。これらの成分としては、限定されるものではないが、検出成分、ハイブリダイゼーション成分、精製成分、送達成分、反応成分、結合成分などが挙げられる。プローブ/プライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジেন্টな条件下で、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示される配列の1つのセンス鎖、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示される配列の1つのアンチセンス配列、またはその天然の突然変異体の少なくとも約12個、好ましくは約25個、より好ましくは約40、50もしくは75個連続したヌクレオチドに対してハイブリダイズするヌクレオチド配列の一領域を含む。配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aのヌクレオチド配列に基づくプライマーを、PCR反応において用いて、LMP相同体をクローニングすることができる。LMPヌクレオチド配列に基づくプローブを用いて、同一のもしくは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出することができる。好ましい実施形態においては、このプローブはさらに、それに結合した標識基を含み、例えば、その標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素コファクターであってよい。そのようなプローブは、細胞サンプル中のLMPをコードする核酸のレベルを測定することにより、例えば、LMP mRNAレベルを検出するか、またはゲノムLMP遺伝子が突然変異もしくは欠失しているかどうかを判定することなどにより、LMPを発現する細胞を同定するためのゲノムマーカー試験キットの一部として用いることができる。

【0133】

一実施形態においては、本発明の核酸分子は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配

列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列によりコードされるアミノ酸に対し十分相同であるアミノ酸配列を含む該タンパク質またはその一部であって、野生型タンパク質と同一もしくは類似する機能を維持しているような該タンパク質またはその一部をコードする。本明細書で用いられる用語「十分相同である」とは、あるアミノ酸配列に対して同一または等価なアミノ酸残基(例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列のORFの1つ中のアミノ酸残基と類似する側鎖を有するアミノ酸残基)を最小数で含むアミノ酸配列を有するタンパク質またはその一部であって、植物における種子貯蔵化合物の産生にとって必要な化合物の代謝、微生物もしくは植物における細胞膜の構築、またはこれらの膜を横断する分子輸送に關与することができる該タンパク質またはその一部を指す。DNA結合タンパク質、転写因子、キナーゼ、ホスファターゼなどの調節タンパク質、または脂質、デンプンおよびタンパク質生合成経路などの代謝経路または膜輸送系のタンパク質メンバーは、種子貯蔵化合物の生合成において役割を果たし得る。そのような活性の例は、本明細書に記載されている(表3中の推定アノテーションを参照)。LMPをコードする核酸配列の例を、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示す。

10

20

30

40

50

【0134】

変化もしくは増加した糖および/または脂肪酸産生は、トウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、ダイズ、ラッカセイ、ワタ、カノーラ、亜麻仁、キャッサバ、コショウ、ヒマワリ、テンサイおよびマンジュギク、そしてジャガイモ、タバコ、ナス、およびトマトなどのナス科植物、ソラマメ属種、エンドウマメ、アルファルファ、低木植物(コーヒー、カカオ、茶)、ヤナギ属種、樹木(アブラヤシ、ココナツ)および多年性牧草および飼料作物などの様々な植物に遺伝させるのが望ましい一般的な形質であるので、これらの作物植物はまた、本発明のさらなる1つの実施形態として、遺伝子操作のための好ましい標的植物である。

【0135】

本発明のLMP核酸分子によりコードされるタンパク質の一部は、LMPの1つの生物学的に活性な一部であるのが好ましい。本明細書で用いられる用語「LMPの生物学的に活性な一部」は、種子貯蔵脂質の生合成にとって必要な化合物の代謝、または微生物もしくは植物における細胞膜の構築、またはこれらの膜を横断する分子輸送に關与するか、または表3に記載の活性を有するLMPの一部分、例えば、ドメイン/モチーフを含むことが意図される。LMPまたはその生物学的に活性な一部が、種子貯蔵化合物および細胞膜の産生にとって必要な化合物の代謝に關与することができるかどうかを判定するためには、酵素活性のアッセイを行えばよい。そのようなアッセイ方法は当業者にはよく知られており、例証の実施例14に記載されている。

【0136】

LMPの生物学的に活性な一部としては、LMPのアミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列(例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされるアミノ酸配列、または、完全長LMPもしくはLMPと相同である完全長タンパク質よりも少ないアミノ酸を含む、LMPと相同なタンパク質のアミノ酸配列)を含むペプチドを含み、かつLMPの少なくとも1つの活性を示す。典型的には、生物学的に活性な一部(ペプチド、例えば、5、10、15、20、30、35、36、37、38、39、40、50、100またはそれ以上のアミノ酸長であるペプチド)は、LMPの少なくとも1つの活性を有

するドメインまたはモチーフを含む。さらに、前記タンパク質の他の領域が欠失した他の生物学的に活性な一部を、組換え技術により調製し、それを本明細書に記載の1つ以上の活性について評価することができる。好ましくは、LMPの生物学的に活性な一部は、生物学的活性を有する1個以上の選択されたドメイン/モチーフまたはその一部を含む。

【0137】

LMPの生物学的に活性な一部をコードするさらなる核酸断片は、該配列のうち1つの一部分単離し、LMPまたはペプチドのコード化部分を発現させ(例えば、*in vitro*での組換え発現により)、さらにLMPまたはペプチドのコード化部分の活性を評価することにより、調製することができる。

【0138】

本発明はさらに、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示されるヌクレオチド配列の1つ(およびその一部)とは遺伝暗号の縮重のために異なっており、従って配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに示されるヌクレオチド配列によりコードされるものと同じLMPをコードする核酸分子を包含する。さらなる実施形態において、本発明の核酸分子は、付属書Aに示されるオープンリーディングフレームによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列に対し実質的に相同である完全長タンパク質をコードする。一実施形態においては、完全長核酸もしくはタンパク質またはその核酸もしくはタンパク質の断片は、シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギに由来するものである。

【0139】

付属書Aに示されるシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのLMPヌクレオチド配列に加えて、LMPのアミノ酸配列に変化をもたらすDNA配列多型が集団(例えば、シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギ集団)内に存在しうことは当業者には理解できるであろう。LMP遺伝子におけるそのような遺伝的多型は、天然の変異のために集団内で個体間に存在しうる。本明細書で用いられる用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」とは、LMP、好ましくは、シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのLMPをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子を指す。そのような天然の変異は、典型的には、LMP遺伝子のヌクレオチド配列において1~40%の差異をもたらし得る。天然の変異の結果であり、LMPの機能的活性を変化させないLMPにおけるそのようなヌクレオチド変異およびそれにより生じるアミノ酸多型はいかなるものも全て、本発明の範囲内にいることが意図される。

【0140】

本発明のシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのLMP cDNAの、天然の変異体およびシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギ以外のオルソログに対応する核酸分子は、ハイブリダイゼーションプロブとしてシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギのcDNA、またはその一部を標準的なハイブリダイゼーション技術に従ってストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で用いて、本明細書に開示されたシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのLMP核酸に対するそれらの相同性に基づいて単離することができる。本明細書で用いられる用語「オルソログ」とは、異なる種に由来するが、種分化により共通の先祖遺伝子から進化した2つの核酸を指す。通常、オルソログは、同じか、または類似する機能を有するタンパク質をコードする。従って、別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも15ヌクレオチド長であり、ストリンジентな条件下で、配列番号5、配列番号7、配列番号

9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aのヌクレオチド配列を含む核酸分子とハイブリダイズする。他の実施形態においては、前記核酸は少なくとも30、50、100、250またはそれ以上のヌクレオチド長である。本明細書で用いられる用語「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする」とは、互いに少なくとも60%相同であるヌクレオチド配列が、典型的には互いにハイブリダイズしたままとなるハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を述べるのが意図される。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、より好ましくは少なくとも約70%、およびさらにより好ましくは少なくとも約75%以上相同である配列が、典型的には互いにハイブリダイズしたままとなるものである。そのようなストリンジエントな条件は当業者には公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989: 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45℃でのハイブリダイゼーション、次いで、0.2×SSC、0.1%SDS中、50~65℃での1回以上の洗浄である。好ましくは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列にストリンジエントな条件下でハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子は、天然の核酸分子と一致する。本明細書で用いられる「天然の」核酸分子とは、天然で生じる(例えば、天然のタンパク質をコードする)ヌクレオチド配列を有するRNAまたはDNA分子を指す。一実施形態においては、前記核酸は、天然のシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのLMPをコードする。

10

20

30

40

50

【0141】

当業者であれば、前記集団中に存在しうるLMP配列の天然の変異体に加えて、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aのヌクレオチド配列中に突然変異により変化を導入することによって、LMPの機能的な能力を変化させることなく、コードされたLMPのアミノ酸配列に変化をもたすことができることをさらに理解するであろう。例えば、「不可決でない」アミノ酸残基においてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換を、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列中に生じさせることができる。「不可欠でない」アミノ酸残基は、LMPの活性を変化させることなく、LMPのうちの1つの野生型配列(付属書A、好ましい実施形態では配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるもの)から変化させることができる残基であり、一方「不可欠な」アミノ酸残基はLMP活性にとって必要である。しかしながら、他のアミノ酸残基(例えば、LMP活性を有するドメイン中で保存されていないか、または半保存されているにすぎないアミノ酸残基)は、活性にとって不可欠ではないか、もしくは、かくして、おそらくLMP活性を変化させることがない変化に適合するであろう。

【0142】

従って、本発明の別の態様は、LMP活性にとって不可欠ではないアミノ酸残基における変化を含むLMPをコードする核酸分子に関する。そのようなLMPは、一の配列とはアミノ酸配列において異なるが、なお本明細書に記載の少なくとも1つのLMP活性を保持する。一実施形態においては、単離された核酸分子はタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、該タンパク質は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番

号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされるアミノ酸配列と少なくとも約50%相同であるアミノ酸配列を含み、かつシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギにおける種子貯蔵化合物、または細胞膜の産生にとって必要な化合物の代謝に關与することができるか、または表3に記載の1つ以上の活性を有する。好ましくは、前記核酸分子によりコードされるタンパク質は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つと少なくとも約50~60%相同であり、より好ましくは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つと少なくとも約60~70%相同であり、さらにより好ましくは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つと少なくとも約70~80%、80~90%、90~95%、なお好ましくは少なくとも約85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%もしくは95%相同であり、最も好ましくは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つと少なくとも約96%、97%、98%、もしくは99%相同である。ポリペプチド配列の相同性を、以下のパラメーター：ギャップ開始ペナルティ：10；ギャップ伸長ペナルティ：0.05；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40を用いるVector NTI Suite 9.0のAlign X(Aug. 22, 2003)を用いて決定するのが好ましい。

10

20

30

40

50

【0143】

2つのアミノ酸配列(例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つ、およびその突然変異形態)または2つの核酸の相同性%を決定するために、その配列を最適な比較目的のためにアラインメントする(例えば、一方のタンパク質もしくは核酸の配列中に、他方のタンパク質もしくは核酸と最適にアラインメントするために、ギャップを導入することができる)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。一方の配列(例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つ)中のある位置に、他方の配列(例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされるポリペプチドから選択される配列の突然変異形態)中の対応する位置と同じアミノ酸残基もしくはヌクレオチドが存在する場合、この両分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書で用いられる場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である)。2つの配列間の相同性%は、該両配列が共有する同一の位置数の関数である(すなわち、相同性% = 同一の位置数 / 位置の総数 × 100)。

【0144】

配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされるタンパク質配列と相同なLMPをコードする単離された核酸分子は、1個以上のアミノ酸の置換、付加もしくは欠失がコードされたタンパク質に導入されるように、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aのヌクレオチド配列に1個以上のヌクレオチドの置換、付加もしくは欠失を導入することにより、作製することができる。突然変異は、部位特異的突然変異誘発やPCR媒介突然変異誘発などの標準的な技術により、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列の1つに導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換を、1個以上の推定上の不可欠ではないアミノ酸残基において生じさせる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基を、類似する側鎖を有するアミノ酸残基と置換するものである。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 γ -分枝側鎖を有するアミノ酸(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。かくして、LMP中の推定上の不可欠ではないアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーに由来する別のアミノ酸残基で置換するのが好ましい。あるいは、別の実施形態においては、飽和突然変異誘発などにより、LMPコード配列の全体または一部に沿って無作為に突然変異を導入し、得られた突然変異体を、本明細書に記載のLMP活性についてスクリーニングして、LMP活性を保持する突然変異体を同定することができる。配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの配列の1つの突然変異誘発の後、コードされたタンパク質を組換え的に発現させ、該タンパク質の活性を、例えば、本明細書に記載のアッセイを用いて測定することができる(例証の実施例11~13を参照)。

【0145】

LMPを、組換えDNA技術により製造するのが好ましい。例えば、前記タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクター中にクローニングし(上記のようにして)、この発現ベクターを宿主細胞中に導入し(本明細書に記載のようにして)、そしてLMPをこの宿主細胞中で発現させる。次いで、LMPを、標準的なタンパク質精製技術を用いる好適な精製スキームにより、前記細胞から単離することができる。組換え発現に代えて、LMPまたはそのペプチドを、標準的なペプチド合成技術を用いて化学的に合成することができる。さらに、天然のLMPを、例えば、本発明のLMPまたはその断片を用いて標準的な技術により産生させることができる抗LMP抗体を用いて、細胞から単離することができる。

【0146】

本発明はまた、LMPキメラまたは融合タンパク質も提供する。本明細書で用いられる場合、LMPの「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非LMPポリペプチドに機能し得るように連結されたLMPポリペプチドを含む。「LMPポリペプチド」とは、LMPに該当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指し、一方「非LMPポリペプチド」とは、LMPと

実質的に相同ではないタンパク質、例えば、LMPとは異なるものであり、かつ同じかまたは異なる生物から得られるタンパク質に該当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。融合タンパク質内で、用語「機能し得るように連結された」とは、LMPポリペプチドと非LMPポリペプチドが互いに融合して、両配列が使用配列によって生じる予定された機能を果たすようにすることを示すことが意図される。非LMPポリペプチドを、LMPポリペプチドのN末端またはC末端に融合することができる。例えば、一実施形態においては、融合タンパク質は、LMP配列をGST配列のC末端に融合させたGST-LMP(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)融合タンパク質である。そのような融合タンパク質は、組換えLMPの精製を容易にすることができる。他の実施形態においては、融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含むLMPである。特定の宿主細胞(例えば、哺乳動物宿主細胞)中で、LMPの発現および/または分泌を、異種シグナル配列の使用により増加させることができる。

10

20

30

40

50

【0147】

好ましくは、本発明のLMPキメラまたは融合タンパク質を、標準的な組換えDNA技術により製造する。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片を、例えば、連結のために平滑末端もしくは付着末端を用いること、好適な末端をもたらすための制限酵素消化、必要に応じて、付着末端の充填、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を用いることにより、従来の技術に従って読み枠を合わせて1つに連結する。別の実施形態においては、融合遺伝子は、自動DNA合成装置などの従来の技術により合成することができる。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅を、2つの連続的な遺伝子断片に相補的な突出末端を生じるアンカープライマーを用いて実施し、その2つの遺伝子断片をその後アニーリングし再増幅して、キメラ遺伝子配列を作製することができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら(編)、John Wiley & Sons: 1992を参照)。さらに、融合成分(例えば、GSTポリペプチド)を既にコードする多くの発現ベクターが商業的に入手可能である。LMPをコードする核酸を、融合成分がLMPと読み枠を合わせて連結されるように、そのような発現ベクター中にクローニングすることができる。

【0148】

上記のLMPをコードする核酸分子に加えて、本発明の別の態様は、それに対してアンチセンスである単離された核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に対して相補的であり、例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に対して相補的であるか、またはmRNA配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を含む。従って、アンチセンス核酸を、センス核酸と水素結合させることができる。アンチセンス核酸は、LMPコード鎖全体、またはその一部のみに対して相補的であってよい。一実施形態においては、アンチセンス核酸分子は、LMPをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域(例えば、TaFAD-01のコード領域全体はヌクレオチド165~1325を含む)を指す。別の実施形態においては、アンチセンス核酸分子は、LMPをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、アミノ酸に翻訳されない、コード領域にフランキングする5'および3'配列を指す(すなわち、5'および3'非翻訳領域とも呼ぶ)。

【0149】

本明細書に開示されるLMPをコードするコード鎖配列(例えば、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aに記載の配列)が与えられれば、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソン・クリックの塩基対形成規則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、LMP mRNAのコード領域全体に対して相補的であってよいが、LMP mRNAのコードまたは非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドであるのがより好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、LMP mRNAの翻訳開始部位周辺の領域に対して相補的であってよい。アンチセン

スオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチド長であってよい。本発明のアンチセンスまたはセンス核酸を、当技術分野で公知の手法を用いる化学合成および酵素的連結反応を用いて構築することができる。例えば、アンチセンス核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)を、天然のヌクレオチド、または、分子の生物学的安定性を増加させるかもしくはアンチセンスおよびセンス核酸の間で形成される二本鎖の物理的安定性を増加させるように設計された様々な修飾ヌクレオチドを用いて、化学的に合成することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を作製するのに用いることができる修飾ヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒボキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノ-メチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロ-ウラシル、-D-ガラクトシルキユエオシン、イノシン、N-6-イソペンテニルアデニン、1-メチル-グアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチル-シトシン、N-6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチル-アミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキユエオシン、5'-メトキシカルボキシメチル-ウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N-6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キユエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノ-プリンが挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸を、核酸がアンチセンス方向にサブクローニングされた(すなわち、挿入された核酸から転写されるRNAが、以下の小節にさらに記載される目的の標的核酸に対してアンチセンス方向のものである)発現ベクターを用いて生物学的に製造することができる。

【0150】

アンチセンス技術の別の変法においては、二本鎖干渉RNA構築物を用いて、トランスジェニック植物におけるLMP mRNAレベルおよびLMP活性の下方調節を引き起こすことができる。これには、LMP配列の同じ部分のアンチセンス配列に融合されたセンス方向のLMP配列の一部を含むキメラ構築物を用いて植物を形質転換することが必要である。様々な長さのDNAリンカー領域を用いて、前記構築物中のLMP配列のセンスおよびアンチセンス断片を分離することができる。

【0151】

典型的には、本発明のアンチセンス核酸分子を、細胞に投与するか、または、in situ で生成させて、それらがLMPをコードする細胞性mRNAおよび/もしくはゲノムDNAとハイブリダイズするかまたは結合し、それによって、例えば転写および/もしくは翻訳を阻害することにより、そのタンパク質の発現を阻害する。ハイブリダイゼーションは、従来のヌクレオチド相補性により安定な二本鎖を形成するものであってもよく、または、例えば、DNA二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主要な溝における特異的相互作用によるものであってもよい。例えば、当該アンチセンス核酸分子を、細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することにより、選択された細胞表面上に発現された受容体または抗原に特異的に結合するように、該アンチセンス分子を改変することができる。アンチセンス核酸分子を、本明細書に記載のベクターを用いて細胞に送達することもできる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子を、強力な原核性、ウイルス性、または植物などの真核性プロモーターの制御下に置いたベクター構築物が好ましい。

【0152】

さらに別の実施形態においては、本発明のアンチセンス核酸分子は、アノマー核酸分子である。アノマー核酸分子は、通常単位とは異なり、鎖が互いに平行に走る相補的RNA

との特異的二本鎖ハイブリッドを形成する(Gaultierら、1987, Nucleic Acids Res. 15:6625-6641)。アンチセンス核酸分子はまた、2'-o-メチル-リボヌクレオチド(Inoueら、1987, Nucleic Acids Res. 15:6131-6148)またはキメラRNA-DNA類似体(Inoueら、1987, FEBS Lett. 215:327-330)を含んでもよい。

【0153】

さらに別の実施形態においては、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それらが有する相補性領域の対象となるmRNAなどの一本鎖核酸を切断することができる、リボヌクレアーゼ活性を有する触媒的RNA分子である。かくして、リボザイム(例えば、ハンマーヘッドリボザイム(Haselhoff & Gerlach 1988, Nature 334:585-591に記載)を用いてLMP mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってLMP mRNAの翻訳を阻害することができる。LMPをコードする核酸に対する特異性を有するリボザイムを、本明細書に開示されたLMP cDNAのヌクレオチド配列(すなわち、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書A中のBn01)に基づいて、または本発明で教示された方法に従って単離しようとする異種配列に基づいて、設計することができる。例えば、その活性部位のヌクレオチド配列が、LMPをコードするmRNA中で切断されるべきヌクレオチド配列と相補性である、テトラヒメナ(Tetrahymena)L-19 IVS RNAの誘導体を構築することができる(例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照)。あるいは、LMP mRNAを用いて、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAを選択することができる(例えば、Bartel, D. & Szostak J.W. 1993, Science 261:1411-1418を参照)。

【0154】

あるいは、LMP遺伝子発現を、標的細胞中でLMP遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成するようにLMPヌクレオチド配列の調節領域(例えば、LMPプロモーターおよび/またはエンハンサー)に対して相補的なヌクレオチド配列を標的化することにより、阻害することができる(一般的には、Helene C. 1991, Anticancer Drug Des. 6:569-84; Helene C.ら、1992, Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36;およびMaher, L.J. 1992, Bioassays 14:807-15を参照)。

【0155】

さらに別の実施形態においては、マイクロRNA技術を用いることができる(Bartel D., Cell, 116:281-297, 2004)。マイクロRNA前駆体を、目的の遺伝子の発現を標的化し、下方調節するように遺伝子操作することができる。この前駆体を、主として種子または同様に他の組織中で発現させることができる。miRNA(約21~25ヌクレオチド)は、非タンパク質コード遺伝子から転写されたステムループ構造を有するより大きい前駆体から生じる。miRNAは特定のmRNAを標的化して、転写後レベル(すなわち、mRNAを分解する)、または翻訳レベル(すなわち、タンパク質合成を阻害する)で遺伝子発現を抑制する。

【0156】

本発明の別の態様は、LMPをコードする核酸(またはその一部)を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書で用いられる用語「ベクター」とは、それに連結した別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。1つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、さらなるDNAセグメントを連結することができる環状二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、これについてはさらなるDNAセグメントをそのウイルスゲノム内に連結することができる。ある種のベクターは、それが導入される宿主細胞中で自律複製することができる(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード性哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード性哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが機能し得るように連結された遺伝子の発現を指令することができる。そのようなベクターを、本明細書においては「発現ベクター」と呼ぶ。一般的には、組換えDNA技術において役立つ発

現ベクターはしばしばプラスミド形態である。プラスミドは最も一般的に用いられる形態のベクターであるので、本明細書においては、「プラスミド」および「ベクター」を互換的に用いることができる。しかしながら、本発明は、等価な機能を示す、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)などの他の形態の発現ベクターを含むことが意図される。

【0157】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞中での核酸の発現にとって好適な形態で含み、これは、組換え発現ベクターが、発現させようとする核酸配列に機能し得るように連結された、発現のために用いられる宿主細胞に基づいて選択された1種以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内での、「機能し得るように連結された」とは、目的のヌクレオチド配列が、該ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されており、それぞれがその予定された機能を果たす(例えば、*in vitro*転写/翻訳系で、またはベクターを宿主細胞に導入する場合は宿主細胞中で)ように両配列が互いに融合されていることを意味することが意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことが意図される。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されており、またはGruberおよびCrosby, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Glick & Thompson(編), Chapter 7, 89-108(その参考文献を含む)を参照されたい。調節配列としては、多くの型の宿主細胞中でヌクレオチド配列の構成的発現を指令するもの、および特定の宿主細胞においてのみ、または特定の条件下でのみヌクレオチド配列の発現を指令するものが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換しようとする宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子に依存し得ることは当業者には明らかであろう。本発明の発現ベクターを、宿主細胞中に導入し、それによって、本明細書に記載の核酸によりコードされたタンパク質またはペプチド(融合タンパク質またはペプチドを包含する)を産生させることができる(例えば、LMP、突然変異形態のLMP、融合タンパク質など)。

【0158】

本発明の組換え発現ベクターを、原核細胞または真核細胞中でのLMPの発現のために設計することができる。例えば、LMP遺伝子を、細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを用いる)、酵母および他の真菌細胞(Romanos M.A.ら、1992、「酵母における外来遺伝子発現:総論(Foreign gene expression in yeast: a review)」、Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J.ら、1991、「糸状菌における異種遺伝子発現(Heterologous gene expression in filamentous fungi)」、More Gene Manipulations in Fungi, Benet & Lasure(編)、p. 396-428:Academic Press: San Diego;およびvan den Hondel & Punt 1991、「糸状菌のための遺伝子導入系およびベクターの開発(Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi)」、Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdyら(編)、p.1-28, Cambridge University Press: Cambridgeを参照)、藻類(Falciatoreら、1999, Marine Biotechnology 1:239-251)、以下の種類の繊毛虫類:ホロトリチア(Holotrichia)、ペリトリチア(Peritrichia)、スピロトリチア(Spirotrichia)、スクトリア(Suctorina)、テトラヒメナ(Tetrahymena)、パラメシウム(Paramecium)、コルピジウム(Colpidium)、グラウコーマ(Glaucoma)、プラチオフリヤ(Platyophrya)、ポトマカス(Potomacus)、プソイドコーニレンバス(Pseudocohnilembus)、ユープロテス(Euplotes)、エンジェルマニエラ(Engelmanniella)およびスチロニキア(Stylonychia)において、特にWO 98/01572に記載の形質転換法に従って導入したベクターを含むスチロニキア属レムネにおいて、ならびに多細胞の植物細胞(Schmidt & Willmitzer 1988、「シロイヌナズナの葉および子葉植物の高効率なアグロバクテリウム・ツメファシエンス媒介形質転換(High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon plants)」、Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, chapter 6/7, S.71-119 (19

93); White, Jenèsら、「遺伝子導入のための技術(Techniques for Gene Transfer)」、Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, KungおよびWu(編), Academic Press 1993, 128-43; Potrykus 1991, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:205-225(およびそこに引用された参考文献)を参照)または哺乳動物細胞中で、発現させることができる。好適な宿主細胞は、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990でさらに考察されている。あるいは、組換え発現ベクターを、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、in vitroで転写および翻訳することができる。

【0159】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質の発現を指令する構成的または誘導性プロモーターを含むベクターを用いて実施されることが最も多い。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常は、その組換えタンパク質のアミノ末端やC末端に、いくつかのアミノ酸を追加するか、または該タンパク質中の好適な領域内にそれが融合される。典型的には、そのような融合ベクターは、通常、以下の目的のうち1つ以上の役割を果たす：1)組換えタンパク質の発現を増加させること；2)組換えタンパク質の溶解性を増加させること；および3)アフィニティー精製におけるリガンドとして働くことにより、組換えタンパク質の精製を助けること。しばしば、融合発現ベクターには、タンパク質加水分解切断部位を融合成分と組換えタンパク質との結合部に導入して、融合成分からの組換えタンパク質の分離とその後の融合タンパク質の精製を可能にする。そのような酵素、およびそれらの同族認識配列としては、第Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。

【0160】

典型的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAをそれぞれ標的組換えタンパク質に融合させる、pGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith & Johnson 1988, Gene 67:31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, MA)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, NJ)が挙げられる。一実施形態においては、LMPのコード配列をpGEX発現ベクター中にクローニングして、N末端からC末端へ向かって、GST-トロンピン切断部位-Xタンパク質を含む融合タンパク質をコードするベクターを作製する。この融合タンパク質を、グルタチオン-アガロース樹脂を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。GSTに融合されていない組換えLMPは、トロンピンによる融合タンパク質の切断により回収することができる。

【0161】

好適な誘導性非融合性大腸菌発現ベクターの例としては、pTrc(Amannら、1988, Gene 69:301-315)およびpET 11d (Studierら、1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California 60-89)が挙げられる。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主のRNAポリメラーゼ転写に依存する。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現されたウイルスRNAポリメラーゼ(T7 gn1)により媒介されるT7 gn10-lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV 5プロモーターの転写制御下にT7 gn1遺伝子を担持する常在性プロファージに由来する宿主株BL21(DE3)またはHMS174(DE3)により供給する。

【0162】

組換えタンパク質発現を最大化するための1つの戦略は、該組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中で該タンパク質を発現させることである(Gottesman S. 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185:119-128, Academic Press, San Diego, California)。別の戦略は、各アミノ酸に対する個々のコドンが、発現のために選択された細菌で優先的に用いられるものとなるように、発現ベクターに挿入しようとする核酸の核酸配列を変更することである(Wadaら、1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のそのような変更は、標準的なDNA合成

技術により実施することができる。

【0163】

別の実施形態においては、LMP発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母*S. cerevisiae*における発現のためのベクターの例としては、pYepSec1 (Baldariら、1987, *Embo J.* 6:229-234)、pMFa (Kurjan & Herskowitz 1982, *Cell* 30:933-943)、pJRY88 (Schultzら、1987, *Gene* 54:113-123)、およびpYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)が挙げられる。糸状菌などの他の真菌における使用にとって好適なベクターおよびベクターの構築方法としては、van den Hondel & Punt 1991, 「糸状菌のための遺伝子導入系およびベクター開発(Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi)」、*Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdyら(編)、p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridgeに詳細に記載されたものが挙げられる。 10

【0164】

あるいは、本発明のLMPを、バキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞中で発現させることができる。培養した昆虫細胞(例えば、Sf 9細胞)中でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAc系(Smithら、1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165)およびpVL系(Lucklow & Summers 1989, *Virology* 170:31-39)が挙げられる。

【0165】

さらに別の実施形態においては、本発明の核酸を、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞中で発現させる。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8 (Seed 1987, *Nature* 329:840)およびpMT2PC (Kaufmanら、1987, *EMBO J.* 6:187-195)が挙げられる。哺乳動物細胞中で用いる場合、発現ベクターの制御機能はしばしばウイルス調節エレメントにより提供される。例えば、一般的に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス40に由来するものである。原核細胞および真核細胞の両方について好適な他の発現系については、Sambrook, FritshおよびManiatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の第16および17章を参照されたい。 20

【0166】

別の実施形態においては、本発明のLMPを、単細胞植物細胞(藻類など、Falciatoreら、1999, *Marine Biotechnology* 1:239-251およびその参考文献を参照)および高等植物に由来する植物細胞(例えば、作物植物などの種子植物)中で発現させてもよい。植物発現ベクターの例としては、Becker, Kemper, SchellおよびMasterson (1992, 「左境界の近くに位置する選択マーカーを有する新規な植物バイナリーベクター(New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border)」、*Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197)ならびにBevan (1984, 「植物の形質転換のためのバイナリーアグロバクテリウムベクター(Binary Agrobacterium vectors for plant transformation)」、*Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721; 「高等植物における遺伝子導入のためのベクター(Vectors for Gene Transfer in Higher Plants)」、*Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, KungおよびR. Wu(編), Academic Press, 1993, S. 15-38)に詳細に記載のものが挙げられる。 30 40

【0167】

植物発現カセットは、植物細胞中での遺伝子発現を駆動することができ、かつその各配列が転写の終結などのその機能を果たすことができるように機能し得るように連結される調節配列、例えばポリアデニル化シグナルを、含むことが好ましい。好ましいポリアデニル化シグナルとしては、Tiプラスミド pTiACH5(Gielenら、1984, *EMBO J.* 3:835)のオクトピンシンターゼとして知られる遺伝子3やその機能的等価物などのアグロバクテリウム・ツメファシエンス t-DNAに由来するものだけでなく、植物において機能的に活性な他の全てのターミネーターも好適である。

【0168】

植物遺伝子発現は転写レベルに限定されないことが非常に多いので、植物発現カセット 50

は、RNAに対するタンパク質の比率を増加させる、タバコモザイクウイルスに由来する5'非翻訳リーダー配列を含むオーバードライブ配列(Gallieら、1987, *Nucleic Acids Res.* 15:8693-8711)などの翻訳エンハンサーなどの、機能し得るように連結された他の配列を含むのが好ましい。

【0169】

植物遺伝子発現は、適時で細胞または組織特異的な様式での遺伝子発現をもたらす好適なプロモーターに機能し得る形で連結しなければならない。好ましいのは、35S CAMV (Frankら、1980, *Cell* 21:285-294)、19S CaMV (米国特許第5,352,605号およびWO 84/02913を参照)などの植物ウイルスから誘導されたものなどの、構成的発現を駆動するプロモーター(Benfeyら、1989, *EMBO J.* 8:2195-2202)、または米国特許第4,962,028号に記載のRubisco小サブユニットに由来するものなどの植物プロモーターである。さらにより好ましいのは、種子発達の全段階または選択された段階の間にLMPタンパク質の発現を駆動する種子特異的プロモーターである。種子特異的植物プロモーターは、当業者には公知であり、種子特異的mRNAライブラリーおよび発現プロファイリング技術を用いて同定および特性解析されている。種子特異的プロモーターとしては、ナタネに由来するナビン遺伝子プロモーター(米国特許第5,608,152号)、ソラマメ(*Vicia faba*)由来のUSP-プロモーター(Baeumleinら、1991, *Mol. Gen. Genetics* 225:459-67)、シロイヌナズナ由来のオレオシンプロモーター(WO 98/45461)、インゲンマメ(*Phaseolus vulgaris*)由来のファセオリンプロモーター(米国特許第5,504,200号)、アブラナ由来のBce4-プロモーター(WO9113980)またはレグミンB4プロモーター(LeBe4; Baeumleinら、1992, *Plant J.* 2:233-239)ならびにトウモロコシ、オオムギ、コムギ、ライムギ、イネなどの単子葉植物において種子特異的発現を付与するプロモーターが挙げられる。留意すべき好適なプロモーターは、オオムギ由来のlpt2もしくはlpt1遺伝子プロモーター(WO 95/15389およびWO 95/23230)またはWO 99/16890に記載のもの(オオムギのホルデイン遺伝子、イネのグルテリン遺伝子、イネのオリジン遺伝子、イネのプロラミン遺伝子、コムギのグリアジン遺伝子、コムギのグルテリン遺伝子、トウモロコシのゼイン遺伝子、オートムギのグルテリン遺伝子、ソルガムのカシリン遺伝子、およびライムギのセカリン遺伝子に由来するプロモーター)である。

【0170】

植物遺伝子発現を、誘導性プロモーターにより促進することもできる(総論については、Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:89-108を参照)。時期特異的な様式での遺伝子発現が望ましい場合、化学誘導性プロモーターが特に好適である。そのようなプロモーターの例は、サリチル酸誘導性プロモーター(WO 95/19443)、テトラサイクリン誘導性プロモーター(Gatzら、1992, *Plant J.* 2:397-404)およびエタノール誘導性プロモーター(WO 93/21334)である。

【0171】

病原体誘導性PRP1遺伝子プロモーター(Wardら、1993, *Plant. Mol. Biol.* 22: 361-366)、トマト由来の熱誘導性hsp80-プロモーター(米国特許第5,187,267号)、ジャガイモ由来の低温誘導性 -アミラーゼプロモーター(WO 96/12814)または創傷誘導性pinII-プロモーター(EP 375091)などの、生物または非生物ストレス条件に応答するプロモーターも、好適なプロモーターである。

【0172】

植物遺伝子発現カセットにおける使用のための他の好ましい配列は、液胞、核、アミロプラスト、クロロプラスト、クロモプラストなどの全ての種類のプラスチド、細胞外間隙、ミトコンドリア、小胞体、油体、ペルオキシソームおよび植物細胞の他の区画などの好適な細胞区画内へと遺伝子産物を方向付けるのに必要な標的化配列である(総論については、Kermode 1996, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:285-423およびそこに引用される参考文献を参照)。プラスチドは、脂質生合成の前駆体およびいくつかの最終産物が合成される区画であるので、プラスチド特異的遺伝子発現を付与するプロモーターも特に好適である。ウイルスRNAポリメラーゼプロモーターなどの好適なプロモーターはWO 95/16783およびWO 97/06250に記載されており、シロイヌナズナ由来のclpPプロモーターはWO 99/46394に記

載されている。

【0173】

本発明はさらに、発現ベクター中にアンチセンス方向でクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、このDNA分子を、LMP mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現(DNA分子の転写による)を可能にする様式で調節配列に機能し得る形で連結する。様々な細胞型においてアンチセンスRNA分子の連続的発現を指令する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に機能し得るように連結された調節配列、例えば、ウイルスプロモーターおよび/もしくはエンハンサーを選択することもできるし、アンチセンスRNAの構成的、組織特異的もしくは細胞型特異的発現を指令する調節配列を選択することもできる。アンチセンス発現ベクターは、アンチセンス核酸が高効率の調節領域の制御下で産生される組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態であってもよく、その活性は、該ベクターを導入する細胞型により決定することができる。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の調節に関する考察については、We intraubら(1986,「遺伝子分析の分子ツールとしてのアンチセンスRNA(Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis)」、Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1)およびMolら(1990, FEBS Lett. 268:427-430)を参照されたい。

10

【0174】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターを導入した宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」を、本明細書では互換的に用いる。そのような用語は、特定の目的の細胞だけでなく、その細胞の子孫または将来の子孫をも指すと理解されるべきである。ある種の改変は、突然変異または環境的影響によって後続の世代において発生する可能性があるため、そのような子孫は、実際のところ親の細胞と同一ではないが、依然として本明細書で用いられる用語の範囲内に含まれる。宿主細胞は、いかなる原核細胞であっても真核細胞であってもよい。例えば、LMPを、細菌細胞、昆虫細胞、真菌細胞、哺乳動物細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)もしくはCOS細胞)、藻類、織毛虫類または植物細胞中で発現させることができる。他の好適な宿主細胞は当技術分野で公知である。

20

【0175】

ベクターDNAを、従来の形質転換またはトランスフェクション技術により原核細胞または真核細胞中に導入することができる。本明細書で用いられる用語「形質転換」および「トランスフェクション」、「コンジュゲーション」および「形質導入」は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、自然応答能、化学物質媒介導入、またはエレクトロポレーションなどの、宿主細胞中に外来核酸(例えば、DNA)を導入するための当技術分野で認められた様々な技術を指すことが意図される。植物細胞などの宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための好適な方法を、Sambrookら(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)およびMethods in Molecular Biology 1995, Vol. 44, Agrobacterium protocols, GartlandおよびDavey(編), Humana Press, Totowa, New Jerseyなどの他の実験室マニュアルに見出すことができる。

30

40

【0176】

哺乳動物細胞および植物細胞の安定なトランスフェクションについては、用いる発現ベクターおよびトランスフェクション技術によっては、ごく少量の細胞のみがそのゲノム中に外来DNAを取り込み得ることが知られている。これらの構成要素を同定および選択するためには、一般的には、選択マーカー(例えば、抗生物質に対する耐性)をコードする遺伝子を、目的の遺伝子と共に宿主細胞中に導入する。好ましい選択マーカーとしては、G418、ヒグロマイシン、カナマイシンおよびメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を付与するもの、または植物においては、グリホサートもしくはグルホシナートなどの除草剤に対する耐性を付与するものが挙げられる。選択マーカーをコードする核酸を、LMPをコードするものと同じベクター上で宿主細胞中に導入するか、または別のベクター上で導入す

50

ることができる。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞を、例えば、薬剤選択により同定することができる(例えば、選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存するが、その他の細胞は死ぬ)。

【0177】

相同組換え微生物を作製するためには、欠失、付加もしくは置換を導入し、それによってLMP遺伝子を変化させ、例えば機能的に破壊したそのLMP遺伝子の少なくとも一部を含むベクターを調製する。好ましくは、このLMP遺伝子はシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギのLMP遺伝子であるが、近縁植物に由来するか、または哺乳動物、酵母、もしくは昆虫起源に由来するものであってもよい相同体でありうる。好ましい実施形態においては、前記ベクターを、相同組換えに際して、内因性LMP遺伝子が機能的に破壊される(すなわち、もはや機能的タンパク質をコードしない; ノックアウトベクターとも呼ばれる)ように設計する。あるいは、前記ベクターは、相同組換えに際して、内因性LMP遺伝子が突然変異しているか、またはさもなければ変化しているが、依然として機能的タンパク質をコードするように設計することができる(例えば、上流の調節領域を変化させることによって、内因性LMPの発現を変化させることができる)。相同組換えにより点突然変異を作製するために、DNA-RNAハイブリッドを、キメラ形成法(chimeraplasty)として知られる技術において用いることができる(Cole-Straussら、1999, Nucleic Acids Res. 27:1323-1330およびKmiec 1999, American Scientist 87:240-247)。シロイヌナズナまたは他の作物における相同組換え法も、当技術分野でよく知られており、本明細書における使用が想定される。

10

20

【0178】

相同組換えベクターにおいては、LMP遺伝子の変化した部分を、その5'および3'末端でLMP遺伝子のさらなる核酸にフランキングさせて、該ベクターにより担持される外因性LMP遺伝子と、微生物もしくは植物中の内因性LMP遺伝子との間で相同組換えを起こさせる。さらなるフランキングするLMP核酸は、内因性遺伝子との相同組換えの成功にとって十分な長さのものである。典型的には、数百塩基対~数キロベースのフランキングDNA(5'および3'末端の両方)が該ベクター中に含まれる(相同組換えベクターの説明については、例えば、Thomas & Capecchi 1987, Cell 51:503を参照)。前記ベクターを、微生物または植物細胞中に導入する(例えば、ポリエチレングリコール媒介DNAにより)。導入されたLMP遺伝子が内因性LMP遺伝子と相同組換えされた細胞を、当技術分野で公知の技術を用いて選択する。

30

【0179】

別の実施形態においては、導入された遺伝子の調節された発現を可能にする、選択された系を含む組換え微生物を作製することができる。例えば、lacオペロンの制御下に置くようにベクター上にLMP遺伝子を含むことにより、IPTGの存在下でのみLMP遺伝子を発現させることが可能になる。そのような調節系は当技術分野でよく知られている。

【0180】

培養下の原核または真核宿主細胞などの本発明の宿主細胞を用いて、LMPを産生させる(すなわち、発現させる)ことができる。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を用いてLMPを製造する方法を提供する。一実施形態においては、この方法は、LMPが産生されるまで、好適な培地中で本発明の宿主細胞(LMPをコードする組換え発現ベクターを導入したか、またはそのゲノム中に野生型もしくは変化したLMP遺伝子を含む)を培養することを含む。別の実施形態においては、前記方法は、培地または宿主細胞からLMPを単離することをさらに含む。

40

【0181】

本発明の別の態様は、単離されたLMP、およびその生物学的に活性な一部に関する。「単離された」もしくは「精製された」タンパク質もしくはその生物学的に活性な一部は、組換えDNA技術により産生する場合は細胞材料を、または化学的に合成する場合は化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞材料を実質的に含まない」は、当該タンパク質が、それを天然もしくは組換え的に産生する細胞の細胞成分から分離

50

されている、LMPの調製物を包含する。一実施形態においては、用語「細胞材料を実質的に含まない」は、約30% (乾燥重量で) 未満の非LMP (本明細書では「夾雑タンパク質」とも呼ばれる)、より好ましくは約20% 未満の非LMP、さらにより好ましくは約10% 未満の非LMP、および最も好ましくは約5% 未満の非LMPを有するLMPの調製物を包含する。LMPまたはその生物学的に活性な一部を組換え的に産生させる場合、それは細胞培地を実質的に含まないのが好ましく、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の量の約20% 未満、より好ましくは約10% 未満、および最も好ましくは約5% 未満である。用語「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、当該タンパク質が、該タンパク質の合成に関与する化学的前駆体または他の化学物質から分離されている、LMPの調製物を包含する。一実施形態においては、用語「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、約30% (乾燥重量で) 未満の化学的前駆体もしくは非LMP化学物質、より好ましくは、約20% 未満の化学的前駆体もしくは非LMP化学物質、さらにより好ましくは、約10% 未満の化学的前駆体もしくは非LMP化学物質、および最も好ましくは、約5% 未満の化学的前駆体もしくは非LMP化学物質を有するLMPの調製物を包含する。好ましい実施形態においては、単離されたタンパク質またはその生物学的に活性な一部は、LMPが由来する同じ生物からの夾雑タンパク質を欠く。典型的には、そのようなタンパク質を、シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギ以外の他の植物または微生物、藻類もしくは真菌における、例えばシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギのLMPの組換え発現により産生させる。

10

20

30

40

50

【0182】

本発明の単離されたLMPまたはその一部は、シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギ中の種子貯蔵化合物または細胞膜の産生にとって必要な化合物の代謝に関与するか、または表3に記載の活性の1つ以上を有しうる。好ましい実施形態においては、前記タンパク質またはその一部は、該タンパク質またはその一部が、シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギにおける細胞膜の構築にとって必要な化合物の代謝、またはこれらの膜を横断する分子輸送に関与する能力を維持するように、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされるアミノ酸配列と十分相同であるアミノ酸配列を含む。このタンパク質の一部は、本明細書に記載のように生物学的に活性な一部であるのが好ましい。別の好ましい実施形態においては、本発明のLMPは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされるアミノ酸配列を有する。さらに別の好ましい実施形態においては、LMPは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aのヌクレオチド配列にハイブリダイズする (例えば、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする) ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を有する。さらに別の好ましい実施形態においては、LMPは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つと少なくとも約50~60%、好ましくは約60~70%、より好ましくは少なくとも約70~80%、80~90%、90~95%、また好ましくは少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%相同であり、最も好ましくは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号

35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つと少なくとも約96%、97%、98%、または99%相同であるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を有する。ポリペプチド配列相同性を、以下のパラメーター：ギャップ開始ペナルティ：10；ギャップ伸長ペナルティ：0.05；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40を用いるVector NTI Suite 9.0のAlign X (Aug. 22, 2003)を用いて決定するのが好ましい。

【0183】

本発明の好ましいLMPはまた、本明細書に記載の少なくとも1つのLMP活性を有することが好ましい。例えば、本発明の好ましいLMPは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aのヌクレオチド配列とハイブリダイズ(例えば、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ)するヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギにおける細胞膜の構築にとって必要な化合物の代謝、またはこれらの膜を横断する分子の輸送に関与することができ、または表3に記載の活性の1つ以上を有する。

【0184】

他の実施形態においては、LMPは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされるアミノ酸配列と実質的に相同であり、かつ配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つのタンパク質の機能的活性を保持するが、上記に詳細に記載されるように天然の変異もしくは突然変異誘発のためにアミノ酸配列において異なる。従って、別の実施形態においては、LMPは、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされる配列の1つと少なくとも約50~60%、好ましくは少なくとも約60~70%、およびより好ましくは少なくとも約70~80、80~90、90~95%、また好ましくは少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%もしくは95%相同であり、最も好ましくは、アミノ酸配列全体に対する核酸によりコードされる配列の1つと少なくとも約96%、97%、98%もしくは99%相同であり、本明細書に記載のLMP活性の少なくとも1つを有するアミノ酸配列を含むタンパク質である。ポリペプチド配列相同性を、以下のパラメーター：ギャップ開始ペナルティ：10；ギャップ伸長ペナルティ：0.05；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40を用いるVector NTI Suite 9.0のAlign X(Aug. 22, 2003)を用いて決定するのが好ましい。別の実施形態においては、本発明は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33もしくは配列番号35に示されるものを好ましい実施形態とする付属書Aの核酸によりコードされるアミノ酸配列全体に対し実質的に相同であるシロイヌナズナ、ダイズ、イネまたはコムギの完全なタンパク質に関する。

【0185】

ドミナントネガティブ突然変異またはトランスドミナント抑制を用いて、トランスジェニック種子中のLMPの活性を低下させ、種子貯蔵化合物のレベルを変化させることができる。これを達成するために、LMPの活性を喪失させる突然変異を作製し、不活性な非機能

10

20

30

40

50

的LMP遺伝子をトランスジェニック植物中で過剰発現させる。不活性なトランスドミナントLMPタンパク質は、基質または他のタンパク質との相互作用について活性を有する内因性LMPタンパク質と競合し、活性なLMPの活性を弱めてしまう。このように、LMPの生物学的活性を、内因性LMP遺伝子の発現を実際に改変することなく低下させる。この戦略は、植物の転写因子の活性をモジュレート(modulate)するためにPontierらにより用いられた(Pontier D, Miao ZH, Lam E, Plant J 2001 Sep. 27(6): 529-38, 「植物のTGA因子のトランスドミナント抑制は、植物の防御応答におけるそれらの受動的および能動的役割を示す(Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses)」)。

【0186】

10

LMPの相同体は、突然変異誘発、例えば、LMPの個別点突然変異またはトランケーションにより作製することができる。本明細書で用いられる用語「相同体」とは、LMPの活性のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するLMPの変異形態を指す。LMPのアゴニストは、LMPの生物学的活性と実質的に同じである活性か、またはその一部である活性を保持することができる。LMPのアンタゴニストは、例えば、LMPを含む細胞膜成分の代謝カスケードの下流もしくは上流のメンバーに競合的に結合するか、もしくはそのような膜を横断する化学物質の輸送を媒介するLMPに結合することによって、転位が起こるのを妨げることにより、天然の形態のLMPの活性の1つ以上を阻害することができる。

【0187】

代替的な実施形態においては、LMPの相同体を、LMPアゴニストまたはアンタゴニスト活性について、LMPの突然変異体、例えば、トランケーション変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定することができる。一実施形態においては、LMP変異体の多様化ライブラリーは、核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発により作製され、多様化遺伝子ライブラリーによりコードされる。LMP変異体の多様化ライブラリーを、例えば、可能性のあるLMP配列の縮重セットが個々のポリペプチドとして、またはあるいは、LMP配列のセットを含むより大きな融合タンパク質のセット(例えば、ファージディスプレイ用の)として発現可能となるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列中に酵素的に連結することにより作製することができる。縮重オリゴヌクレオチド配列から可能性のあるLMP相同体のライブラリーを作製するのに用いることができる様々な方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動DNA合成装置中で行い、次いでこの合成遺伝子を好適な発現ベクター中に連結することができる。遺伝子の縮重セットの使用により、1つの混合物中で、可能性のあるLMP配列の所望のセットをコードする全ての配列を提供することが可能になる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当技術分野で公知である(例えば、Narang 1983, Tetrahedron 39:3; Itakuraら、1984, Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら、1984, Science 198:1056; Ikeら、1983, Nucleic Acids Res. 11:477を参照)。

20

30

【0188】

さらに、LMPをコードする配列の断片のライブラリーを用いて、LMPの相同体のスクリーニングおよびその後の選択のためにLMP断片の多様化集団を作製することができる。一実施形態においては、コード配列断片のライブラリーを、LMPコード配列の二本鎖PCR断片を、ニック形成が1分子あたり約1回だけ起こる条件下でヌクレアーゼで処理し、該二本鎖DNAを変性させ、該DNAを復元させて、様々なニック産物に由来するセンス/アンチセンス対を含みうる二本鎖DNAを形成させ、S1ヌクレアーゼを用いる処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、さらに得られた断片ライブラリーを発現ベクター中に連結することにより、作製することができる。この方法により、様々な大きさのLMPのN末端、C末端および内部断片をコードする発現ライブラリーを得ることができる。

40

【0189】

点突然変異誘発もしくはトランケーションにより作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングし、また選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術が当技術分野で公知である

50

。そのような技術は、LMP相同体のコンビナトリアル突然変異誘発により作製された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適合可能である。大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするためにハイスループット分析に適合する最も幅広く用いられている技術は、典型的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングし、得られたベクターのライブラリーを用いて好適な細胞を形質転換し、そして、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離が所望の活性の検出により容易にするような条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。ライブラリー中の機能的突然変異体の頻度を増加させる新しい技術である再帰的アンサンブル突然変異誘発(REM)を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用いて、LMP相同体を同定することができる(Arkin & Yourvan 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgraveら、1993, Protein Engineering 6:327-331)。

10

【0190】

別の実施形態においては、細胞に基づくアッセイを活用して、当技術分野でよく知られた方法を用いて、多様化LMPライブラリーを分析することができる。

【0191】

本明細書に記載の核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、融合タンパク質、プライマー、ベクター、および宿主細胞を、以下の方法：シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギおよび近縁生物の同定；シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギに近縁な生物のゲノムのマッピング；シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギの目的の配列の同定および位置解析；進化的研究；機能にとって必要なLMP領域の決定；LMP活性のモジュレーション；1種以上の細胞機能の代謝のモジュレーション；1種以上の化合物の膜貫通輸送のモジュレーション；ならびに種子貯蔵化合物蓄積のモジュレーション、のうち1つ以上において用いることができる。

20

【0192】

シロイヌナズナ植物は高等(または種子)植物の1つのメンバーである。それは、光合成および成長を駆動するために光を必要とするアブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギなどの他の植物と近縁である。シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギなどの植物は、DNA配列およびポリペプチドレベルで高度な相同性を有し、他の植物もしくは生物から得られるプローブを用いるDNA分子の異種スクリーニングの使用が可能になり、かくして、第3の種における遺伝子機能の異種スクリーニングまたは機能的アノテーションおよび推定にとって好適な共通配列の誘導が可能になる。従って、そのような機能を同定する能力は、有意な関連性を有してもよく、例えば、酵素の基質特異性を予測することができる。さらに、これらの核酸分子は、シロイヌナズナゲノムまたは近縁生物のゲノムのマッピングのための参照ポイントとして役立ち得る。

30

【0193】

本発明のLMP核酸分子には、様々な用途がある。第1に、本発明の核酸およびタンパク質分子は、ゲノムの特定の領域に対するマーカーとして役立ち得る。これは、ゲノムのマッピングだけでなく、シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのタンパク質の機能的な研究においても有用である。例えば、シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギの特定のDNA結合タンパク質が結合するゲノムの領域を同定するために、シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのゲノムを消化し、得られた断片を該DNA結合タンパク質と共にインキュベートすることができる。該タンパク質に結合するものを、本発明の核酸分子を用いて、好ましくは、容易に検出可能な標識を付したものをを用いて、さらにプロービングすることができる。ゲノム断片へのそのような核酸分子の結合により、シロイヌナズナ、アブラナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギのゲノムマップへの該断片の位置解析が可能になり、また、異なる酵素を用いて複数回行った場合には、前記タンパク質が結合する核酸配列の迅速な決定が

40

50

容易になる。さらに、本発明の核酸分子は、近縁種の配列と十分相同であって、それによりこれらの核酸分子は近縁植物におけるゲノムマップの構築のためのマーカーとして機能し得る。

【0194】

本発明のLMP核酸分子は、進化的およびタンパク質構造的な研究にとっても有用である。本発明の分子が関与する代謝および輸送プロセスは、様々な原核細胞および真核細胞により用いられる。本発明の核酸分子の配列を、他の生物に由来する同様の酵素をコードするものと比較することにより、該生物の進化的近縁性を評価することができる。同様に、そのような比較により、その配列のどこの領域が保存されており、また保存されていないかを評価することができ、それは、その酵素の機能にとって不可欠であるタンパク質の領域の決定の助けとなるであろう。この種の決定は、タンパク質工学的な研究にとって価値があり、いかなるタンパク質が、機能を失うことなく突然変異誘発を許容することができるかの示唆を与えることができる。

【0195】

本発明のLMP核酸分子の操作は、野生型LMPとは機能的に異なるLMPの産生をもたらすことができるだろう。これらのタンパク質は、効率もしくは活性が改善されているかもしれず、また通常より多い数で細胞中に存在するかもしれず、または効率もしくは活性が低減するかもしれない。

【0196】

本発明のLMPの変化が種子貯蔵化合物の蓄積および/または組成に直接影響し得る際のいくつかの機構が存在する。LMPを発現する植物の場合、輸送の増加は、究極的には種子発達中の1種以上の種子貯蔵化合物の蓄積に影響を及ぼさせるのに用いられうる植物組織および器官内での化合物の蓄積および/または溶質分配の変化をもたらし得る。1つの例はMitsukawaら(1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7098-7102)により提供され、その場合タバコ培養細胞におけるシロイヌナズナの高親和性リン酸輸送体遺伝子の過剰発現がリン酸制限条件下での細胞増殖を増強した。リン酸の利用可能性はまた、糖および代謝中間体の産生(Hurryら、2000, Plant J. 24:383-396)ならびに葉および根における脂質組成(Hartelら、2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10649-10654)に大きく影響を及ぼす。同様に、植物のACCaseの活性はリン酸化により調節されることが証明され(Savage & Oh Irogge 1999, Plant J. 18:521-527)、ACCaseに作用するキナーゼおよびホスファターゼ(LMP)の活性における変化は、種子の脂質蓄積レベルの増加もしくは減少をもたらすことができた。さらに、クロロプラストのエンベロップ膜における脂質キナーゼ活性の存在は、シグナル伝達経路および/または膜タンパク質調節がエンベロップ中で起こることを示唆している(例えば、Mullerら、2000, J. Biol. Chem. 275:19475-19481およびそこに引用される参考文献を参照)。ABI1およびABI2遺伝子は、アブシジン酸シグナル伝達経路における調節因子であり、それゆえ初期および後期の種子発達における調節因子である、2つのタンパク質セリン/トレオニンホスファターゼ2Cをコードする(例えば、Merlotら、2001, Plant J. 25:295-303)。さらなる例については、「発明の背景」の節も参照されたい。

【0197】

本発明はまた、本明細書に開示されるか、もしくは本明細書に記載される核酸によりコードされる、LMPポリペプチド、またはその一部に特異的に結合する抗体も提供する。

【0198】

抗体は、多くの周知の方法により作製することができる(例えば、HarlowおよびLane, 「抗体; 実験室マニュアル(Antibodies; A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988を参照)。簡単に述べると、精製された抗原を、免疫応答を引き出すのに十分な量および間隔で動物中に注入することができる。該動物から、抗体を直接精製するか、または脾臓細胞を取得すればよい。次いで、その細胞を不死化細胞系と融合させ、抗体分泌についてスクリーニングすることができる。この抗体を用いて、前記抗原を分泌する細胞について核酸クローンライブラリーをスクリーニ

ングすることができる。次いで、これらの陽性クローンを配列決定すればよい(例えば、Kellyら、1992, Bio/Technology 10:163-167; Bebbingtonら、1992, Bio/Technology 10:169-175を参照)。

【0199】

ポリペプチドに関する語句「選択的に結合する」とは、タンパク質および他の生物製剤の異種集団中でのタンパク質の存在を決定付ける結合反応を指す。かくして、指定された免疫アッセイ条件下で、特定のタンパク質に結合した特定抗体は、サンプル中に存在する他のタンパク質に有意な量で結合しない。そのような条件下での抗体への選択的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性について選択される抗体を必要とする。様々な免疫アッセイ形式を用いて、特定のタンパク質に選択的に結合する抗体を選択することができる。例えば、固相ELISA免疫アッセイを日常的に用いて、タンパク質と選択的に免疫反応する抗体を選択する。免疫アッセイ形式および選択的結合を決定するのに用いることができる条件の説明については、HarlowおよびLane「抗体、実験室マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)を参照されたい。

10

【0200】

いくつかの例においては、様々な宿主からモノクローナル抗体を調製するのが望ましい。そのようなモノクローナル抗体を調製するための技術の説明は、Stitesら(編)、「基礎および臨床免疫学(Basic and Clinical Immunology)」(Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., 第4版)およびそこに引用された参考文献、ならびにHarlowおよびLane(「抗体、実験室マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988)に見出すことができる。

20

【0201】

本願を通して様々な刊行物が引用されている。これらの刊行物およびこれらの刊行物に引用された参考文献の全ての開示は、本発明が属する最先端分野をより十分に記載するために、その全体が参照により本願に組み入れられるものとする。

【0202】

本発明の範囲または精神から逸脱することなく、本発明において様々な改変および変更を行うことができることは当業者には明らかであろう。本発明の他の実施形態は、本明細書および本明細書に開示された本発明の実践を考慮すれば、当業者には明らかであろう。本明細書および実施例は例示のみとして考慮され、本発明の真の範囲および精神は本明細書に含まれる特許請求の範囲により示されることが意図される。

30

【実施例】

【0203】

実施例1：全般的方法

全般的クローニング工程：

例えば、制限切断、アガロースゲル電気泳動、DNA断片の精製、ニトロセルロースおよびナイロン膜への核酸の転写、DNA断片の連結、大腸菌および酵母細胞の形質転換、細菌の増殖および組換えDNAの配列分析などのクローニング工程を、Sambrookら(1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)またはKaiser, MichaelisおよびMittchell (1994, 「酵母遺伝学における方法(Methods in Yeast Genetics)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3)に記載のように行った。

40

【0204】

b) 化合物：

用いた化合物は、本文中で別途言及しない場合、Fluka社 (Neu-Ulm)、Merck社 (Darmstadt)、Roth社 (Karlsruhe)、Serva社 (Heidelberg)およびSigma社 (Deisenhofen)から医薬品(p.a.)品質で取得した。溶液を、Milli-Q給水システム水精製プラント(Millipore, Eschborn)からの、以下の本文中でH₂Oと称する、精製された、発熱物質不含水を用いて調製した。制限エンドヌクレアーゼ、DNA修飾酵素および分子生物学キットを、AGS社(Heidelberg)、Amersham社(Braunschweig)、Biometra社(Goettingen)、Boehringer社(Mannheim)

50

、Genomed社(Bad Oeynhausen)、New England Biolabs社(Schwalbach/Taunus)、Novagen社(Madison, Wisconsin, USA)、Perkin-Elmer社(Weiterstadt)、Pharmacia社(Freiburg)、Qiagen社(Hilden)およびStratagene社(Amsterdam, Netherlands)から取得した。別途に言及しない場合、これらは、製造業者の説明書に従って使用した。

【0205】

c) 植物材料および成長：

シロイヌナズナ植物

この試験のために、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の野生型およびfad2突然変異体植物(Miquel & Browse, 1992, J Biol Chem 267: 1502-1509に記載されたもの)の根材料、葉、長角果および種子を用いた。野生型およびfad2突然変異シロイヌナズナ種子を、暗黒下、4℃で3日間予備インキュベートした後、 $60 \sim 80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光量子束密度ならびに16時間の明期(22℃)および8時間の暗期(18℃)としたインキュベーター(AR-75, Percival Scientific, Boone, IA)中にそれらを入れた。全ての植物を、半分の濃度のMS培地(Murashige & Skoog, 1962, Physiol. Plant. 15, 473-497)、pH6.2、2%スクロースおよび1.2%寒天上で開始した。種子を20%漂白剤、0.5%トリトンX100中で20分間滅菌し、過剰の滅菌水を用いて6回すすいだ。植物を上記のように成長させるか、またはKlausら(2002, Plant Physiol. 128:885-895)に記載のような標準的な条件下で土壌にて成長させた。

10

【0206】

ダイズ(*Glycine max*)

ダイズ品種Resnickをこの試験のために用いて、cDNAライブラリーを作製した。種子、種子の鞘、花、葉、茎および根の組織を、いくつかの事例においては、暗黒下処理、塩処理、熱処理および乾燥処理された植物から回収した。いくつかの事例においては、その上、植物は線虫に感染していた。しかしながら、この試験は、cDNAライブラリーのための種子および種子鞘組織の使用に焦点を当てたものであった。植物にタグ付けして、開花後の設定した日：5～15日、15～25日および33～50日に種子を収穫した。

20

【0207】

イネ(*Oryza sativa*)

イネのジャポニカ亜種日本晴品種をこの試験に用いて、cDNAライブラリーを作製した。種子、種子鞘、花、葉、茎および根の組織を、いくつかの事例においては暗黒下処理、塩処理、熱処理および乾燥処理した植物から回収した。この試験は、cDNAライブラリーのための種子胚組織の使用に焦点を当てたものであった。内胚乳組織がRNA抽出の妨げになる場合は、胚および内胚乳を別々に回収した。植物を、ウィスコンシン州の土壌(有機物を高度に有する)にて、14時間の光周期で、華氏85度の温室中で成長させた。イネの胚を発生中の種子から切り取った。

30

【0208】

トウモロコシ(*Zea mays*)

トウモロコシハイブリッドB73 x Mo17およびB73近交系(ハイブリッドB73 x Mo17の雌性近交系親)を用いて、cDNAライブラリーを作製した。実または種子[受粉の1日後および9日後の段階の、受精した胚珠/若い穀実；受粉の23日後の乳熟期(milk stage)(R3、初期デンプン産生)の穀実；野外栽培した植物の受粉の30日後の、発達中のデンプン粒およびよく形成された胚が存在する初期糊熟期(early dough stage)(R4)の穀実；プリスター期(blister stage)(R2、水状内胚乳)の非常に若い穀実；受粉の36日後の、内胚乳が硬くなりつつある初期黄熟期(early dent stage)(R5)の穀実；B73近交系の、受粉の9および19日後の穀実]、花[雄穂の発達：6 cmの雄穂(V10)から開花を含む44～70ダップ(dap)まで；雌穂の発達：2 cm(V13)から絹糸抽出期(非受粉)を含む51～70ダップまで]、葉/シュート/ロゼット[雑多な齢数、全て種子充実の前；野外における雄穂出現の直前の、a)3葉期の植物(V3)の葉、b)6葉期の植物(V6)の葉、およびc)より古い起源の葉(地面から3番目)を含む]、茎[2～5葉期の植物の地下に位置する；根および大部分の葉組織を除去したもの、野外栽培した植物の13～29ダップ；野外栽培した、56～84ダップの、雄穂が出現し、種子登熟期(乳熟期)にある、雌穂の近くの茎組織]ならびに根組織[若～中程度の齢数の植物：苗から

40

50

、6葉期の植物、および9葉期の植物；12～35ダップ]を、植物から採集した。

【0209】

アマ(Linum usitatissimum)

アマの00-44427品種および00-44338品種(Svaloef Weibullコレクション内)を、この試験に用いて、cDNAライブラリーを作製した。19 に冷却した温室中、1リットルの土壌あたり5 mlのOsmocoteを含む鉢植え用の土を用いて2リットルの鉢中で植物を成長させた。発達中の種子に由来する材料を、15daa(胚は集中的な伸長の段階にあり、種子の約2/3が充実；胚は後期魚雷型(torpedo)期には緑色である)、25daa(胚は完全に伸長し、幅が増加、種子全体が充実；胚は依然として完全に緑色である)および33daa(種子は成熟を開始している；胚の色はより明るい緑色に変化し、先端は黄色である)に、採集した。

10

【0210】

オオムギ(Hordeum vulgare)

オオムギの品種Morexをこの試験に用いて、cDNAライブラリーを作製した。植物を、日中は23 および夜間は18 で、15時間の光周期で、メトロミックス中、温室内で成長させた。穀実は水状登熟期(watery ripe stage)～後期乳熟期であった。中間～上部の穂先(seedhead)を主に収穫した。種子材料は、植えた75日後に採集した。

【0211】

コムギ(Triticum aestivum)

コムギの品種Galeonをこの試験に用いて、cDNAライブラリーを作製した。種子、花、実、葉、茎および根の組織を、いくつかの事例においては暗黒下処理、塩処理、熱処理、および乾燥処理した植物から回収した。植物を、日中は華氏72度、夜間は華氏65度で、12時間の光周期で、メトロミックス中、温室内で成長させた。

20

【0212】

実施例2：植物からの全DNAの単離

全DNAの単離の詳細は、1グラムの生重量の植物材料の処理に関する。

【0213】

CTABバッファー：2% (w/v)のN-セチル-N,N,N-トリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)；100 mM Tris HCl pH 8.0；1.4 M NaCl；20 mM EDTA。N-ラウリルサルコシンバッファー：10% (w/v)のN-ラウリルサルコシン；100 mM Tris HCl pH 8.0；20 mM EDTA。

【0214】

植物材料を乳鉢中、液体窒素下で磨碎して微細粉末を得て、2 mlのエッペンドルフ容器に移した。次いで、その凍結した植物材料を1 mlの分解バッファー(1 mlのCTABバッファー、100 μ lのN-ラウリルサルコシンバッファー、20 μ lの β -メルカプトエタノールおよび10 μ lのプロテイナーゼK溶液、10 mg/ml)の層で覆い、連続的に振とうしながら1時間、60 でインキュベートした。得られたホモジェネートを2個のエッペンドルフ容器(2 ml)に分配し、同量のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を加えて振ることにより2回抽出した。相分離のために、それぞれ、遠心分離をRTにて8000 gで15分間行った。次いで、DNAを、氷冷イソプロパノールを用いて-70 で30分間かけて沈降させた。沈降させたDNAを4 にて10,000 gで30分間かけて沈殿させ、180 μ lのTEバッファー(Sambrookら、1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)中に再懸濁した。さらなる精製のために、DNAをNaCl(1.2 M最終濃度)で処理し、2倍量の無水エタノールを用いて、-70 で30分間かけて再び沈降させた。70%エタノールを用いる洗浄工程の後、DNAを乾燥させ、続いて50 μ lのH₂O + RNase(50 mg/ml最終濃度)中に取り入れた。DNAを4 で一晚溶解させて、続いて、RNase消化を37 で1時間行った。DNAの保存は4 で行った。

30

40

【0215】

実施例3：植物からの全RNAおよびポリ-(A)+RNAの単離

シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)

転写産物を調べるために、全RNAおよびポリ-(A)+RNAの両方を単離した。RNAは、以下の手順に従って、シロイヌナズナ植物の長角果から単離する。

【0216】

50

シロイヌナズナ種子からのRNA調製-「ホット」抽出：
バッファー、酵素および溶液

2M KCl

プロテイナーゼK

フェノール(RNA用)

クロロホルム：イソアミルアルコール

(フェノール：クロロホルム 1:1; RNA用にpHを調整)

4 M LiCl, DEPC処理

DEPC処理された水

3M NaOAc, pH 5, DEPC処理

イソプロパノール

70%エタノール(DEPC処理された水で作製)

再懸濁バッファー：0.5%SDS、10 mM Tris pH 7.5、1 mM EDTAを、DEPC処理された水を用いて作製した(この溶液をDEPC処理することはできないため)。

【0217】

抽出バッファー：

0.2M ホウ酸ナトリウム

30 mM EDTA

30 mM EGTA

1%SDS (2.5 mlのバッファーあたり250 μ lの10%SDS溶液)

1%デオキシコレート (2.5 mlのバッファーあたり25 mg)

2%PVPP (不溶性 - 2.5 mlのバッファーあたり50 mg)

2%PVP 40K (2.5 mlのバッファーあたり50 mg)

10 mM DTT

100 mM -メルカプトエタノール(新鮮、ドラフト内で取り扱う - 5 mlのバッファーあたり、14.3M溶液の35 μ lを使用)。

【0218】

抽出

抽出バッファーを80℃まで加熱する。液体窒素冷却された乳鉢中で組織を磨碎し、組織粉末を1.5 mlのチューブに移す。バッファーを添加するまで組織は凍結されたままにすべきであり、そのため、予め冷却したスパーテルを用いてサンプルを移し、そのチューブは常に液体窒素中に保持するべきである。350 μ lの予め加熱した抽出バッファー(ここでは100 mgの組織に対する量だが、より大きいサンプルについてはバッファー量は500 μ lでもよい)をチューブに添加し、ボルテックスし、チューブを80℃へと約1分間加熱する。次いで、氷上で保持する。サンプルをボルテックスし、電気乳鉢を用いてさらに磨碎する。

【0219】

消化

プロテイナーゼK(0.15 mg/100 mg組織)を添加し、ボルテックスし、37℃で1時間保持する。

【0220】

1回目の精製

27 μ lの2M KClを添加する。氷上で10分間冷蔵する。室温で10分間、12,000 rpmで遠心分離する。上清を、未使用のRNAaseフリーのチューブに移し、1回のフェノール抽出を行った後、クロロホルム：イソアミルアルコール抽出を行う。1倍量のイソプロパノールを上清に添加し、氷上で10分間冷蔵する。遠心分離(室温にて10分間、7000 rpm)によりRNAをペレット化する。ペレットを1 mlの4M LiCl中に、10~15分間のボルテックスにより分散させる。5分間の遠心分離によりRNAをペレット化する。

【0221】

2回目の精製

ペレットを500 μ lの再懸濁バッファー中に再懸濁する。500 μ lのフェノールを添加し、

10

20

30

40

50

ボルテックスする。250 μ lのクロロホルム：イソアミルアルコールを添加し、ボルテックスする。5分間スピンし、上清を未使用チューブに移す。界面が透明になるまで、クロロホルム：イソアミルアルコール抽出を繰り返す。上清を未使用チューブに移し、1/10容量の3M NaOAc, pH5および600 μ lのイソプロパノールを添加する。-20 で20分以上保持する。10分間の遠心分離によりRNAをペレット化する。ペレットを70%エタノールを用いて1回洗浄する。残存アルコールを全て除去した後、ペレットを15~20 μ lのDEPC水を用いて分散させる。260 nmおよび280 nmでの1:200希釈液の吸光度を測定することにより、量および質を決定する。40 μ gのRNA/ml = 10D260。

【0222】

野生型のシロイヌナズナに由来するRNAを記載のように単離する(Hosein, 2001, Plant Mol. Biol. Rep., 19, 65a-65e; Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C., & Ohlrogge, J.B., 2002, Plant Cell, 14, 1191-1206)。

10

【0223】

mRNAを、オリゴ(dT)-セルロースカラムを用いるAmersham Pharmacia Biotech mRNA精製キットを用いて、全RNAから調製する。

【0224】

ポリ-(A)+RNAの単離を、Dyna BeadsR (DynaI, Oslo, Norway)を用いて、製造業者のプロトコルの説明書に従って単離した。RNAまたはポリ(A)+RNAの濃度を決定した後、1/10容量の3M酢酸ナトリウムpH4.6および2倍量のエタノールを添加することによりRNAを沈降させ、-70 で保存した。

20

【0225】

ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギおよびコムギ

ダイズおよびアマの種子を鞘から分離し、種子および種子鞘cDNAライブラリーのための均一材料を作製した。組織を、乳鉢および乳棒を用いて液体N₂下で微細粉末に粉碎し、50 mlのチューブに移した。組織サンプルを、抽出を行うことができるまで-80 で保存した。

【0226】

イネの場合、5K-10Kの胚および内胚乳を、切開により単離した。組織を、切開の際は氷上の小さいチューブまたはペトリ皿に入れた。容器をドライアイス上に入れた後、-80 で保存した。

30

【0227】

トウモロコシの場合、組織を、乳鉢および乳棒を用いて液体N₂下で微細粉末に磨碎し、50 mlのチューブに移した。組織サンプルは、抽出を行うことができるまで-80 で保存した。

【0228】

オオムギの場合、所定の段階で小花を有するように、穂先(seed heads)を切断(約2インチの切片)した。その全ての芒を取り除いた。選択した段階は初期/中期種子充実であった。種子組織cDNAライブラリー穀粒は水状登熟期(watery ripe stage)または乳熟期であった。

【0229】

コムギの場合、Galeonコムギ種子の種子発芽サンプルを、20インチ x 12インチのフラット容器中、メトロミックスに2インチの深さに植えた。土壌を多量の水で湿らせ、次いで1日2回給水した。その子葉鞘が約1 cmになった3~4日後、実生を水で洗浄し、水を吸い取った。花のcDNAライブラリーを作製するために、等しい数の穂先を、2日間の各々において葉鞘から30%、60%および100%の穂先が出現したときに採取した。まだ葯は認められなかった。種子組織cDNAライブラリーを作製するために、穀粒は、穂先における穀粒の位置によって水状登熟期(watery ripe stage)または乳熟期であった。また後期種子発達段階については、穂先のみを収穫した。根のライブラリーについては、根のみを収穫した。植物は1つの主茎と3つの立派なひこばえ(tiller)を有していた。植物を鉢で成長させ、培地を洗浄除去し、根をこのサンプルについて保存した。植物は非処理であった。

40

50

【0230】

全RNAを、RNeasy Maxiキット(Qiagen)を用いて、製造業者のプロトコルに従って組織から抽出し、mRNAを、Oligotex mRNA精製システムキット(Qiagen)を用いて、これも製造業者のプロトコルに従って全RNAから処理した。各組織型由来のmRNAのcDNAライブラリーへのさらなる加工およびプラスミド中の同様の挿入物をハイブリダイゼーションパターンに基づいてクラスター化するその独自の工程における使用のために、Hyseq Pharmaceutical Incorporated社(Sunnyville, CA)にmRNAを送付した。

【0231】

実施例4：cDNAライブラリーの構築

cDNAライブラリーの構築のために、第1鎖合成を、マウス白血病ウイルス逆転写酵素(Roche, Mannheim, Germany)およびオリゴ-d(T)-プライマーを用いて達成し、第2鎖合成を、12 (2時間)、16 (1時間)および22 (1時間)でDNAポリメラーゼI、Klenow酵素およびRNAseH消化を用いるインキュベーションにより達成した。その反応を、65 (10分間)でのインキュベーションにより停止させ、その後、氷上に移した。二本鎖DNA分子を、37 (10分間)でT4-DNAポリメラーゼ(Roche, Mannheim)により平滑化した。ヌクレオチドを、フェノール/クロロホルム抽出およびSephadex G50スピンカラムにより除去した。EcoRIアダプター(Pharmacia, Freiburg, Germany)を、T4-DNAリガーゼ(Roche, 12、一晩)によりcDNAの末端に連結し、さらにポリヌクレオチドキナーゼ(Roche, 37、30分間)とのインキュベーションによりリン酸化した。この混合物を低融点アガロースゲル上での分離に掛けた。300塩基対より大きいDNA分子を、ゲルから溶出させ、フェノール抽出し、Elutip-D-カラム(SchleicherおよびSchuell, Dassel, Germany)上で濃縮し、ベクターアームに連結し、そしてGigapack Goldキット(Stratagene, Amsterdam, Netherlands)を用いて、その材料を用いてその製造業者の説明書に従って、ZAPIIファージまたはZAP-Expressファージ中にパックした。

【0232】

ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギおよびコムギのcDNAライブラリーは、Hyseq Pharmaceuticals Incorporated(Sunnyville, CA)にて作製された。発現情報を保持するために、ライブラリー製造においては増幅工程を用いなかった。Hyseqのゲノム法は、遺伝子をクラスターにグループ化し、その後、各クラスターからの代表的なメンバーを配列決定することを含む。cDNAライブラリーは、オリゴdTカラム精製されたmRNAから作製された。大腸菌へのcDNAライブラリーの形質転換から得たコロニーを無作為に拾い、cDNA挿入物をPCRにより増幅し、ナイロン膜上にスポットした。³²P-放射標識されたオリゴヌクレオチドのセットを、前記クローンにハイブリダイズさせ、得られたハイブリダイゼーションパターンについて、特定のクローンがどのクラスターに属するかを決定した。cDNAクローンおよびそのDNA配列を、トランスジェニック植物における過剰発現および本明細書に記載の他の分子生物学的プロセスにおける使用のために取得した。

【0233】

実施例5：FAD2様である目的のLMP遺伝子の同定シロイヌナズナ

野生型シロイヌナズナおよびシロイヌナズナfad2突然変異体を用いて、LMPをコードする遺伝子を同定した。FAD2遺伝子はクローニングされており、記載されている(J Okuley, J Lightner, K Feldmann, N Yadav, E Lark, & J Browse, Plant Cell 6:147-158, 1994)。FAD2は、ホスファチジルコリンに結合したオレイン酸(C18:1⁹)の12位に二重結合を挿入してリノール酸(C18:2^{9,12})を産生するミクロソームの脂肪酸6-デサチュラーゼ酵素をコードしており、この理由のために、12-デサチュラーゼとも呼ばれる。FAD2はシロイヌナズナゲノム中に単一遺伝子として存在する。

【0234】

ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギおよびコムギ

本実施例は、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギおよびコムギのFAD2様ポリペプチドをコードするcDNAクローンを同定および単離する方法を例示する。

【0235】

自社製データベース中でFAD2様遺伝子を同定するために、BLASTソフトウェア(Basic Local Alignment Search Tool, version 2.2.6、Altschulら、1997, Nucleic Acid Res. 25: 3389-3402)を用いる類似性解析を行った。e値カットオフ($1e-10$)を用いること以外はデフォルト設定を用い、全てのタンパク質の検索をBLOSUM62マトリックスを用いて行った。シロイヌナズナのFAD2ポリペプチドのアミノ酸配列をクエリーとして用いて、TBLASTNアルゴリズムを用いて、6つ全ての読み枠に翻訳されたダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギおよびコムギからのDNAデータベースに対して検索およびアラインさせた。BPS社内データベースでのそのような類似性解析により、多くのESTおよびcDNAコンティグが同定された。

10

【0236】

Hyseqのクラスター化プロセスから得られたRNA発現プロファイルデータを用いて、器官特異性を決定した。他の組織ライブラリーと比較して種子ライブラリーにおいてより多い発現を示すクローンを、LMP候補遺伝子として選択した。ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギおよびコムギのクローンを、その発現プロファイルに基づいて、シロイヌナズナおよび特定の作物植物における過剰発現のために選択した。

【0237】

実施例6：同定されたLMP遺伝子の完全長cDNAおよびオルソログのクローニング

シロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギまたはコムギに由来する完全長配列および部分的cDNAに対応するクローンを、社内の自社製Hyseqデータベース中で同定した。ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギおよびコムギの遺伝子のHyseqクローンを、ABI 377スラブゲル配列決定装置およびBigDye Terminator Ready Reactionキット(PE Biosystems, Foster City, CA)を用いてDNA Landmarks社にて配列決定した。配列アラインメントを行って、Hyseqクローンが完全長であるか部分的なクローンであるかを決定した。Hyseqクローンが部分的cDNAであると決定された場合、以下の手順を用いて完全長配列を単離した。完全長cDNAを、cDNA末端の5'および3'両方の迅速増幅(RACE)を可能にするClontech社製のSMART RACE cDNA増幅キットを用いるRACE PCRにより単離した。RACE PCRプライマーを、Hyseqクローン配列に基づいて設計した。完全長cDNAの単離および用いたRACE PCRプロトコルは製造業者の条件に基づくものであった。RACE産物断片を、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いてアガロースゲルから抽出し、製造業者の説明書に従ってTOPO pCR 2.1ベクター(Invitrogen)中に連結した。組換えベクターを、標準的な条件(Sambrookら、1989)を用いて、TOP10細胞(Invitrogen)中に形質転換した。形質転換細胞を、 $50 \mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含むLB寒天上で 37°C で一晩増殖させ、ブルーホワイトセクションのためにジメチルホルムアミド中のX-galの 40 mg/ml のストック溶液 $40 \mu\text{l}$ を加えて広げた。1個の白色のコロニーを選択し、これを用いて $50 \mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含む液体LB 3 mlに接種し、 37°C で一晩増殖させた。プラスミドDNAを、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)を製造業者の説明書に従って用いて抽出する。その後のクローン解析および制限マッピングを、標準的な分子生物学的技術(Sambrookら、1989)に従って実施した。

20

30

【0238】

完全長cDNAを単離し、以下の手順を用いることによりバイナリーベクター中にクローニングした。遺伝子特異的プライマーを、Hyseqクローンまたはその後のRACE増幅産物から得られた完全長配列を用いて設計した。完全長配列および遺伝子を、タッチダウンPCRを用いて、DNA鋳型としてHyseqクローンまたはcDNAライブラリーを用いて増幅した。ある場合には、プライマーを設計して、遺伝子開始コドンのすぐ上流に「AACA」Kozak様配列を追加し、またある場合には、下流の2塩基をGCに変化させて、遺伝子発現レベルの増加を促進した(Chandrashekharら、1997, Plant Molecular Biology 35:993-1001)。PCR反応サイクルは、 94°C で5分； 94°C で1分、 65°C で1分、 72°C で4分を9サイクル(ここでそのアニーリング温度はサイクル毎に1度ずつ低下させた)； 94°C で1分、 55°C で1分、 72°C で4分を20サイクルとし、このPCRサイクルは 72°C 、10分で終了させた。増幅したPCR産物を、GenE

40

50

lute-EtBrスピнкаラム(Sigma)を用いて1%アガロースゲルからゲル精製し、標準的な酵素消化の後、シロイヌナズナの形質転換のために植物バイナリーベクターpBPS-GB1中に連結した。バイナリーベクターをLB培地中、大腸菌DH5中で一晩増殖させることにより増幅させ、好適な抗生物質およびプラスミドをQiagen MiniPrep DNA調製キットを用いて下流の工程のために調製した。挿入物は、制限消化によってその大きさを判定することにより様々なクローニング工程を通じて確認し、挿入物を配列決定して、予定した遺伝子がシロイヌナズナの形質転換において用いられることを確実にした。

【0239】

遺伝子配列を用いて、cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーから相同遺伝子または異種遺伝子(オルソログ、別の植物に由来する同じLMP遺伝子)を同定することができる。これを、多重配列アラインメントにより同定された保存配列に対してPCRプライマーを設計することにより行った。オルソログは、しばしば、目的の遺伝子の完全長配列または部分配列に対する縮重プライマーを設計することにより、同定される。

10

【0240】

遺伝子配列を用いて、cDNAまたはゲノムライブラリーから相同体またはオルソログを同定することができる。相同遺伝子(例えば、完全長cDNAクローン)は、例えば、cDNAライブラリーを用いる核酸ハイブリダイゼーションによって単離することができる。目的の遺伝子の存在量に応じて、100,000から最大1,000,000個の組換えバクテリオファージをプレートティングし、ナイロン膜に転写する。アルカリによる変性後、DNAを、例えば、UV架橋により膜上に固定する。ハイブリダイゼーションを、高ストリンジェンシー条件で行う。水性溶液ハイブリダイゼーションおよび洗浄を1M NaClのイオン強度および68℃の温度で行う。ハイブリダイゼーションプローブを、例えば、放射性(³²P)ニック転写標識(High Prime, Roche, Mannheim, Germany)により作製する。シグナルをオートラジオグラフィーにより検出する。

20

【0241】

関連するが同一ではない、部分的に相同または異種性である遺伝子を、低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件および洗浄条件を用いる上記の手順と類似の手順で同定することができる。水性ハイブリダイゼーションのために、通常、イオン強度を1M NaClに保持し、温度は68℃から42℃に徐々に低下させる。

30

【0242】

(例えば、10~20アミノ酸の)明確なドメインにおいてのみ相同性(または配列同一性/類似性)を有する遺伝子配列の単離は、合成放射性標識オリゴヌクレオチドプローブを用いることにより行うことができる。放射性標識オリゴヌクレオチドを、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いる2つの相補的オリゴヌクレオチドの5'末端のリン酸化により調製する。その相補的オリゴヌクレオチドをアニリングさせ、連結してコンカテマーを形成させる。次いで、二本鎖コンカテマーを、例えば、ニック転写により放射標識する。ハイブリダイゼーションは通常、高いオリゴヌクレオチド濃度を用いて低ストリンジェンシー条件で行う。

40

【0243】

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション溶液:

6 x SSC

M リン酸ナトリウム

mM EDTA (pH 8)

0.5 % SDS

100 µg/ml 変性サケ精子DNA

% 脱脂粉乳

【0244】

ハイブリダイゼーションの際、温度は、推定オリゴヌクレオチドT_mを5~10℃下回る温度または室温まで段階的に低下させ、その後、洗浄工程およびオートラジオグラフィーを行う。洗浄を、4 x SSCを用いる3回の洗浄工程などの低ストリンジェンシーで行う。さら

50

なる詳細はSambrookら(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press)またはAusubelら(1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons)により記載されている。

【0245】

実施例7: 抗体を用いる発現ライブラリーのスクリーニングによる目的の遺伝子の同定

cDNAクローンを用いて、例えば大腸菌(例えば、Qiagen QIAexpress pQE系)において組換えタンパク質を産生させることができる。次いで、通常、組換えタンパク質をNi-NTAアフィニティークロマトグラフィー(Qiagen)によってアフィニティー精製する。組換えタンパク質を用いて、例えば、ウサギの免疫化のための標準技術を用いることにより、特異抗体を産生させることができる。抗体を、Guら(1994, Bio Techniques 17:257-262)により記載されたような組換え抗原で飽和したNi-NTAカラムを用いてアフィニティー精製する。次いで、その抗体を用いて発現cDNAライブラリーをスクリーニングして、免疫学的スクリーニングにより相同または異種遺伝子を同定することができる(Sambrookら、1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory PressまたはAusubelら、1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons)。

【0246】

実施例8: ノーザンハイブリダイゼーション

RNAハイブリダイゼーションのために、20 µgの全RNAまたは1 µgのポリ-(A)+RNAを、Amasino (1986, Anal. Biochem. 152:304)に記載のように、ホルムアルデヒドを用いる1.25%アガロースゲル中でのゲル電気泳動により分離し、正荷電ナイロン膜(Hybond N+, Amersham, Braunschweig)に10 x SSCを用いてキャピラリー吸引により移し、UV光により固定し、そしてハイブリダイゼーションバッファー(10%硫酸デキストランw/v、1M NaCl、1% SDS、100 µg/mlのニシン精子DNA)を用いて68 °Cで3時間、プレハイブリダイズさせる。Higprime DNA標識キット(Roche, Mannheim, Germany)を用いるDNAプローブの標識化を、³²P dCTP(Amersham, Braunschweig, Germany)を用いてプレハイブリダイゼーションの際に行う。ハイブリダイゼーションを、同じバッファー中に含めた標識DNAプローブを添加して68 °Cで一晩の後に行う。洗浄工程を、2 x SSCを用いて15分間を2回、そして1 x SSC、1% SDSを用いて68 °Cで30分間を2回行う。密閉したフィルターの曝露を、70 °Cで1~14日間行う。

【0247】

実施例9: DNA配列決定およびコンピューターによる機能解析

cDNAライブラリーを、標準的な方法に従って、特に、ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Germany)を用いるチェーンターミネーション法により、DNA配列決定に用いることができる。ランダム配列決定を、in vivo大量切り出しによるcDNAライブラリーからの予備的プラスミド回収、再形質転換、およびその後の寒天プレート上へのDH10Bのプレーティングに続いて行うことができる(材料およびプロトコルの詳細はStratagene, Amsterdam, Netherlandsからのものである)。プラスミドDNAを、アンピシリンを含むLuria-Broth培地中で増殖させた一晩増殖大腸菌培養物から調製することができる(Sambrookら(1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)を参照、Qiagene DNA調製ロボット(Qiagen, Hilden)上で、製造業者のプロトコルに従う)。配列を処理し、Bio-Max(Munich, Germany)により商業的に提供されるソフトウェアパッケージEST-MAXを用いてアノテーションを付すことができる。このプログラムはタンパク質配列の機能的および構造的特性評価にとって重要なバイオインフォマティクス方法を含む。参考のために、<http://pedant.mips.biochem.mpg.de>を参照されたい。

【0248】

EST-MAXに組込まれた最も重要なアルゴリズムは以下のものである。FASTA: 統計学的有意差の算出を伴う非常に高感度の高いタンパク質配列データベース検索(Pearson W.R. 1990, 「FASTPおよびFASTAを用いる迅速で高感度な配列比較(Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA)」、Methods Enzymol. 183:63-98)。BLAST: 統計学

的有意差の算出を伴う非常に高感度なタンパク質配列データベース検索(Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W.およびLipman D.J.「基本的な局所アラインメント検索ツール(Basic local alignment search tool)」, J. Mol. Biol. 215:403-410)。PREDATOR: 1個および複数の配列からの高い精度での二次構造予測(Frishman & Argos 1997, 「タンパク質二次構造予測における75%の精度(75% accuracy in protein secondary structure prediction)」, Proteins 27:329-335)。CLUSTALW: 多重配列アラインメント(Thompson, J.D., Higgins, D.G.およびGibson, T.J. 1994, 「CLUSTAL W: 配列加重、位置特異的ギャップペナルティおよび加重マトリックス選択による漸進的多重配列アラインメントの感度の改善(CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice)」, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680)。TMAP: 多重アラインメントされた配列からの膜貫通領域の予測(Persson B. & Argos P. 1994, 「多重配列アラインメントを用いるタンパク質における膜貫通セグメントの予測(Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments)」, J. Mol. Biol. 237:182-192)。ALOM2: 単独配列からの膜貫通領域の予測(Klein P., Kanehisa M., およびDeLisi C. 1984, 「配列特性からのタンパク質機能の予測: データベースの判別分析(Prediction of protein function from sequence properties: A discriminant analysis of a database.)」, Biochim. Biophys. Acta 787:221-226. Dr. K. Nakaiによるバージョン2)。PROSEARCH: PROSITEタンパク質配列パターンの検出(Kolakowski L.F. Jr., Leunissen J.A.M. およびSmith J.E. 1992, 「ProSearch: タンパク質の構造および機能に関連する標準発現パターンを用いるタンパク質配列の迅速な検索(ProSearch: fast searching of protein sequences with regular expression patterns related to protein structure and function.)」, Biotechniques 13:919-921)。BLIMPS: ギャップ無しブロックのデータベースに対する類似性検索(Wallace & Henikoff 1992, 「PATMAT: 配列、パターンおよびブロックエリー、ならびにデータベースのための検索および抽出プログラム(PATMAT: A searching and extraction program for sequence, pattern and block queries and data bases)」, CABIOS 8:249-254. Bill Alford)。

10

20

30

40

50

【0249】

実施例10: 植物形質転換のためのプラスミド

植物の形質転換のために、pBinARなどのバイナリーベクターを用いることができる(Hoefgen & Willmitzer 1990, Plant Sci. 66:221-230)。バイナリーベクターの構築は、T-DNAへのセンスまたはアンチセンス方向でのcDNAの連結により行うことができる。cDNAの5'側で植物プロモーターは該cDNAの転写を活性化する。ポリアデニル化配列は該cDNAの3'側に位置する。組織特異的発現を、組織特異的プロモーターを用いることにより達成することができる。例えば、種子特異的発現を、cDNAの5'側にナピンまたはLeB4またはUSPプロモーターをクローニングすることにより達成することができる。任意の他の種子特異的プロモーターエレメントを用いることもできる。全植物体での構成的発現のためには、CaMV 35Sプロモーターを用いることができる。発現させたタンパク質は、シグナルペプチドを用いて、細胞内区画、例えば、プラスチド、ミトコンドリアまたは小胞体へと標的化することができる(Kermode 1996, Crit. Rev. Plant Sci. 15:285-423)。シグナルペプチドは、cDNAの5'側に読み枠を合わせてクローニングして、その融合タンパク質の細胞内局在化を達成する。

【0250】

用いた植物バイナリーベクターは、例えば、LMP遺伝子候補がクローニングされているpBPS-GB007、pSUN2-GWまたはpBPS-GB047ベクターである。これらのバイナリーベクターは、AtAct2-1プロモーターおよびUSPもしくは他の種子特異的プロモーターまたは構成的プロモーターの制御下で駆動される抗生物質耐性遺伝子を、NOSpAターミネーターもしくはOCSターミネーターを付加した候補遺伝子の直前に含む。部分的または完全長LMP cDNAを、植物バイナリーベクターのマルチクローニング部位中、USPまたは種子特異的または他の種子特異的もしくは構成的プロモーターの後ろに、センスまたはアンチセンス方向でクロー

ーニングする。異なる作物種に用いることができるさらなるプロモーターが、実施例11に記載のaloである。

【0251】

目的の遺伝子を含む組換えベクターを、標準的な条件を用いてTop10細胞(Invitrogen)中に形質転換する。形質転換細胞を、50 µg/mlカナマイシンを含むLB寒天上で選択し、37℃で一晩増殖させる。プラスミドDNAを、QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)を製造業者の説明書に従って用いて抽出する。その後のクローンの分析および制限マッピングは、標準的な分子生物学の技術に従って行う(Sambrookら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。

10

【0252】

実施例11：アグロバクテリウムを媒介する植物形質転換

本明細書に記載のLMP核酸を用いるアグロバクテリウム媒介植物形質転換を、標準的な形質転換および再生技術を用いて行うことができる(Gelvin, Stanton B. & Schilperoort R.A, Plant Molecular Biology Manual、第2版、Kluwer Academic Publ., Dordrecht 1995 in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur:BT11-P; Glick, Bernard R.およびThompson, John E. Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, S. 360, CRC Press, Boca Raton 1993)。例えば、アグロバクテリウム媒介形質転換を、GV3(pMP90) (Koncz & Schell, 1986, Mol. Gen. Genet. 204:383-396)またはLBA4404 (Clontech)アグロバクテリウム・ツメファシエンス株を用いて行うことができる。

20

【0253】

シロイヌナズナを、標準的な条件(Bechtold 1993, Acad. Sci. Paris. 316:1194-1199; Bentら、1994, Science 265: 1856-1860)に従って増殖および形質転換させることができる。さらに、ナタネを、子葉または胚軸の形質転換によって本発明のLMR核酸を用いて形質転換することができる(Moloneyら、1989, Plant Cell Report 8:238-242; De Blockら、1989, Plant Physiol. 91:694-701)。アグロバクテリウムおよび植物の選択のための抗生物質の使用は、形質転換に用いられるバイナリーベクターおよびアグロバクテリウム株に依存する。通常、ナタネの選択は、植物選択マーカーを用いて行う。さらに、アマへのアグロバクテリウム媒介遺伝子導入を、例えば、Mlynarovaら(1994, Plant Cell Report 13:282-285)により記載された技術を用いて行うことができる。

30

【0254】

シロイヌナズナのFAD2またはFAD2様遺伝子を、バイナリーベクター中にクローニングし、形質転換し、さらにそれを、スーパープロモーター(Stanton B. Gelvin, 米国特許第5,428,147号および第5,217,903号)のような構成的プロモーター、またはピシア・ファバ由来のUSP(未知種子タンパク質; unknown seed protein)(Baeumleinら、1991, Mol. Gen. Genetics 225:459-67)のような種子特異的プロモーター、またはレグミンB4プロモーター(LeB4; Baeumleinら、1992, Plant J. 2:233-239)、ならびにトウモロコシ、オオムギ、コムギ、ライムギ、イネなどの単子葉植物における種子特異的発現を付与するプロモーターを用いて発現させることができる。

40

【0255】

シロイヌナズナAHAS(AtAHAS)遺伝子を、これらの構築物における選択マーカーとして用いることができた。

【0256】

ダイズの形質転換を、例えば、EP 0424047、米国特許第5,322,783号(Pioneer Hi-Bred International)もしくはEP 0397687、米国特許第5,376,543号もしくは米国特許第5,169,770号(University Toledo)に記載の技術を用いて、または当技術分野で公知の多数の他の形質転換法のいずれかにより行うことができる。ダイズ種子を、連続的に振とうしながら室温にて4分間にわたり70%エタノールにより、次いで、連続的に振とうしながら20分間にわたり0.05%(v/v)tweenを添加した20%(v/v)Cloroxにより、表面を滅菌する。次いで、種子を蒸留水で4回すすぎ、ペトリ皿中の湿らせた滅菌濾紙上に室温にて6~39時間、置

50

く。種皮を剥いて除去し、子葉を胚軸から分離する。胚軸を調べて、分裂組織領域が損傷されていないことを確認する。切り出された胚軸を、半開きの滅菌ペトリ皿中に集め、さらに使用するまで密閉したペトリ皿中で、含水量が20%未満(生重量)になるまで空気乾燥させる。

【0257】

その植物形質転換法を、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、アマおよび他の作物に適用することもできる。具体的には、カノーラの種子を、連続的に振とうしながら室温で4分間にわたり70%エタノールにより、次いで、連続的に振とうしながら室温で20分間にわたり0.05%(v/v)tweenを添加した20%(v/v)Cloroxにより、表面を滅菌する。次いで、種子を蒸留水で4回すすぎ、ペトリ皿中の湿らせた滅菌濾紙上に室温にて18時間、置く。種皮を除去し、種子を半開きの滅菌ペトリ皿中で一晚、空気乾燥する。この期間の間に、種子はその含水量の約85%を失う。次いで、その種子を、さらに使用するまで密閉されたペトリ皿中に、室温で保存する。

10

【0258】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス培養物を、LB固体培地+好適な抗生物質(例えば、100 mg/mlストレプトマイシン、50 mg/mlカナマイシン)中で、1個のコロニーから調製し、その後、液体LB培地中でこの1個のコロニーを600 nmでの光学密度が0.8になるまで増殖させる。次いで、細菌培養物を室温で7分間、7000 rpmでペレット化し、100 mMアセトシリンゴンを補給したMS(Murashige & Skoog 1962, *Physiol. Plant.* 15: 473-497)培地中に再懸濁する。細菌培養物を、使用前に室温で2時間、この前誘導培地中でインキュベートする。含水量が約44%のダイズ接合種子胚の軸を、前誘導されたアグロバクテリウム懸濁培養物により室温で2時間吸収膨潤させる(アグロバクテリウムの培養物による乾燥胚の吸収膨潤はトウモロコシ胚軸にも適用可能である)。胚を吸収膨潤培養物から除去し、2%スクロースを補給した固体MS培地を含むペトリ皿に移し、暗黒下、室温で2日間インキュベートする。あるいは、胚をペトリ皿中の湿らせた(液体MS培地)滅菌濾紙の上に置き、上記と同じ条件下でインキュベートする。この期間の後、胚を、500 mg/lカルベニシリンもしくは300 mg/lセフォタキシムを補給した固体または液体MS培地に移して、アグロバクテリアを死滅させる。液体培地を用いて、滅菌濾紙を湿らせる。胚を、 $440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下および12時間の光周期で、25℃で4週間インキュベートする。一旦、実生が根を生じたら、これらを滅菌したメトロミックス土壌に移す。in vitro植物の培地を洗浄除去した後、植物を土壌に移す。植物をプラスチックカバー下で1週間保持して、順化プロセスを助ける。次いで、植物を生育室に移し、そこで植物を $440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度下および12時間の光周期で、25℃にて約80日間インキュベートする。

20

30

【0259】

一次トランスジェニック植物(T_0)のサンプルをPCRにより分析して、T-DNAの存在を確認する。これらの結果を、DNAを1%アガロースゲル上で電気泳動し、正荷電ナイロン膜(Roche Diagnostics)に移すサザンハイブリダイゼーションにより確認する。PCR DIG Probe Synthesis Kit(Roche Diagnostics)を用いて、製造業者により推奨されるようにして、PCRによりジゴキシゲン標識されたプローブを調製する。

【0260】

単子葉植物の形質転換のための例として、構成的または種子特異的プロモーターをトウモロコシ・ユビキチンイントロンおよびFAD2もしくはFAD2様核酸分子と組合わせて用いることができる。例えば、pUC中のPtxA-FAD2オルソログ遺伝子構築物を、PacIおよびXmaIで消化する。pBPSMM348を、PacIおよびXmaIで消化して、トウモロコシ・ユビキチンイントロン(ZmUbiイントロン)を単離した後、電気泳動およびQIAEX II Gel Extraction Kit(カタログ番号20021)を用いる。ZmUbiイントロンを、pUC中のPtxA-FAD2またはFAD2様核酸分子に連結して、pUCベースのPtxA-ZmUbiイントロン-FAD2またはFAD2様核酸分子構築物を作製した後、AfeIおよびPmeIで制限酵素消化を行う。PtxA-ZmUbiイントロンFAD2またはFAD2様遺伝子カセットを、電気泳動後にSeaplaque低融点アガロースゲル(SeaPlaque(登録商標)GTG(登録商標)Agaroseカタログ番号50110)から切り出すことができる。選択マーカーカ

40

50

セットを含む単子葉性基本ベクター(単子葉植物基本ベクター)を、PmeIで消化する。種子特異的プロモーター-ZmUbiイントロンを含むFAD2またはFAD2様核酸分子発現カセットを、該単子葉植物基本ベクターに連結する。続いて、構築物を、当技術分野における一般的なプロトコルに従うエレクトロポレーションを用いて、pSB1(スーパーvirプラスミド)を含む組換えLBA4404株に形質転換する。トウモロコシにおけるアグロバクテリウム媒介形質転換を、米国特許第5,591,616号に記載のプロトコルに従って、未成熟胚を用いて行う。イミダゾリノン除草剤選択を適用して、トランスジェニックトウモロコシ系を取得する。

【0261】

トウモロコシにおいて用いられるプロモーターの例はまた、トウモロコシの内胚乳に認められる貯蔵タンパク質群であるゼインである。ゼイン遺伝子のゲノムクローンが単離されており(Pedersenら、Cell 29:1015-1026, 1982)、15 kD、16 kD、19 kD、22 kD、27 kD 遺伝子を含むこれらのクローンに由来するプロモーターを用いることもできる。トウモロコシ中で機能することが知られる他のプロモーターは、デンプン合成酵素、分枝酵素、脱分枝酵素、オレオシン、グルテリンおよびスクロース合成酵素である。トウモロコシの内胚乳発現のための特に好ましいプロモーターは、イネ由来のグルテリン遺伝子のプロモーター、より具体的には、Osgt-1プロモーターである(Zhengら、Mol. Cell Biol. 13:5829-5842, 1993)。

10

【0262】

コムギにおける発現にとって好適なプロモーターの例としては、ADPグルコースピロシンターゼサブユニット、顆粒結合型の他のデンプン合成酵素、分枝酵素および脱分枝酵素、胚形成時蓄積タンパク質(embryogenesis-abundant protein)、グリアジンおよびグルテニンのプロモーターが挙げられる。

20

【0263】

オオムギにおける発現にとって好適なプロモーターの例としては、ADPグルコースピロシンターゼサブユニット、顆粒結合型の他のデンプン合成酵素、分枝酵素および脱分枝酵素、スクロース合成酵素、ホルディン、胚グロブリンおよびアリュエロン特異的タンパク質のプロモーターが挙げられる。

【0264】

ダイズにおける発現にとって好適なプロモーターの例としては、本明細書に既に記載したプロモーターが挙げられる。さらに、用いることができる他のプロモーターは、ダイズ7Sプロモーターおよびダイズの7S コングリシニンプロモーターである。

30

【0265】

一般的には、USPなどの植物プロモーター下のイネ(もしくは他の単子葉植物)FAD2遺伝子またはFAD2様遺伝子を、トウモロコシ、または別の作物植物中に形質転換して、単子葉植物FAD2遺伝子の他の単子葉植物中での効果、または双子葉植物FAD2遺伝子の他の双子葉植物中での効果、または双子葉植物中での単子葉植物遺伝子の効果もしくはその逆の場合の効果を生じさせることができる。これらのFAD2またはFAD2様コード配列、5'側のプロモーターおよび3'側のターミネーターを含むプラスミドを、本明細書で他のプラスミドの構築について記載されたものと同様の様式で構築することができる。イネにおける発現にとって好適なプロモーターの例としては、ADPグルコースピロシンターゼサブユニット、顆粒結合型の他のデンプン合成酵素、分枝酵素、脱分枝酵素、スクロース合成酵素およびグルテリンのプロモーターが挙げられる。特に好ましいプロモーターは、イネグルテリンOsgt-1のプロモーターである。

40

【0266】

実施例12: in vivoでの突然変異誘発

微生物のin vivoでの突然変異誘発を、遺伝学的情報の完全性を維持する能力が損なわれた大腸菌または他の微生物(例えば、パチルス spp. もしくはサッカロミセス・セレビシエなどの酵母)によるプラスミド(または他のベクター)DNAの取り込みおよび継代により実施することができる。典型的な突然変異誘発株は、DNA修復系に関する遺伝子(例えば、mutHLS、mutD、mutTなど; 参考のために、Rupp W.D. 1996, DNA repair mechanisms, in: Es

50

cherichia coli and Salmonella, p. 2277-2294, ASM: Washingtonを参照されたい)に突然変異を有する。そのような株は当業者にはよく知られている。そのような株の使用は、例えば、GreenerおよびCallahan 1994, Strategies 7:32-34に例示されている。突然変異したDNA分子の植物への導入は、微生物における選択および試験の後に行うのが好ましい。トランスジェニック植物を、本明細書での例証範囲内の様々な例に従って作製する。

【0267】

実施例13：形質転換生物における組換え遺伝子産物のmRNA発現および活性の評価

形質転換された宿主生物における組換え遺伝子産物の活性を、転写および/または翻訳レベルで測定することができる。遺伝子の転写レベル(遺伝子産物への翻訳に利用可能なmRNAの量の指標)を確認するための有用な方法は、目的の遺伝子に結合するように設計されたプライマーを、検出可能なタグ(通常は、放射活性もしくは化学発光性のもの)で標識して用いるノーザンブロット(参考のために、Ausubelら、1988, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New Yorkを参照されたい)を行って、生物の培養物の全RNAを抽出し、ゲル上で泳動し、安定なマトリックスに転写し、このプローブと共にインキュベートする場合には、プローブの結合および結合量が、この遺伝子のmRNAの存在およびまたその量を示すようにすることである。この情報は、少なくとも部分的には、形質転換した遺伝子の転写の程度を示す。全細胞RNAを植物の細胞、組織または器官から、いずれも当技術分野でよく知られたいくつかの方法、例えば、Bormannら(1992, Mol. Microbiol. 6:317-326)に記載のものにより、調製することができる。

【0268】

このmRNAから翻訳されたタンパク質の存在または相対量を評価するために、ウェスタンブロットなどの標準的な技術を用いることができる(例えば、Ausubelら、1988, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New Yorkを参照)。このプロセスにおいては、全細胞タンパク質を抽出し、ゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースなどのマトリックスに転写し、所望のタンパク質に特異的に結合する(抗体などの)プローブと共にインキュベートする。一般的には、このプローブを、容易に検出することができる化学発光または比色標識を用いてタグ付けする。得られた標識の存在および量は、細胞中に存在する所望の突然変異タンパク質の存在および量を示す。

【0269】

DNAに結合するLMPの活性を、DNAバンドシフトアッセイ(ゲル遅延アッセイとも呼ばれる)などのいくつかの十分確立された方法により測定することができる。他の分子の発現に対するそのようなLMPの効果を、リポーター遺伝子アッセイ(Kolmar H.ら、1995, EMBO J. 14:3895-3904およびそこに引用された参考文献に記載のものなど)を用いて測定することができる。リポーター遺伝子試験系はよく知られており、 β -ガラクトシダーゼ、グリーン蛍光タンパク質、およびいくつかの他のものなどの酵素を用いる原核および真核細胞の両方における適用のために確立されている。

【0270】

脂質代謝膜輸送タンパク質の活性の測定を、Gennis R.B. (1989 「生体膜における孔、チャンネルおよび輸送因子(Pores, Channels and Transporters, in Biomembranes)」、Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, pp. 85-137, 199-234および270-322)に記載のものなどの技術に従って行うことができる。

【0271】

実施例14：トランスジェニック植物におけるシロイヌナズナ、ダイズ、イネ、トウモロコシ、アマ、オオムギもしくはコムギのFAD2またはFAD2様遺伝子の機能のin vitroでの分析

酵素の活性および速度論的パラメーターの測定は、当技術分野でよく確立されている。任意の所与の変化した酵素の活性を測定するための実験を、野生型酵素の比活性に合わせなければならないが、これは当業者の能力の範囲内にある。一般的な酵素に関する概説、ならびに多くの酵素活性の測定のための構造、反応速度論、原理、方法、適用および例に関する具体的な詳細は、例えば、以下の参考文献：Dixon, M. & Webb, E.C. 1979, Enzymes. Longmans: London; Fersht, (1985) 「酵素の構造および機構(Enzyme Structure and

Mechanism.)」、Freeman: New York; Walsh (1979) 「酵素反応機構(Enzymatic Reaction Mechanisms.)」、Freeman: San Francisco; Price, N.C., Stevens, L. (1982) 「酵素学の基礎(Fundamentals of Enzymology.)」、Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D. (編)、(1983) 「酵素(The Enzymes)」、第3版、Academic Press: New York; Bisswanger, H., (1994) Enzymkinetik, 第2版、VCH: Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Graßl, M.(編)、(1983-1986) 「酵素分析の方法(Methods of Enzymatic Analysis)」、第3版、vol. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim;ならびにUllmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987) vol. A9, Enzymes. VCH: Weinheim, p. 352-363に見出すことができる。

【0272】

10

実施例15：所望の種子貯蔵化合物の産生に対する組換えタンパク質の影響の分析

種子油の変化に関する例として、形質転換されたシロイヌナズナ植物から得た種子を、脂肪酸プロファイルについてガスクロマトグラフィー(GC)により分析した。図10および図11中の各バーは、野生型もしくはfad2突然変異体の1つの植物またはfad2突然変異体バックグラウンドでの1つの独立したトランスジェニック事象の5 mgの多量の種子を用いて得られた値を表す。図10に示されるように、シロイヌナズナのfad2突然変異体は、オレイン酸(C18:1)の含量の、野生型における16%からfad2突然変異体における約60%への増加を示した。同様に、リノール酸(C18:2)の割合は、野生型における約31%からfad2突然変異体における2%へと激減している。イネ遺伝子OsFAD-01(配列番号17)を用いて形質転換されたシロイヌナズナfad2突然変異体種子は、分離しているT2種子集団においてさえ、野生型組成に対し、fad2突然変異体バックグラウンドでのいくつかの独立したトランスジェニック系統(図10中の事象FAD1172、FAD1214、FAD1246およびFAD1294を参照)においては脂肪酸パターンの回復を示した。事象FAD0503、FAD0483、FAD0475およびFAD0465について図11に示されるように、オオムギ遺伝子HvFAD-01(配列番号23)を用いて類似する応答が得られた。この結果は、イネ(OsFAD-01)およびオオムギ(HvFAD-01)遺伝子の両方が、種子の脂肪酸プロファイルに関してfad2シロイヌナズナ突然変異体を相補することができることを示しており、これは脂肪酸デサチュラーゼとしてのそれらの機能を示している。本願で示された様々な作物植物に由来する全ての他の脂肪酸デサチュラーゼ遺伝子は、同様にfad2シロイヌナズナ突然変異体バックグラウンドにおいても類似する応答を示した(データは示さない)。

20

30

【0273】

所望の種子貯蔵化合物(糖、脂質もしくは脂肪酸など)に対する植物中の遺伝的改変の効果、最適な条件下で改変された植物を成長させ、所望の産物(すなわち、脂質もしくは脂肪酸)の産生の増加について種子もしくは任意の他の植物器官を分析することにより評価することができる。そのような分析技術は当業者にはよく知られており、分光分析、薄層クロマトグラフィー、各種染色方法、酵素的および微生物学的方法、ならびに高速液体クロマトグラフィーなどの分析的クロマトグラフィーが挙げられる(例えば、Ullman 1985, 「工業化学の百科事典(Encyclopedia of Industrial Chemistry)」、vol. A2, pp. 89-90および443-613, VCH: Weinheim; Fallon, A.ら、1987, 「生化学におけるHPLCの適用(Applications of HPLC in Biochemistry)」、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehmら、1993 「生成物の回収および精製(Product recovery and purification)」、Biotechnology, vol. 3, Chapter III, pp. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A.ら、1988 「生物分離：バイオテクノロジーのための下流プロセッシング(Bioseparations: downstream processing for biotechnology)」、John Wiley & Sons; Kennedy J.F. & Cabral J.M.S. 1992, 「生物材料のための回収プロセス(Recovery processes for biological materials)」、John WileyおよびSons; Shaeiwitz J.A. & Henry J.D. 1988, 「生化学的分離(Biochemical separations)」、Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 「バイオテクノロジーにおける分離および精製技術(Separation and purification techniques in biotechnology)」、vol. B3, Chapter 11, pp. 1-27, VCH: Weinheim;ならびにDechow F.J. 1989を参照)。

40

50

【 0 2 7 4 】

上記の方法とは別に、植物の脂質をCahoonら(1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 22:12935-12940)およびBrowseら(1986, Anal. Biochemistry 442:141-145)により記載されたようにして植物材料から抽出する。定性的および定量的な脂質または脂肪酸の分析は、Christie, William W., 「脂質方法論における進歩(Advances in Lipid Methodology.)」、Ayr/Scotland:Oily Press. - (Oily Press Lipid Library; Christie, William W., 「ガスクロマトグラフィーと脂質(Gas Chromatography and Lipids.)」 A Practical Guide - Ayr, Scotland:Oily Press, 1989 Repr. 1992. - IX, 307 S. - (Oily Press Lipid Library; ならびに「脂質研究における進歩(Progress in Lipid Research)」、Oxford :Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977)「脂肪および他の脂質CODENの化学における進歩(Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN)」に記載されている。 10

【 0 2 7 5 】

脂肪酸生成物の存在の明確な証拠を、標準的な分析手順: Christieおよびそ仔に記載の参考文献(1997, Advances on Lipid Methodology 第4版: Christie, Oily Press, Dundee, pp. 119-169; 1998)により様々に記載されたようなGC、GC-MSまたはTLCに従ったトランスジェニック植物の分析により、取得することができる。詳細な方法は、葉についてはLemieuxら(1990, Theor. Appl. Genet. 80:234-240)により、および種子についてはFocks & Benning (1998, Plant Physiol. 118:91-101)により記載されている。

【 0 2 7 6 】

グリセロール骨格のsn-1、sn-2またはsn-3位での脂肪酸組成の位置分析を、リパーゼ消化により決定する(例えば、Siebertz & Heinz 1977, Z. Naturforsch. 32c:193-205, およびChristie 1987, Lipid Analysis、第2版、Pergamon Press, Exeter, ISBN 0-08-023791-6を参照)。 20

【 0 2 7 7 】

総種子油レベルを、任意の好適な方法により測定することができる。種子油含量の定量は、近赤外分析(NIR)または核磁気共鳴画像化(NMR)などの従来の方法を用いて行われることが多い。NIR分光分析は、目的のサンプルがこの技術に対してなじみ易い場合はいつでも、種子サンプルをスクリーニングするための標準的な方法になってきている。試験したサンプルとしては、カノーラ、ダイズ、トウモロコシ、コムギ、イネ、およびその他が挙げられる。単一の種子のNIR分析を用いることができる(例えば、Velascoら、「近赤外反射分光分析による、ナタネ(*Brassica napus* L.)の無傷の単一の種子における種子重量、油含量および脂肪酸組成の評価(Estimation of seed weight, oil content and fatty acid composition in intact single seeds of rapeseed by near-infrared reflectance spectroscopy)」、Euphytica, Vol. 106, 1999, pp. 79-85を参照)。また、NMRは、種子中の油含量を分析するのに用いられてきた(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする、Robertson & Morrison, 「ワイドラインNMRによるヒマワリ種子の油含量の分析(Analysis of oil content of sunflower seed by wide-line NMR)」、Journal of the American Oil Chemists Society, 1979, Vol. 56, 1979, pp. 961-964を参照)。 30

【 0 2 7 8 】

脂質および糖の生合成経路に対するタンパク質活性の増加または減少の影響に関する情報を収集するための典型的な方法は、例えば、 ^{14}C -酢酸または ^{14}C -ピルビン酸を用いる葉または種子を用いた標識試験による炭素フラックスの分析によるものである(例えば、Focks & Benning 1998, Plant Physiol. 118:91-101; Eccleston & Ohlrogge 1998, Plant Cell 10:613-621を参照)。炭素14の脂質および水溶性成分への分布を、 ^{14}C -スクロースおよび ^{14}C -リンゴ酸などの標準品を含むそれぞれの分離(例えば、TLCプレート上での)後、液体シンチレーション計測することにより決定することができる(Eccleston & Ohlrogge 1998, Plant Cell 10:613-621)。 40

【 0 2 7 9 】

分析しようとする材料を、超音波処理、硝子ミル、液体窒素および粉碎により、または 50

他の適用可能な方法により分解することができる。材料は、分解後に遠心分離する必要がある。沈殿物を蒸留水に再懸濁し、100℃で10分間加熱し、氷上で冷却し、再び遠心分離した後、2%ジメトキシプロパンを含むメタノール中の0.5M硫酸中、90℃で1時間抽出し、それにより油および脂質化合物の加水分解を誘導し、トランスメチル化された脂質を得る。これらの脂肪酸メチルエステルを、石油エーテル中で抽出し、最終的に170℃~240℃の温度勾配で20分間および240℃で5分間、キャピラリーカラム(Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0.32 mm)を用いるGC分析にかける。得られる脂肪酸メチルエステルが何であるかは、商業的な供給源(すなわち、Sigma)から入手可能な標準品の使用により特徴付ける。

【0280】

標準品が入手可能ではない脂肪酸の場合、分子が何であるかは、誘導体化およびその後のGC-MS分析によって示す。例えば、三重結合脂肪酸の局在を、4,4'-ジメトキシ-オキサゾリン-デリバテン(Christie, Oily Press, Dundee, 1998)による誘導体化の後のGC-MSによって示す。

【0281】

糖類、特に、デンプンを分析するための一般的な標準的方法は、Stitt M., Lilley R.M c.C., Gerhardt R.およびHeldt M.W. (1989,「植物の葉の特定の細胞および細胞内区画における代謝物レベルの測定(Determination of metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves)」、Methods Enzymol. 174:518-552; 他

【0282】

可溶性の糖類およびデンプンの抽出のために、50個の種子を1.5 mlのポリプロピレン試験管中、500 µlの80% (v/v) エタノール中でホモジナイズし、70℃で90分間インキュベートする。16,000 gで5分間遠心分離した後、上清を新しい試験管に移す。ペレットを500 µlの80%エタノールを用いて2回抽出する。1つに混合した上清の溶媒を減圧下、室温で蒸発させる。残渣を50 µlの水に溶解し、これは可溶性の炭水化物画分となる。デンプンなどの不溶性炭水化物を含むエタノール抽出で残ったペレットを、200 µlの0.2N KOH中でホモジナイズし、その懸濁液を95℃で1時間インキュベートしてデンプンを溶解させる。35 µlの1N酢酸を添加した後、16,000 gで5分間遠心分離し、上清をデンプンの定量に用いる。

【0283】

可溶性糖類を定量するために、10 µlの糖抽出物を100 mMイミダゾール、pH 6.9、5 mM MgCl₂、2 mM NADP、1 mM ATP、および2ユニット/2 mlのグルコース-6-P-デヒドロゲナーゼを含む990 µlの反応バッファーに添加する。グルコース、フルクトースおよびスクロースの酵素的測定のために、4.5ユニットのヘキソキナーゼ、1ユニットのホスホグルコイソメラーゼ、および2 µlの飽和フルクトシダーゼ溶液を連続的に添加する。NADPHの産生を、340 nmの波長で測光分析によりモニターする。同様に、デンプンを、Boehringer Mannheim社製のキットを用いて、30 µlの不溶性炭水化物画分中でアッセイする。

【0284】

葉および種子中のタンパク質含量の分析例を、Bradford M.M. (1976,「タンパク質染料結合の原理を用いる、マイクログラム量のタンパク質の定量のための迅速かつ感受性の高い方法(A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding)」、Anal. Biochem. 72:248-254)により見出すことができる。全種子タンパク質の定量のために、15~20個の種子を、1.5 mlのポリプロピレン試験管中の250 µlのアセトン中でホモジナイズする。16,000 gで遠心分離した後、上清を廃棄し、減圧乾燥したペレットを、50 mM Tris-HCl, pH 8.0、250 mM NaCl、1 mM EDTA、および1% (w/v) SDSを含む250 µlの抽出バッファー中に再懸濁する。25℃で2時間インキュベートした後、ホモジェネートを16,000 gで5分間遠心分離し、200 mlの上清をタンパク質測定に用いることができる。このアッセイにおいては、

10

20

30

40

50

-グロブリンを校正に用いる。タンパク質測定のために、Lowry DCタンパク質アッセイ(Bio-Rad)またはBradfordアッセイ(Bio-Rad)を用いる。

【0285】

ヘキソキナーゼおよびフルクトキナーゼの酵素アッセイを、Renzら(1993, Planta 190: 156-165)に従って分光光度的に行い、ホスホグルコイソメラーゼ、ATP依存的6-ホスホフルクトキナーゼ、ピロリン酸依存的6-ホスホフルクトキナーゼ、フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセラル-3-Pデヒドロゲナーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、エノラーゼおよびビルビン酸キナーゼの酵素アッセイは、Burrellら(1994, Planta 194:95-101)に従って行い、さらにUDP-グルコース-ピロホスホリラーゼの酵素アッセイは、Zrennerら(1995, Plant J. 7:97-107)に従って行う。

【0286】

グルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、ホスホエノールビルビン酸、ビルビン酸、およびATPなどの炭水化物代謝の中間体を、Haertelら(1998, Plant Physiol. Biochem. 36:407-417)に記載のようにして測定し、代謝物をJelittoら(1992, Planta 188:238-244)に記載のようにして測定する。

【0287】

種子貯蔵最終化合物(すなわち、脂質、デンプンもしくは貯蔵タンパク質)の測定に加えて、中間体および副生成物などの所望の種子貯蔵化合物の産生に用いられる代謝経路の他の構成要素を分析して、該化合物の産生の全体の効率を決定することもできる(Fiehnら、2000, Nature Biotech. 18:1447-1161)。

【0288】

例えば、本明細書に開示された核酸、またはその断片を含む酵母発現ベクターを構築し、標準的なプロトコルを用いてサッカロミセス・セレビスエ中に形質転換することができる。次いで、得られるトランスジェニック細胞を、糖、油、脂質または脂肪酸含量における変化についてアッセイすることができる。

【0289】

同様に、本明細書に開示された核酸、またはその断片を含む植物発現ベクターを構築し、標準的なプロトコルを用いて、シロイヌナズナ、ダイズ、ナタネ、イネ、トウモロコシ、コムギ、タルウマゴヤシ(Medicago truncatula)などの好適な植物細胞中に形質転換することができる。次いで、得られるトランスジェニック細胞および/またはそれから誘導される植物を、糖、油、脂質または脂肪酸含量における変化についてアッセイすることができる。

【0290】

さらに、本明細書に開示された配列、またはその断片を用いて、細菌、哺乳動物細胞、酵母細胞、および植物細胞などの様々な生物のゲノム中にノックアウト突然変異を生じさせることができる(Girkeら、1998, Plant J. 15:39-48)。次いで、得られるノックアウト細胞を、それらの種子貯蔵化合物に関する組成および含量、ならびにその突然変異の表現型および/または遺伝子型に対する効果について評価することができる。遺伝子不活性化の他の方法としては、米国特許第6004804号、「非キメラ突然変異ベクター(Non-Chimeric Mutational Vectors)」およびPuttarajuら(1999, 「遺伝子治療のための道具としてのスプライセオソーム媒介RNAトランススプライシング(Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy)」、Nature Biotech. 17:246-252)が挙げられる。

【0291】

実施例16：形質転換生物からの所望の生成物の精製

LMPは、当技術分野でよく知られる様々な方法により植物材料から回収することができる。植物の器官を、他の組織または器官から機械的に分離した後、該植物器官から種子貯蔵化合物を単離することができる。組織をホモジェナイズした後、細胞破片を遠心分離により除去し、可溶性タンパク質を含む上清画分を所望の化合物のさらなる精製のために保持する。生成物が培養増殖させた細胞から分泌される場合、該細胞を低速遠心分離により

培養物から除去し、上清画分をさらなる精製のために保持する。

【0292】

いずれかの精製方法に由来する上清画分を好適な樹脂を用いるクロマトグラフィーにかけ、その際、所望の分子はクロマトグラフィー樹脂上に保持される一方でサンプル中の不純物の多くは保持されないか、または不純物は樹脂により保持されるがサンプルは保持されない。そのようなクロマトグラフィー工程を、同じかまたは異なるクロマトグラフィー樹脂を用いて、必要に応じて繰り返す。当業者であれば、好適なクロマトグラフィー樹脂の選択、および精製しようとする特定の分子にとって最も有効なその適用について、熟知しているであろう。精製された生成物は、濾過または限外濾過により濃縮し、該生成物の安定性が最大化される温度で保存することができる。

10

【0293】

当技術分野で公知の様々な精製方法があり、前記の精製方法は限定的であることを意味しない。そのような精製技術は、例えば、Bailey J.E. & Ollis D.F. 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill:New Yorkに記載されている。

【0294】

単離された化合物の正体および純度を、当技術分野で標準的な技術により評価することができる。これらのものとしては、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、分光分析法、染色法、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどの分析的クロマトグラフィー、NIRS、酵素アッセイ、または微生物アッセイが挙げられる。そのような分析方法は、Patekら(1994, *Appl. Environ. Microbiol.* 60:133-140)、Malakhovaら(1996, *Biotechnologia* 11:27-32)およびSchmidtら(1998, *Bioprocess Engineer* 19:67-70)、Ulmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry* (1996, Vol. A27, VCH: Weinheim, p. 89-90, p. 521-540, p. 540-547, p. 559-566, 575-581およびp. 581-587)ならびにMichal G. (1999, *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John WileyおよびSons; Fallon, A.ら、1987, 「生化学におけるHPLCの適用(*Applications of HPLC in Biochemistry*)」、*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 17)に概説されている。

20

【0295】

実施例17：マイクロRNA前駆体を操作することによる遺伝子発現の下方調節

マイクロRNA(miRNA)は植物および動物における遺伝子発現の、進化的に保存されたRNAに基づく調節因子として明らかになってきた。miRNA(約21~25 nt)は、非タンパク質コード遺伝子から転写されるステムループ構造を有するより大きい前駆体から生じる。miRNAは特定のmRNAを標的として、転写後レベル(すなわち、mRNAを分解する)または翻訳レベル(すなわち、タンパク質合成を阻害する)で遺伝子発現を抑制する(Bartel D 2004, *Cell* 116, 281-297)。

30

【0296】

miRNA前駆体(プレmiRNA)を、プレmiRNAによりコードされる内因性miRNAがmiRNAにより置換されて目的の遺伝子、例えば、dsRedリポーター遺伝子を標的とするように操作することができる。

【0297】

トウモロコシのmiR166前駆体を、遺伝子操作のために選択した。miR166前駆体をコードするヌクレオチド配列を、配列番号47に記載する。2つのバイナリー発現構築物を、複数部位Gatewayクローニング手法(Invitrogen, Carlsbad, CA)により作製した。配列番号41に記載のRLM323は、ScBV(サトウキビ桿菌様バドナウイルス)プロモーターおよびNOS(ノパリン合成酵素)ターミネーターの制御下にある、対照の、すなわち天然のトウモロコシmiR166発現であった。配列番号42に記載のRLM325は、前駆体中の配列番号37および配列番号38に記載の天然のmiR166(5' tcggaccaggcttcattcccc 3')を、配列番号39に記載のdsRed標的化miRNA(5' ttgtagatgaagcagccgtcc 3')により置換したこと以外は、RLM323と同一であった。miR dsRedはdsRed mRNAの3'領域と相補的である。

40

【0298】

50

RLM323およびRLM325を、アグロバクテリアを介して、既にバイナリーベクターRLM185を担持するホモ接合体トウモロコシSDM10828中に形質転換し、ScBVプロモーターおよびNOSターミネーターの制御下でdsRedを発現させた。RLM323を担持する3個の独立したT0事象、およびRLM325を担持する29個の独立したT0事象からの葉のサンプルを収集した。次いで、このサンプルを、dsRed蛍光を検出する設定下で、Typhoon 9400(General Engineering)画像システムを用いて分析した。RLM325事象に由来する蛍光強度は、対照であるRLM323事象に由来する強度と比較して90%以上低下した。

【0299】

RLM325事象におけるmiR dsRedの産生を、ノーザンブロット分析において確認した。約21ヌクレオチドの特定バンドは、miR dsRedに相補的な放射標識プローブを用いて、RLM325において検出されたが、RLM323(対照)事象では検出されなかった。RLM325事象におけるdsRed mRNAの減少(ほぼ90%)を、対照RLM323と比較してqRT-PCRにより確認した。総合すれば、これらのデータは、miRNA前駆体を遺伝子操作して目的の遺伝子へと標的化することができることを示していた。

10

【0300】

脂肪酸デサチュラーゼをコードするトウモロコシ遺伝子を、種子などの多くの組織中で発現させる。mRNA中のトウモロコシデサチュラーゼコード領域または5'UTRおよび3'UTRに相補的な19~21ヌクレオチド(例えば、配列番号40に記載のACCAGACCCCGAACGCCGC)を用いて、Zm miR166前駆体中の配列番号37および配列番号38に記載のZm miR166(5' tcggaccag gcttcattcccc 3')を置換する。次いで、トランスジーンをトウモロコシ中に形質転換することができる。遺伝子操作されたZm miR166遺伝子の発現を、トウモロコシの種子特異的プロモーター(例えば、内胚乳特異的10 kDゼインプロモーターまたはGlob1胚特異的プロモーター)により制御することができる。

20

【0301】

マイクロRNA(例えば、配列番号40に記載のACCAGACCCCGAACGCCGC)は、遺伝子操作したZm miR166前駆体を処理する場合、種子中で生成させる。このmiRNAは、miRNAに相補的なトウモロコシ脂肪酸デサチュラーゼmRNA中の領域に特異的に結合し、これは遺伝子サイレンシング機構により種子中で転写または翻訳レベルでのこの標的化トウモロコシ・デサチュラーゼ発現の減少をもたらす。結果として、トランスジェニックトウモロコシは、例えば、種子中の低いリノレン酸レベルおよび/または中程度もしくは高いオレイン酸レベルのような望ましい脂肪酸レベルおよび組成を有することができた。

30

【0302】

実施例18：種子の大きさの増加に対するスクリーニング

FAD2および作物FAD2様遺伝子の条件付き発現は、種子の大きさの増加をもたらす。FAD2もしくはFAD2様遺伝子を発現するトランスジェニックシロイヌナズナまたは作物植物が作製される。野生型より大きい種子を有するトランスジェニック植物は、顕微鏡を用いることにより同定される。さらに、種子の重量をトランスジェニック系統について測定する。例えば、fad2突然変異体種子は、野生型と比較して種子重量の20%の減少を示した。独立のシロイヌナズナトランスジェニック系統であるpFAD2RT-7およびpFAD2RT-5の分離したT2種子世代において、100個の種子の重量はそれぞれ30%および40%増加した。ホモ接合性T3種子においては、種子重量は空のベクター対照と比較して最大60%増加した(データは示さない)。種子重量の増加は、シロイヌナズナにおけるFAD2遺伝子過剰発現体の種子の大きさの増加を反映していた。種子の大きさの増加は、多くの経済的に重要な作物植物におけるより多い収量をもたらす。従って、種子の大きさの増加は、本明細書に記載のFAD2またはFAD2様核酸分子を用いる遺伝子操作および選択の1つの目標である。

40

【表 1】

植物脂質クラス

中性脂質	トリアシルグリセロール (TAG)
	ジアシルグリセロール (DAG)
	モノアシルグリセロール (MAG)
極性脂質	モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)
	ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)
	ホスファチジルグリセロール (PG)
	ホスファチジルコリン (PC)
	ホスファチジルエタノールアミン (PE)
	ホスファチジルイノシトール (PI)
	ホスファチジルセリン (PS)
	スルホキノボシルジアシルグリセロール

10

【 0 3 0 3 】

【表 2】

共通する植物脂肪酸

16:0	パルミチン酸
16:1	パルミトレイン酸
16:3	パルミトレン酸
18:0	ステアリン酸
18:1	オレイン酸
18:2	リノール酸
18:3	リノレン酸
γ -18:3	γ -リノレン酸*
20:0	アラキン酸
20:1	エイコセン酸
22:6	ドコサヘキサエン酸 (DHA) *
20:2	エイコサジエン酸
20:4	アラキドン酸 (AA) *
20:5	エイコサペンタエン酸 (EPA) *
22:1	エルカ酸

20

30

【 0 3 0 4 】

これらの脂肪酸は、通常、植物の種子油中には生じないが、トランスジェニック植物の種子油中のそれらの生成は植物バイオテクノロジーにおいて重要である。

【表 3】

FAD2様LMPの推定機能の表(完全長核酸配列は、配列コードを用いる添付物A中に見出すことができる)

配列番号	配列名	種	機能	ORF位置
1	AtFAD-01	シロイヌナズナ	ω -6脂肪酸デサチュラーゼ、 小胞体 (FAD2) / Δ -12デサチュラーゼ	157-1305
5	GmFAD-01	ダイズ	ω -6脂肪酸デサチュラーゼ、 小胞体 (FAD2) / Δ -12デサチュラーゼ	115-1275
9	GmFAD-02	ダイズ	ω -6脂肪酸デサチュラーゼ、 小胞体 (FAD2) / Δ -12デサチュラーゼ	96-1244
13	GmFAD-03	ダイズ	ω -6脂肪酸デサチュラーゼ、 小胞体 (FAD2) / Δ -12デサチュラーゼ	96-749
17	ZmFAD-01	トウモロコシ	トウモロコシ Δ -12デサチュラーゼ fad2-2	176-1351
21	OsFAD-01	イネ	推定 Δ -12オレイン酸デサチュラーゼ	150-1313
25	LuFAD-01	アマ	Δ -12脂肪酸デサチュラーゼ	48-1070
29	HvFAD-01	オオムギ	推定 Δ -12オレイン酸デサチュラーゼ	25-1185
33	TaFAD-01	コムギ	推定 Δ -12オレイン酸デサチュラーゼ	165-1325

10

20

【0305】

当業者であれば、ルーチンに過ぎない実験を用いて、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識し、または確認することができるであろう。そのような等価物は、本明細書に開示され、請求された本発明の特許請求の範囲により包含されるものと意図される。

【0306】

付属書A

図1A：配列番号1-AtFAD-01の核酸配列。

【0307】

図1B：配列番号3-AtFAD-01のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0308】

図1C：配列番号4-AtFAD-01のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【0309】

図2A：配列番号5-GmFAD-01の核酸配列。

【0310】

図2B：配列番号7-GmFAD-01のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0311】

図2C：配列番号8-GmFAD-01のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【0312】

図3A：配列番号9-GmFAD-02の核酸配列。

【0313】

図3B：配列番号11-GmFAD-02のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0314】

図3C：配列番号12-GmFAD-02のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【0315】

図4A：配列番号12-GmFAD-03の核酸配列。

【0316】

30

40

50

図4B：配列番号15-GmFAD-03のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0317】

図4C：配列番号16-GmFAD-03のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【0318】

図5A：配列番号17-ZmFAD-01の核酸配列。

【0319】

図5B：配列番号19-ZmFAD-01のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0320】

図5C：配列番号20-ZmFAD-01のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【0321】

図6A：配列番号21-OsFAD-01の核酸配列。

【0322】

図6B：配列番号23-OsFAD-01のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0323】

図6C：配列番号24-OsFAD-01のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【0324】

図7A：配列番号25-LuFAD-01の核酸配列。

【0325】

図7B：配列番号27-LuFAD-01のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0326】

図7C：配列番号28-LuFAD-01のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【0327】

図8A：配列番号29-HvFAD-01の核酸配列。

【0328】

図8B：配列番号31-HvFAD-01のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0329】

図8C：配列番号32-HvFAD-01のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【0330】

図9A：配列番号33-TaFAD-01の核酸配列。

【0331】

図9B：配列番号35-TaFAD-01のオープンリーディングフレームの核酸配列。

【0332】

図9C：配列番号36-TaFAD-01のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列。

【図面の簡単な説明】

【0333】

【図1】図1A-Dは、配列番号1～4- シロイヌナズナ遺伝子AtFAD-01の核酸配列、該核酸のオープンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図2】図2A-Cは、配列番号5～8- ダイズ遺伝子GmFAD-01の核酸配列、該核酸のオープンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図3】図3A-Cは、配列番号9～12- ダイズ遺伝子GmFAD-02の核酸配列、該核酸のオープンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図4】図4A-Cは、配列番号13～16- ダイズ遺伝子GmFAD-03の核酸配列、該核酸のオープンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図5】図5A-Cは、配列番号17～20- トウモロコシ遺伝子ZmFAD-01の核酸配列、該核酸のオープンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図6】図6A-Cは、配列番号21～24- イネ遺伝子OsFAD-01の核酸配列、該核酸のオープンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図7】図7A-Cは、配列番号25～28- アマ遺伝子LuFAD-01の核酸配列、該核酸のオープンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図8】図8A-Cは、配列番号29～32- オオムギ遺伝子HvFAD-01の核酸配列、該核酸のオー

10

20

30

40

50

ブンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図 9】図9A-Cは、配列番号33~36- コムギ遺伝子TaFAD-01の核酸配列、該核酸のオープンリーディングフレームおよびアミノ酸配列を示す。

【図 10】図10は、USPプロモーターにより駆動され、fad2シロイヌナズナ突然変異体中に形質転換されたOsFAD-01を用いて得られたT2種子脂肪酸データである(形質転換された系統の遺伝的バックグラウンドはColumbia-2であり、各バーは1つの個別の植物の5 mgの大量の種子を用いて得られた脂肪酸データを表す)。

【図 11】図11は、USPプロモーターにより駆動され、fad2シロイヌナズナ突然変異体中に形質転換されたHvFAD-01を用いて得られたT2種子脂肪酸データである(形質転換された系統の遺伝的バックグラウンドはColumbia-2であり、各バーは1つの個別の植物の5 mgの大量の種子を用いて得られた脂肪酸データを表す)。

10

【図 12】図12は、開示されたAtFAD-01、GmFAD-01、GmFAD-02、GmFAD-03、LuFAD-01、HvFAD-01、TaFAD-01、OsFAD-01およびZmFAD-01のアミノ酸配列間の相対相同性を示す図である。この図は、Vector NTI Suite 9.0のAlign X (Aug.22, 2003)を用いて作製されたものであった。多重アラインメントに用いたパラメーターは以下の通りであった：ギャップ開始ペナルティ：10；ギャップ伸長ペナルティ：0.05；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40。

【図 13】図13は、AtFAD-01、GmFAD-01、GmFAD-02、GmFAD-03、LuFAD-01、HvFAD-01、TaFAD-01、OsFAD-01およびZmFAD-01のアミノ酸配列間の類似性を示す表である。この表は、Vector NTI Suite 9.0のAlign X (Aug.22, 2003)を用いて作製されたものであった。他のパラメーターについては、図12の説明を参照されたい。

20

【図 14】図14は、開示されたAtFAD-01、GmFAD-01、GmFAD-02、GmFAD-03、LuFAD-01、HvFAD-01、TaFAD-01、OsFAD-01およびZmFAD-01の核酸配列間の相対相同性を示す図である。この図は、Vector NTI Suite 9.0のAlign X (Aug.22, 2003)を用いて作製されたものであった。多重アラインメントに用いたパラメーターは以下の通りであった：ギャップ開始ペナルティ：15；ギャップ伸長ペナルティ：6.66；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40。

【図 15】図15は、AtFAD-01、GmFAD-01、GmFAD-02、GmFAD-03、LuFAD-01、HvFAD-01、TaFAD-01、OsFAD-01およびZmFAD-01の核酸配列間の類似性を示す表である。この表は、Vector NTI Suite 9.0のAlign X (Aug.22, 2003)を用いて作製されたものであった。他のパラメーターについては、図12の説明を参照されたい。

30

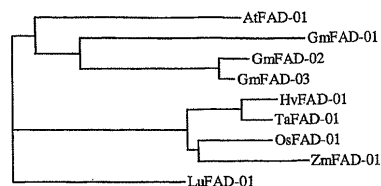
【図 16 - 1】図16は、AtFAD-01、GmFAD-01、GmFAD-02、GmFAD-03、LuFAD-01、HvFAD-01、TaFAD-01、OsFAD-01およびZmFAD-01のアミノ酸配列の配列アラインメントである。このアラインメントは、Vector NTI Suite 9.0のAlign X (Aug.22, 2003)を用いて作製されたものであった。多重アラインメントに用いたパラメーターは以下の通りであった：ギャップ開始ペナルティ：15；ギャップ伸長ペナルティ：6.66；ギャップ分離ペナルティレンジ：8；アラインメント遅延に対する同一性%：40。

【図 16 - 2】図16-1の続きである。

【図 16 - 3】図16-2の続きである。

MWYSKYLNNPGRVLTLAVTLTGWPLYAFNVSGRPYDRFACHYDPYGPISDRERLQIYISDAGV
 AVCYGLFCLAMAKGLAWVVCYVGVPLLVVGFLVLITFLQHTHPALPHYTSSEWDWLRGALATVDPR
 YGILNKVFNHNTDTHVAHHLFSTMPHYHAMEATKAIPILGEYYRFDGTFVKAMWREARECIYVEPD
 QSTQSGKGVFWYNNKL

MGAGGGMTEKEREQEQLGRAGGGAARFQSPDKPFTLGQIKAIPPHCFORSIIKSFSYVVDLVL
IAALLYAALWIIPTLPTLQLGAWPLVYVVGQCMWGVWVIAHECGHAFSDYSLDVLDTGLVLHSLW
LVSPFYSWKYSRRHHHSNTGSLDERAEVFGQKALAWYTPYVNNPIGRVLVLDLTLGWPLYLALN
AGSPRYPSRACHFDYPGIYNDRQAFQISFDVGLAVSLALLKLVSFFGFWWVVRVYGVPLLVNAW
LVLIUQLQHTHATPLPHYDSTEDWDLGALAMTODRGLNRYFNHNTDTHVAHLLFSNNPHYHAMEA
TKAIPLIEGYEYCFDTPVAKATWREAKEIYVEDPRKGRVFWYSNKF



【図 16 - 1】

1 50

配列番号 2 (1) MGAGGRMPVPTSSKKS-----E--TDTTK-RVPCEKPPFSVGLDKKAIP

配列番号 6 (1) -----

配列番号 10 (1) MGAGGRTDVPPFANRKS-----E--VDPLK-RVPFEKPPFSVGLDKKAIP

配列番号 14 (1) -----

配列番号 26 (1) -----MSVPPSSKPKM-----RSPYSKPPFSVGLDKKAIP

配列番号 18 (1) MGAGGRMTEKEREKHEQEDVARATGGGAQVRSVPVEKPPFSVGLDKKAIP

配列番号 30 (1) MGAGGGMTEKEREKQE--QLGRAGGGAQVRSPTKPPFSVGLDKKAIP

配列番号 34 (1) MGAGGRMTEKEREKQE--QLGRANGGAAYQVRSPTKPPFSVGLDKKAIP

配列番号 22 (1) MGAGGRMTEKEREKQK--LLGRAGNGAAVQVRSPTKPPFSVGLDKKAIP

51 100

配列番号 2 (42) PHCFKRSIPRSFSYLSIDIIASCFFYYATNYSLLPQPLSYLAWPLYWA

配列番号 6 (1) -----MSYVRLDQIVVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 10 (42) PHCFQRSIFRSFSYVRLDQIVVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 14 (1) -----

配列番号 26 (31) PHCFKRSIPRSFQAYDQITIAIFYYIATTFHLLPSPLNYLAWPLYWA

配列番号 18 (51) PHCFERSQLRSFSYVAHLDQITIAIFYYIATTFHLLPSPLNYLAWPLYWA

配列番号 30 (48) PHCFQRSIIISFSYVRLDQIVVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 34 (48) PHCFQRSIIISFSYVRLDQIVVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 22 (49) PHCFQRSIIISFSYVRLDQIVVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

101 150

配列番号 2 (92) CQGCVLTCGIWVIAHECGHHAFSDYQWLLDVTGLIFHSFLLVPYFSWKYSH

配列番号 6 (33) AQGCVLTCGIWVIAHECGHHAFSDYQWLLDVTGLIFHSFLLVPYFSWKYSH

配列番号 10 (92) VQGCVLTCGIWVIAHECGHHAFSDYQWLLDVTGLIFHSFLLVPYFSWKYSH

配列番号 14 (1) -----

配列番号 26 (81) CQGCVLTCGIWVIAHECGHHAFSDYQWLLDVTGLIFHSFLLVPYFSWKYSH

配列番号 18 (101) AQGCVLTCGIWVIAHECGHHAFSDYQWLLDVTGLIFHSFLLVPYFSWKYSH

配列番号 30 (98) VQGCVLTCGIWVIAHECGHHAFSDYQWLLDVTGLIFHSFLLVPYFSWKYSH

配列番号 34 (98) VQGCVLTCGIWVIAHECGHHAFSDYQWLLDVTGLIFHSFLLVPYFSWKYSH

配列番号 22 (99) AQGCVLTCGIWVIAHECGHHAFSDYQWLLDVTGLIFHSFLLVPYFSWKYSH

151 200

配列番号 2 (142) RRHHSNTGSLERDEVFVFKQKSAIKWYKYLIN-NPLGRIMMLTVQFVW

配列番号 6 (83) RTHHQNHGHNDENDESHPLPEKIFKSLDNVTR--ILR---FTLPPFVW

配列番号 10 (142) RRHHSNTGSLERDEVFVFKQKSAIKWYKYLIN-NPPGRVTLAVTLVW

配列番号 14 (1) -----MWYSKYLIN-NPPGRVTLAVTLVW

【図 16 - 3】

配列番号 2 (339) ILGDYYQFDGTPWYVAMYREAKECIYVEPDREGDKKGVYWNKL-----

配列番号 6 (273) ILGQYYREPKKSSPFIYLIQELLRSKKDHFPVSDSGDIVYQTDPTLSS

配列番号 10 (339) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDQSTQSKGVYWNKL-----

配列番号 14 (174) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDQSTQSKGVYWNKL-----

配列番号 26 (324) RRSSRSQSGSITSSMGLPL-----

配列番号 18 (349) ILGQYYQFDPTPVAKATQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 30 (346) ILGQYYQFDGTPVAKATQREAKECIYVEPDNR--KGVWYNSKPF-----

配列番号 34 (346) ILGQYYQFDPTPVAKATQREAKECIYVEPDNR--KGVWYNSKPF-----

配列番号 22 (347) ILGQYYQFDPTPVAKATQREAKECIYVEPDNR--KGVWYNSKPF-----

401

配列番号 2 (384) -----

配列番号 6 (323) SSTSQ

配列番号 10 (384) -----

配列番号 14 (219) -----

配列番号 26 (342) -----

配列番号 18 (393) -----

配列番号 30 (388) -----

配列番号 34 (388) -----

配列番号 22 (389) -----

【図 16 - 2】

配列番号 2 (151) RRHHSNTGSLERDEVFVFKQKSAIKWYKYLIN-NPPGRVTLAVTLVW

配列番号 18 (151) RRHHSNTGSLERDEVFVFKQKSAIKWYKYLIN-NPPGRVTLAVTLVW

配列番号 30 (148) RRHHSNTGSLERDEVFVFKQKSAIKWYKYLIN-NPPGRVTLAVTLVW

配列番号 34 (148) RRHHSNTGSLERDEVFVFKQKSAIKWYKYLIN-NPPGRVTLAVTLVW

配列番号 22 (149) RRHHSNTGSLERDEVFVFKQKSAIKWYKYLIN-NPPGRVTLAVTLVW

201 250

配列番号 2 (191) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 6 (128) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 10 (191) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 14 (26) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 26 (180) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 18 (201) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 30 (198) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 34 (198) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

配列番号 22 (199) ILGQYYRFDETFFVKAMQREABECIYVEPDNEN--KGVWYNSKPF-----

251 300

配列番号 2 (241) RYAAACMASMICLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 6 (174) GLGFVMPVQCKLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 10 (241) RYAAACMASMICLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 14 (76) CLAMAKMASMICLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 26 (230) RYAAACMASMICLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 18 (251) RYAAACMASMICLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 30 (248) RYAAACMASMICLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 34 (248) RYAAACMASMICLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

配列番号 22 (249) RYAAACMASMICLGVLLIVNAFVGLVAAAYLN-----NGLVWPLYWA

301 350

配列番号 2 (289) WLRGALATVDRDYGILNKVFHNITTHVAHFLSTMPHYHAMEAKAIF

配列番号 6 (224) WLRGALATVDRDYGILNKVFHNITTHVAHFLSTMPHYHAMEAKAIF

配列番号 10 (289) WLRGALATVDRDYGILNKVFHNITTHVAHFLSTMPHYHAMEAKAIF

配列番号 14 (124) WLRGALATVDRDYGILNKVFHNITTHVAHFLSTMPHYHAMEAKAIF

配列番号 26 (278) TGCEAFSRP---WIETTCSTPCSSTPSISRTSSSPRCITRWRL

配列番号 18 (299) WLRGALATVDRDYGILNKVFHNITTHVAHFLSTMPHYHAMEAKAIF

配列番号 30 (296) WLRGALATVDRDYGILNKVFHNITTHVAHFLSTMPHYHAMEAKAIF

配列番号 34 (296) WLRGALATVDRDYGILNKVFHNITTHVAHFLSTMPHYHAMEAKAIF

配列番号 22 (297) WLRGALATVDRDYGILNKVFHNITTHVAHFLSTMPHYHAMEAKAIF

351 400

【配列表】

2008523821000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/046027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/82 C12N9/02 A01H5/00		
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 A01H		
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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, EMBL, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 794 250 A (SOREMARTEC S.A.; FERRERO S.P.A) 10 September 1997 (1997-09-10) figures 2,5; sequences 1-4 -----	1-12, 16-21
X	WO 98/56922 A (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY; HITZ, WILLIAM, D) 17 December 1998 (1998-12-17) figure 1; examples 5-8; sequences 3,4 -----	1-12, 16-21
X	WO 01/85968 A (BIORIGINAL FOOD & SCIENCE CORP) 15 November 2001 (2001-11-15) figures 1,3; example 4; sequences 3,4 -----	1-12, 16-21
X	WO 01/25453 A (HER MAJESTY IN RIGHT OF CANADA AS REPRESENTED BY THE MINISTER OF AGRIC) 12 April 2001 (2001-04-12) page 62 - page 63; figure 9 -----	1-12, 16-21
-/-		
<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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 June 2006		Date of mailing of the international search report 29. 11. 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 Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/046027

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ISAACSON T ET AL: "Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 14, February 2002 (2002-02), pages 333-342, XP002968365 ISSN: 1040-4651 the whole document -& DATABASE EMBL [Online] 20 March 2002 (2002-03-20), "Lycopersicon esculentum carotenoid isomerase (CRTISO) gene, complete cds." XP002385540 retrieved from EBI accession no. EM PRO:AF416727 Database accession no. AF416727 the whole document</p>	1-9
X	<p>----- DATABASE EMBL [Online] 13 July 1998 (1998-07-13), "Borago officinalis delta-12 fatty acid desaturase mRNA, complete cds." XP002385541 retrieved from EBI accession no. EM PRO:AF074324 Database accession no. AF074324 the whole document</p>	1-9
A	<p>----- TOMITA R ET AL: "Transgene overexpression with cognate small interfering RNA in tobacco" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 573, no. 1-3, 27 August 2004 (2004-08-27), pages 117-120, XP004536211 ISSN: 0014-5793 the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/046027**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Invention 1: claims 1-12, 16-21, all partially and insofar as applicable

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2005/046027

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-12, 16-21, all partially and insofar as applicable

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of
 X<1> X<2> X<3> LX<4> X<5> X<6> X<7> LX<8> X<9> PX<10> YL,
 whereas X<1> is not M and X<3> is not T and X<6> is not F and X<7> is not V, isolated nucleic acids encoding said polypeptide, uses thereof

Inventions 2 to 11: claims 1-12, 16-21, all partially and insofar as applicable

An isolated polypeptide, isolated nucleic acids encoding said polypeptide, uses thereof, wherein in each separate invention the polypeptide is represented by the following sequence:

- 2) GX<11> X<12> X<13> X<14> X<15> X<16> X<17> X<18> HX<19> X<20> PX<21> X<22> X<23> X<24> X<25> X<26> X<27> X<28> ER, whereas X<15> is not G and X<20> is not F and X<21> is not N and X<22> is not A,
- 3) HX<29> X<30> PX<31> X<32> X<33> X<34> X<35> X<36> X<37> X<38> ER, whereas X<30> is not F and X<31> is not N and X<32> is not A,
- 4) LX<31> X<40> X<41> X<42> X<43> X<44> X<45> GX<46> X<47> X<48> X<49> X<50> X<51> X<52> YX<53> X<54> P, whereas X<41> is not Y and X<45> is not Q and X<48> is not S and X<49> is not M and X<50> is not I,
- 5) TX<55> X<56> X<57> X<58> HX<59> X<60> X<61> X<62> X<63> X<64> X<65> X<66> X<67> X<68> X<69> X<70> X<71> T, whereas X<67> is not N, and
- 6) PX<72> X<73> X<74> X<75> X<76> X<77> X<78> X<79> X<80> X<81> X<82> X<83> X<84> X<85> X<86> , whereas X<84> is not W and X<85> is not Y and X<86> is not V, and whereas X has the meaning of any amino acid if not defined elsewhere above
- 7) AWYT
- 8) PYX<87> YNNPX<88> GRLVHIX<89> VQLTLGWPLYLAX<90> NX<91> SGRPYPRFACHFDPIYNDRE,
- 9) FISDVG,
- 10) ALX<92> KLX<93> SX<94> FGFWWVVRVYGVP,
- 11) ILGEYYQFDX<95> TPVAKAT

Inventions 12 to 27: claims 1-12, 16-21, all partially and insofar as applicable

International Application No. PCT/US2005/046027

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An isolated polypeptide, isolated nucleic acids encoding said polypeptide, uses thereof, wherein in each separate invention the polypeptide is represented by the following sequence:

- 12) SEQ ID NO: 6,
- 13) SEQ ID NO: 8,
- 14) SEQ ID NO: 10,
- 15) SEQ ID NO: 12,
- 16) SEQ ID NO: 14,
- 17) SEQ ID NO: 16,
- 18) SEQ ID NO: 18,
- 19) SEQ ID NO: 20,
- 20) SEQ ID NO: 22,
- 21) SEQ ID NO: 24,
- 22) SEQ ID NO: 26,
- 23) SEQ ID NO: 28,
- 24) SEQ ID NO: 30,
- 25) SEQ ID NO: 32,
- 26) SEQ ID NO: 34,
- 27) SEQ ID NO: 36

Invention 28: claims 13-15

An isolated nucleic acid represented by the sequence shown in SEQ ID NO: 47, uses thereof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/046027

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0794250	A	10-09-1997	AU 718602 B2	20-04-2000
			AU 1498497 A	11-09-1997
			US 6025172 A	15-02-2000
WO 9856922	A	17-12-1998	AU 7958698 A	30-12-1998
			BR 9815537 A	16-01-2001
			DE 69828161 D1	20-01-2005
			DE 69828161 T2	01-12-2005
			EP 0977866 A1	09-02-2000
			US 5846784 A	08-12-1998
WO 0185968	A	15-11-2001	AU 6416101 A	20-11-2001
			CA 2408357 A1	15-11-2001
WO 0125453	A	12-04-2001	AU 7502200 A	10-05-2001
			CA 2284246 A1	01-04-2001
			EP 1222290 A2	17-07-2002
			US 2003150020 A1	07-08-2003

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 ギブソン, ジャーメイン

アメリカ合衆国 2 7 6 1 2 ノースカロライナ州, ローリー, ハムステッド クロッシング ド
ライブ 5 5 3 8

(72)発明者 レン, ペイフェン

アメリカ合衆国 2 7 5 1 9 ノースカロライナ州, カリー, ウェッジメアー ストリート 2 0
6

F ターム(参考) 2B030 AB03 AD08 CA14 CB02

4B024 AA08 BA08 BA79 CA04 DA01 EA01 EA04 FA02 GA11

4B050 CC03 DD13 LL05 LL10