

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6453315号  
(P6453315)

(45) 発行日 平成31年1月16日 (2019. 1. 16)

(24) 登録日 平成30年12月21日 (2018. 12. 21)

(51) Int. Cl.

F I

A O 1 H 1/00 (2006. 01)

A O 1 H 1/00 Z N A A

C 1 2 N 15/29 (2006. 01)

C 1 2 N 15/29

A O 1 H 5/00 (2018. 01)

A O 1 H 5/00 A

C O 7 K 14/32 (2006. 01)

C O 7 K 14/32

C O 7 K 14/415 (2006. 01)

C O 7 K 14/415

請求項の数 10 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2016-514302 (P2016-514302)  
 (86) (22) 出願日 平成26年5月23日 (2014. 5. 23)  
 (65) 公表番号 特表2016-522686 (P2016-522686A)  
 (43) 公表日 平成28年8月4日 (2016. 8. 4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/001403  
 (87) 国際公開番号 W02014/187571  
 (87) 国際公開日 平成26年11月27日 (2014. 11. 27)  
 審査請求日 平成28年10月20日 (2016. 10. 20)  
 (31) 優先権主張番号 13002691.7  
 (32) 優先日 平成25年5月23日 (2013. 5. 23)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 513029954  
 ノマド・バイオサイエンス・ゲーエムベ  
 ハー  
 ドイツ国 80333 ミュンヘン, テュ  
 ルケンシュトラッセ 16  
 (74) 代理人 110000855  
 特許業務法人浅村特許事務所  
 (72) 発明者 テュムラー、アンカ  
 ドイツ連邦共和国、ハレ (ザーレ)、アイ  
 ヒェンドルフシュトラッセ 35  
 (72) 発明者 バルテルス、ドレーン  
 ドイツ連邦共和国、ケーテン (アンハルト  
 )、ライプツィヒ シュトラッセ 59

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物に非生物的ストレス抵抗性をもたらす方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の植物に乾燥ストレス耐性向上をもたらす方法であって、

(a) 前記複数の植物を圃場で生育させるステップと、

(b) 乾燥ストレスが前記植物に影響を及ぼすかどうかを判定するステップと、

(c) 目的のヌクレオチド配列を含有する核酸構築物を含む核酸分子を含むアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液を前記植物の地上部に供給するステップであって、目的の前記ヌクレオチド配列が前記植物において発現されると前記植物に乾燥ストレス抵抗性増加をもたらす上記ステップと

を含む上記方法。

【請求項 2】

前記植物に影響を及ぼす乾燥ストレスの存在又は不在が、次の基準：土壌の水分状態、植物の組織内の水分状態、植物水分ストレス指数、膨圧又は気孔コンダクタンス、及び土壌若しくは植物中の水ポテンシャルの1つ又は複数を用いて判定される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

目的の前記ヌクレオチド配列が、前記植物(単数又は複数)に前記乾燥ストレス耐性増加をもたらすことができるタンパク質をコードする、請求項1又は2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

前記タンパク質が、

i . 配列番号 2、4、6、8、12、14、18、20、及び 22 のアミノ酸配列のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有する、又は

ii . 配列番号 2、4、6、8、12、14、18、20、及び 22 のいずれか 1 つのアミノ酸配列全体と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、又は

iii . 配列番号 2、4、6、8、12、14、18、及び 20 のいずれか 1 つのアミノ酸残基数の少なくとも 90 % の長さの、且つ、かかる長さにわたってそれぞれ配列番号 2、4、6、8、12、14、18、及び 20 と少なくとも 90 % の配列同一性のアミノ酸配列を有する、又は

iv . 配列番号 2、4、6、8、12、14、18、20、及び 22 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と比較して 1 ~ 10 のアミノ酸付加、置換若しくは欠失を有するアミノ酸配列を有する、

請求項 3 に記載の方法。

#### 【請求項 5】

前記タンパク質が、枯草菌 ( *B . s u b t i l i s* ) からの C s p B である、請求項 3 又は 4 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 6】

前記タンパク質が、配列番号 8 の植物転写因子 L A S 又は請求項 4 の項目 ii ~ iv で定義されたその変異体である、請求項 3 又は 4 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 7】

前記植物 ( 単数又は複数 ) が、双子葉植物である、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 8】

前記核酸構築物が、T - D N A 内に存在し、両側に T - D N A 境界配列が隣接しており、前記 T - D N A が、前記 T - D N A を含有する植物又は植物細胞の選択を可能にする選択可能マーカーを含有しない、請求項 1 から 7 までのいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 9】

目的の前記ヌクレオチド配列が、植物細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 10】

目的の前記ヌクレオチド配列が、発現されると前記植物に乾燥ストレス抵抗性増加をもたらす遺伝子である、請求項 1 から 9 までのいずれか一項に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、乾燥ストレスなどの非生物的ストレスに対する抵抗性増加を植物にもたらす方法に関する。本発明は、生育期に発生する非生物的ストレスに反応することを可能にする、農業作物又は植物生産システム及び方法にも関する。本発明は、かかる方法のための、アグロバクテリウム細胞を含む組成物、アグロバクテリウム株、及びアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液にも関する。本発明は、圃場で生育した複数の植物を非生物的ストレスから保護する方法をさらに提供する。さらに、前記組成物で処理され、処理前の植物と比較して増加した非生物的ストレス耐性を有する植物を提供する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

植物の種子、果実及びバイオマス生産は、植物期間に発生することがある乾燥又は他の非生物的ストレスによって大幅に損なわれることがあるので、植物の非生物的ストレス耐性は、過酷な環境条件下での農業にとって非常に重要である。生物工学的手段によって様々な非生物的ストレス ( 例えば、低温ストレス、熱ストレス、水分ストレス、塩ストレス、乾燥 ) に対する作物植物の耐性を増加させる試みは、既に着手されている。W O 2 0 0 5 / 0 3 3 3 1 8 は、植物のストレス耐性を強化する方法に関し、この特許文献には枯草

10

20

30

40

50

菌 (*Bacillus subtilis*) などのグラム陽性菌からの低温ショックタンパク質をコードする DNA で安定的に形質転換された遺伝子導入植物が記載されている。遺伝子導入植物についての非生物的ストレス耐性増加が報告されている。WO 2005/033318 で述べられている 1 つの低温ショックタンパク質は、枯草菌 *CspB* である。

#### 【0003】

Castiglioniら、*Plant Physiology* 147 (2008) 446~455 は、植物の非生物的ストレス耐性及びトウモロコシの水制限条件下で穀粒収量向上をもたらす細菌 RNA シャペロンに関する。栄養生長期と生殖生長期両方でのストレス耐性が、水制限条件下でのトウモロコシの収量安定性向上とともに報告されている。また、この研究では、低温ショックタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子導入植物が使用された。

#### 【0004】

非生物的ストレスは環境条件に起因し、それ故、一般には植物全体に影響を及ぼす。これが、ストレス耐性を増加させるタンパク質を植物に備えさせるために先行技術で遺伝子導入植物が使用されてきた理由であるようである。しかし、遺伝子導入作物植物系統の産生は、何年もの開発を必要とする、時間のかかる方法である。その上、遺伝子導入作物の定植は、幾つかの国では許されないか、(例えば、動物の飼料としての使用に) 厳しく制限されており、それによって先行技術に記載のアプローチをかける国では使用することができない。さらに、遺伝子導入植物は、形質転換植物又はそれらの細胞を選択するために使用された選択可能マーカー遺伝子を一般に含有する。遺伝子導入植物におけるかかる選択可能マーカー遺伝子の使用は、抗生物質抵抗性遺伝子の拡散により医療における抗生物質の有用性が損なわれるかもしれない、除草剤抵抗性遺伝子の雑草への拡散により除草剤の有用性が損なわれるかもしれないので、遺伝子導入植物に対する批判者による大きな懸案事項である。それ故、WO 2005/033318 及び Castiglioniらの非生物的ストレス保護方法は、生態学的に問題がある。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

本発明の目的は、非生物的ストレス (特に、乾燥) 抵抗性増加を植物にもたらす方法を提供することである。本発明のもう 1 つの目的は、環境安全性が向上したものである、及び/又は環境への抗生物質若しくは除草剤抵抗性遺伝子の拡散を必要としない、非生物的ストレス (特に、乾燥) 抵抗性増加を植物にもたらす方法を提供することである。本発明のもう 1 つの目的は、遺伝子導入作物植物の定植が許されない国で使用することができる、非生物的ストレス (特に、乾燥) 抵抗性増加を植物にもたらす方法を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

したがって、本発明は、以下のものを提供する：

(1) 植物に非生物的ストレス耐性向上をもたらす方法であって、目的のヌクレオチド配列を含有する核酸構築物を含む核酸分子を含むアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液を前記植物の地上部に供給することを含み、目的の前記ヌクレオチド配列が前記植物において発現されると前記植物に非生物的ストレス抵抗性増加をもたらす上記方法。

#### 【0007】

(2) 複数の植物に非生物的ストレス耐性向上をもたらす方法であって、

前記複数の植物を圃場で生育させるステップと、

非生物的ストレスが前記植物に影響を及ぼすかどうかを判定するステップと、

目的のヌクレオチド配列を含有する核酸構築物を含む核酸分子を含むアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液を前記植物の地上部に供給するステップであって、目的の前記ヌクレオチド配列が前記植物において発現されると前記植物に非生物的ストレス抵抗性

10

20

30

40

50

増加をもたらす上記ステップと  
を含む上記方法。

【 0 0 0 8 】

( 3 ) 前記植物を所望の生育状態まで生育させるステップと、  
前記アグロバクテリウム株の細胞を含有する前記懸濁液を前記植物の地上部に供給することを含む、前記植物に非生物的ストレス耐性増加をもたらす目的の前記ヌクレオチド配列を前記植物において発現させるステップと  
を含む、項目 ( 1 ) に記載の植物に非生物的ストレス耐性向上をもたらす方法。

【 0 0 0 9 】

( 4 ) 前記植物の地上部に前記懸濁液を供給する前記ステップの前に、前記植物又は前記複数の植物が、前記植物 ( 単数又は複数 ) に前記非生物的ストレス耐性をもたらす遺伝子を含有しない、項目 1 から 3 までのいずれか一項に記載の方法。

10

【 0 0 1 0 】

( 5 ) 前記非生物的ストレス耐性が、乾燥耐性である、項目 1 から 4 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 0 1 1 】

( 6 ) 目的の前記ヌクレオチド配列が、前記植物 ( 単数又は複数 ) に前記非生物的ストレス耐性増加をもたらすことができるタンパク質をコードする、項目 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 0 1 2 】

20

( 7 ) 前記タンパク質が、  
- 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のアミノ酸配列のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む若しくはから成る、又は  
- 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のいずれか 1 つのアミノ酸配列全体と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む若しくはから成る、又は  
- 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のいずれか 1 つのアミノ酸残基数の少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、さらに好ましくは少なくとも 95 % の長さの、且つ、かかる長さにわたってそれぞれ配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 と少なくとも 90 % の配列同一性のアミノ酸配列を含む若しくはから成る、又は  
- 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と比較して 1 ~ 20 のアミノ酸付加、置換若しくは欠失を有するアミノ酸配列を含む若しくはから成る、  
項目 6 に記載の方法。

30

【 0 0 1 3 】

( 8 ) 前記タンパク質が、低温ショックドメインを有し、好ましくは、前記タンパク質が、一本鎖 RNA の結合部位を有する RNA シャペロンである、項目 6 に記載の方法。

【 0 0 1 4 】

( 9 ) 前記タンパク質が、配列番号 2 の若しくは配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、又は  
前記タンパク質が、配列番号 1 若しくは配列番号 2 の全範囲にわたって少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、  
項目 6 から 8 までのいずれか一項に記載の方法。

40

【 0 0 1 5 】

( 10 ) 配列番号 2 の全範囲にわたって少なくとも 80 % の同一性を有する前記タンパク質が、大腸菌 ( *E. coli* ) からの *CspA* のアミノ酸残基 W11、F18、F20、F31、H33 及び F34 を大腸菌からの *CspA* におけるこれらの位置に対応する位置に少なくとも有する、項目 9 に記載の方法。

【 0 0 1 6 】

50

(11) 前記タンパク質が、枯草菌からの C s p B である、項目 6 から 10 までのいずれか一項に記載の方法。

【0017】

(12) 水性であることもある前記懸濁液が、前記アグロバクテリウム株の前記細胞を前記懸濁液 1 ml 当たり最大で  $2 \cdot 2 \times 10^7$ 、好ましくは最大で  $1 \cdot 1 \times 10^7$ 、さらに好ましくは最大で  $4 \cdot 4 \times 10^6$ 、さらに好ましくは最大で  $1 \cdot 1 \times 10^6$  c f u の濃度で含有する、項目 1 から 11 までのいずれか一項に記載の方法。

【0018】

(13) 前記懸濁液が、前記懸濁液に懸濁された研磨剤をさらに含有し、前記研磨剤が、好ましくは、水和剤の粒状無機担体、例えばシリカ又はカーボランダムである、項目 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

10

【0019】

(14) 前記懸濁液が、前記研磨剤を前記懸濁液の 0.02 重量%と 2 重量%の間、好ましくは 0.05 重量%と 1 重量%の間、及びさらに好ましくは 0.1 重量%と 0.5 重量%の間の量で含有する、項目 13 に記載の方法。

【0020】

(15) 前記懸濁液が、農業用スプレーアジュバント、好ましくは非イオン性界面活性剤又は湿潤剤をさらに含み、好ましくは、前記スプレーアジュバントが、オルガノシリコーン湿潤剤、例えばシルウェット (S i l w e t) L - 77 である、項目 1 から 14 までのいずれか一項に記載の方法。

20

【0021】

(16) 前記核酸構築物の少なくとも片側に T - D N A 境界配列が隣接しており、それによって前記植物の細胞への前記核酸構築物の移入が可能になる、項目 1 から 15 までのいずれか一項に記載の方法。

【0022】

(17) 前記核酸構築物が、T - D N A 内に存在し、両側に T - D N A 境界配列が隣接しており、前記 T - D N A が、前記 T - D N A を含有する植物又は植物細胞の選択を可能にする選択可能マーカーを含有しない、項目 1 から 16 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【0023】

(18) 目的の前記ヌクレオチド配列が、植物細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結されている、項目 1 から 17 までのいずれか一項に記載の方法。

【0024】

(19) 前記核酸構築物が、前記タンパク質をコードする D N A 又は R N A レプリコンをコードする、項目 1 から 18 までのいずれか一項に記載の方法。

【0025】

(20) 植物のアグロバクテリウム媒介形質転換のための D N A 分子又はベクターであって、プロモーターに作動可能に連結された目的の D N A 配列を含有する核酸構築物を T - D N A 内に含み、目的の前記 D N A 配列が、非生物的ストレス耐性増加を植物にもたらし、前記タンパク質をコードし、前記 T - D N A が、前記 T - D N A を含有する植物細胞の選択を可能にする選択可能マーカーを含有しない上記 D N A 分子又はベクター。

40

【0026】

(21) 項目 20 に記載の D N A 分子を含むアグロバクテリウム細胞。

【0027】

(22) プロモーターに作動可能に連結された目的の異種 D N A 配列を含有する核酸構築物を T - D N A 内に含む異種 D N A 分子を含むアグロバクテリウム株であって、目的の前記異種 D N A 配列が、乾燥抵抗性増加を植物にもたらし、前記タンパク質をコードし、前記 T - D N A が、前記 T - D N A を含有する植物細胞の選択を可能にする選択可能マーカーを含有しない上記アグロバクテリウム株。

50

## 【0028】

(23) アグロバクテリウム株の細胞を含有する組成物であって、好ましくは非イオン性の湿潤剤、例えばオルガノシロキサン界面活性剤を場合によりさらに含み、前記アグロバクテリウム株が、プロモーターに作動可能に連結された目的の異種DNA配列を含有する核酸構築物を含み、目的の前記ヌクレオチド配列が前記植物において発現されると植物に非生物学的ストレス抵抗性増加をもたらす上記組成物。

## 【0029】

(24) 少なくとも1つの研磨剤をさらに含む、項目23に記載の組成物。

## 【0030】

(25) 前記組成物が懸濁液であり、前記懸濁液が、前記懸濁液に懸濁された前記アグロバクテリウム株の細胞と及び少なくとも1つの研磨剤を含有し、この場合、前記懸濁液が、前記アグロバクテリウム株の前記細胞を、前記懸濁液1ml当たり最大で $4.4 \times 10^7$ 、好ましくは最大で $1.1 \times 10^7$ 、好ましくは最大で $4.4 \times 10^6$ 、さらに好ましくは最大で $1.1 \times 10^6$  cfuの濃度で含有する、項目23又は24に記載の組成物。

10

## 【0031】

(27) 目的のヌクレオチド配列を含有する核酸構築物を含む核酸分子を含むアグロバクテリウム株の細胞を含有する組成物で処理された植物であって、目的の前記ヌクレオチド配列が前記植物において発現されると前記植物に非生物学的ストレス抵抗性増加をもたらす、前記植物がその細胞内に目的の前記ヌクレオチド配列を含有し、目的の前記ヌクレオチド配列を発現する上記植物。

20

## 【0032】

(28) 植物に非生物学的ストレス耐性を付与するための、項目20のDNA分子、項目21のアグロバクテリウム細胞、項目22のアグロバクテリウム株又は項目23から25までのいずれか一項の組成物の使用。

## 【0033】

(29) 植物に非生物学的ストレス耐性を付与する方法であって、目的のヌクレオチド配列を含有する核酸構築物を含む核酸分子を含むアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液を調製するステップであって、目的の前記ヌクレオチド配列が前記植物において発現されると前記植物に非生物学的ストレス抵抗性増加をもたらす上記ステップと、前のステップで調製した懸濁液を前記植物の地上部に供給するステップとを含む上記方法。

30

## 【発明の効果】

## 【0034】

本発明者らは、非生物学的ストレスによる危険に曝される植物において、前記植物において発現されると前記植物に非生物学的ストレス抵抗性増加をもたらす目的のヌクレオチド配列を一過的に発現させることにより、植物の乾燥抵抗性などの非生物学的ストレス抵抗性の増加を達成することが可能であることを、驚くべきことに発見した。1つの実施形態において、目的のヌクレオチド配列は、前記植物に非生物学的ストレス抵抗性増加をもたらすことができるタンパク質をコードする。本発明は、植物のための非生物学的ストレス保護システム、キット及び方法であって、前記植物への外来遺伝子（例えば、目的のヌクレオチド配列）の供給を、乾燥などの非生物学的ストレスが起こる又は起こると予期される環境条件に限定することができる上記システム、キット及び方法を提供する。非生物学的ストレスが起こらない又は予期されない場合、例えば前記タンパク質をコードする、外来遺伝子又は導入遺伝子の植物への供給は、必要でなく、その供給を回避することができる。したがって、本発明の方法は、（染色体に安定的に及び遺伝的に組み込まれた外来遺伝子を含有する）遺伝子導入植物を利用する農業が許されない国にとっても有用である。

40

## 【0035】

本発明は、本発明の方法に従って非生物学的ストレス抵抗性増加がもたらされた植物を人間の食糧の生産への使用から除外するが、その代わりに動物飼料の生産又はバイオ燃料の生

50

産に使用することができる、作物管理システムを提供し、可能にする。しかし、生育期の好適な環境条件のため非生物的ストレス抵抗性増加をもたらされなかった植物を人間の食糧の生産に使用することができる。本発明は、ストレス耐性向上を必要としない生育期でさえ遺伝子導入植物が定植される先行技術非生物的ストレス改善方法 (WO 2005/033318; Castiglioniら、Plant Physiology 147 (2008) 446~455) と比較して大幅な改善を示す。

#### 【0036】

発現されると前記植物に非生物的ストレス抵抗性増加をもたらすことができる目的のヌクレオチド配列を一過的に、すなわち、抗生物質抵抗性遺伝子又は除草剤抵抗性遺伝子などの選択可能マーカー遺伝子を必要とせずに、及びかかる抗生物質抵抗性遺伝子又は除草剤抵抗性遺伝子が組み込まれた植物細胞を選択することなく、前記植物に備えさせるので、抗生物質抵抗性遺伝子も除草剤抵抗性遺伝子も植物に挿入されず、これらの植物を有する環境でのかかる遺伝子の拡散を大幅に回避することができる。それ故、同じくこの理由で、本発明の方法は、遺伝子導入植物に依存する先行技術の非生物的ストレス保護システムと比較して向上した環境安全性を有する。非生物的ストレス条件下の植物に本発明の目的のヌクレオチド配列を一過的に備えさせることは、処理される植物に選択的利点をもたらす。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0037】

【図1】目的の遺伝子のクローニングに使用したプラスミドベクターを模式的に示す図である。pNMD2492は、転写・非複製型ベクターである。RB及びLBは、T-DNAの右左の境界を表す。P35S：カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター；O：オメガ翻訳エンハンサー；P19：トマトブッシュスタントウイルスからのPTGSサプレッサーP19；Tnos：ノパリンシンターゼターミネーター；Tocs：ocsターミネーター。pNMD035は、細胞間移行能力を有する、TMVに基づくウイルスベクターである。Pact2：シロイヌナズナアクチン2遺伝子のプロモーター；o：TVCV（カブ葉脈透化ウイルス）からの5'末端；RdRp：cr-TMV（アブラナ科植物感染性トバモウイルス）からのRNA依存性RNAポリメラーゼオープンリーディングフレーム（ORF）；MP：cr-TMVからの移行タンパク質ORF；N：cr-TMVからの3'非翻訳領域；Tnos又はnos：ノパリンシンターゼターミネーター；RdRp及びMMP ORF内の灰色区域に割り込んでいる白色区域は、植物細胞の細胞質におけるRNAレプリコン形成の尤度を増すためにこれらのORFに挿入されたイントロンを示し、これは、WO 2005 049839に詳細に記載されている。pNMD661は、細胞間移行能力がない、TMVに基づくベクターである。MP ORFの点突然変異は、正しいMP翻訳を妨げるフレームシフトにつながる。pNMD670は、細胞間移行能力を有する、PVX（ジャガイモXウイルス）に基づくベクターである。PVX-pol：PVXからのRNA依存性RNAポリメラーゼ；CP：コートタンパク質ORF；25K、12K及び8は共に、PVXからの25KDA、12kDa及び8kDa三重遺伝子ブロックモジュールを示す；N：PVXからの3'非翻訳領域。pNMD694は、コートタンパク質コード配列が欠失している、全身移行も細胞間移行も不可能にされた、PVXに基づくベクターである。

【図2】シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 核転写因子YサブユニットB-1 (NF-YB1) (GenBank: NM\_129445.2) の発現のための転写ベクター（プラスミド構築物pNMD3486）及び枯草菌亜種スプチリス JH642株からの低温ショックタンパク質CspB (GenBank: AAB01346) のための転写ベクター（プラスミド構築物pNMD3493）を模式的に示す図である。

【図3】噴霧11日後、11日渇水、のセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) N90-740植物を示す写真である。

【図4】噴霧18日後、11日渇水、7日再灌水、のセイヨウアブラナN90-740植

10

20

30

40

50

物を示す写真である。

【図5】噴霧26日後、11日渇水、7日再灌水、8日渇水、のセイヨウアブラナN90-740植物を示す写真である。

【図6】噴霧26日後、11日渇水、7日再灌水、13日渇水、1日再灌水、のセイヨウアブラナN90-740植物を示す写真である。

【図7】トマト植物における目的の遺伝子の発現のために使用した、全身移行能力を有するPVXウイルスベクターを模式的に示す図である。RB及びLBは、T-DNAの右左の境界を表す。P35S：カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター；PVX-POL：PVXからのRNA依存性RNAポリメラーゼ；CP：コートタンパク質ORF；25K、12K及び8は共に、PVXからの25KDa、12kDa及び8kDa三重遺伝子ブロックモジュールを示す；N：PVXからの3'非翻訳領域；GmRD22：大豆ダイズ(*Glycine max*)からのGmRD22(アポプラスト局在BURP-ドメインタンパク質)のコード配列；BnLAS：菜種セイヨウアブラナからのBnLAS(GRASファミリー遺伝子)のコード配列；GFP：クラゲからの緑色蛍光タンパク質のコード配列。VirGN54Dは、N54D突然変異を有する、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101からのVirGタンパク質のコード配列を表す。

【図8】BnLAS及びGmRD22遺伝子の発現のためのPVXベクターを保有するアグロバクテリアを噴霧してから3週間後の渇水に曝されたトランスフェクトトマト(*Lycopersicon esculentum*)栽培品種バルコニー・レッド(*Balcony Red*)植物の表現型を示す写真である。渇水曝露を14日間行った。

【図9】BnLAS及びGmRD22遺伝子の発現のためのPVXベクターを保有するアグロバクテリアを噴霧してから3週間後の渇水に曝されたトランスフェクトトマト栽培品種バルコニー・レッド植物の果実を示す写真である。渇水曝露を14日間行った。噴霧100日後に果実収量を評価した。番号1、2、3などは、個々の植物を表す。

【図10】PVXベクターを保有するアグロバクテリアを噴霧してから3週間後の渇水に曝されたトランスフェクトトマト栽培品種バルコニー・レッド植物から収穫した果実のバイオマスを示す図である。渇水曝露を14日間行った。果実収量を、噴霧100日後に評価し、植物ごとに平均値として算出した。1：トランスフェクトされていない植物；2：BnLAS遺伝子を発現する植物；3：GmRD22遺伝子を発現する植物；4：GFPを発現する植物。

【図11】PEG6000処理を受けたGmRD22、BnLAS及びGFPトランスフェクトトマトバルコニー・レッド苗の表現型を描写する写真である。

【図12】10日の注水抑止後、及び回復後(灌水2時間後)の、GFP及びBnLAS発現PVXベクターがトランスフェクトされたトマト栽培品種バルコニー・レッドを示す写真である。播種12日後に植物にアグロバクテリアを噴霧し、噴霧12日後に植物を渇水に曝した。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明の方法は、農業に、すなわち大規模に、主として利用される。それ故、これらの方法は、一般に、複数の植物を用いて行われる。したがって、これらの方法は、例えば圃場に、播種又は定植される複数の植物に一般に利用される。本発明の方法を行う前、播種又は定植される植物は、本発明の方法でもたらされる非生物学的ストレス耐性を植物にもたらす発現可能な遺伝子を含み、ないことが好ましい。特に、植物は、そのような遺伝子の遺伝子導入植物でないことが好ましい。

【0039】

植物を播種又は定植した後、典型的には農業従事者である使用者は、植物の生育及び植物の健康状態を観察することができる。さらに、使用者は、植物に対する非生物学的ストレス条件が発生したかどうか、発生しているかどうか、又は発生するかもしれないかどうかを判定するために環境条件、例えば、天候及び/又は土壌の状態を観察することができる



。非生物的ストレス条件が存在するかどうかの判定は、土壌からの試料の採取及び土壌の検査を含むことがある。或いは又は加えて、非生物的ストレス条件が存在するかどうかの判定は、植物からの又は前記植物の断片からの試料の採取及び植物の検査を含むこともある。

#### 【0040】

乾燥ストレス又は塩ストレスを判定するために、1つ又は複数の土壌試料を水分含有量又は塩分含有量についてそれぞれ検査することがある。好ましい実施形態において、本発明の方法は、乾燥に対する植物の耐性又は抵抗性（これらの用語を本明細書では交換可能に用いている）を向上させるために用いられる。それ故、乾燥ストレスの判定及びかかるストレスのさらなる発生の判定は、降水確率を見極めるための天気予報の追跡を含むことがある。

10

#### 【0041】

乾燥ストレス条件の判定は、当技術分野において公知である。例えば、Jonesら、*Journal of Experimental Botany* 58（第2号）119～130、2007；Idso、*Agricultural Meteorology* 27、59～70、1982；Shimadaら、*Journal of Arid Land Studies* 22-1、251～254、2012を参照されたい。植物に影響を及ぼす水分状態を判定する又は追跡するために土壌測定及び／又は植物測定を用いることがある。これらの公知の方法を直接法と間接法に分類することもできる。直接法の中では、土壌又は植物材料の相対含水率（RWC）の測定、及び葉の水ポテンシャルの、例えば圧力室での又は樹液流動センサを使用する、直接測定を挙げることができる。間接法の中では、キャノピー温度の評価に基づく遠隔赤外技術、又はキャノピースペクトル反射率の測定に基づく遠隔分光法を挙げることができる。水が限られてくると、作物はそれら自体を低温に保つのに十分な水を蒸散することができないので、作物温度は上昇する。植物の葉は、それらの気孔を開放して、光合成のために二酸化炭素を入れ、同時に水蒸気を葉から流出させ、葉の表面を冷却する。土壌水が限られてくると蒸散は減少し、したがってその結果、葉冷却効果が低下し、作物温度の上昇が生じる。すべての物体はエネルギー又は放射線を放射し、これを物体の温度として測定する。作物キャノピーについては、通常は熱赤外放射温度計で温度を測定する。赤外放射温度計（IRT）は、市販されている。Irmakら、*Agronomy Journal*、92、1221～1227、2000は、注水適時選択を目的とした、しかし本発明の植物の乾燥ストレスの判定にも使用することができる、作物水分ストレス指数（CWSI）の決定法を記載している。水分状態を追跡するための他の判断基準は、膨圧又は気孔コンダクタンス、及び土壌若しくは植物中の水ポテンシャルである。上に挙げた水分状態判断基準の絶対判定に依存しないように、乾燥ストレスの発生を容易に確認するために、水分状態を継続的に又は定期的に追跡することもある。

20

30

#### 【0042】

植物（単数若しくは複数）の所望の生育状態で、又は使用者が非生物的ストレスに対する植物の抵抗性を向上させるべきであると決意したとき、目的のヌクレオチド配列を含有する核酸構築物を含む核酸分子を含むアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液を植物又はそれらの部分に供給する。目的のヌクレオチド配列は、植物において発現されると、植物に非生物的ストレスに対する耐性増加をもたらすことができる。

40

#### 【0043】

本発明は、植物又は前記植物の部分を生産する方法であって、

（A）複数の植物を圃場で生育させるステップと、

（B）乾燥ストレスが前記植物に影響を及ぼすかどうかを判定するステップと、

（C）乾燥ストレスが前記植物に影響を及ぼす又は影響を及ぼすことがあるとステップ（B）で判定された場合、目的のヌクレオチド配列を含有する核酸構築物を含む核酸分子を含むアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液を前記植物の地上部に供給するステップであって、目的の前記ヌクレオチド配列が前記植物において発現されると前記植物に

50

非生物的ストレス抵抗性増加をもたらす上記ステップと、

(D) 前記植物又はそれらの所望の部分収穫するステップと、

(E) ステップ(C)を行った場合、ステップ(C)を行ったことが許容される用途にステップ(D)の収穫物を使用するステップ、又はステップ(C)を行わなかった場合、ステップ(C)を行ったことが許容されない用途にステップ(D)の収穫物を使用するステップと

を含む上記方法も提供する。

#### 【0044】

ステップ(C)を行うことが許容されないことがある用途は、人間が摂取する食糧の生産である。ステップ(C)を行うことが許容されることがある用途は、動物の飼料の生産又はバイオ燃料の生産である。したがって、本発明は、総合効率を強力に向上させる、全生育期のための作物生産システム及び方法を提供する。一方で、乾燥に起因する作物又は植物材料の損失を低減させることができ、損失を免れた作物又はバイオマスを、遺伝子修飾が懸案事項でない用途に使用することができる。他方では、好適な天候条件のため乾燥耐性を増加させる対策を必要としない季節に生育する植物を遺伝子修飾せず、これは、一部の消費者に又は一部の国で好まれる。

#### 【0045】

本発明において、目的のヌクレオチドは、乾燥抵抗性などの非生物的ストレス抵抗性の増加を前記植物にもたらすことができるタンパク質をコードすることができる。或いは、目的のヌクレオチド配列は、発現されると、非生物的ストレス抵抗性増加を植物にもたらすことができるRNAを生産することができる。

#### 【0046】

核酸分子は、一般にDNA分子である。この場合、その分子に含有される目的のヌクレオチド配列は、目的のDNA配列である。

#### 【0047】

本発明の方法では、目的の前記ヌクレオチド配列の一過性発現のために前記核酸分子(ベクター)を前記植物の部分に一過的にトランスフェクトする。これには、目的のヌクレオチド配列を植物においていつ発現させるべきか及び目的のどのヌクレオチド配列を発現させるべきかの決定を、トランスフェクション時点直前まで遅らせることができるという利点がある。用語「一過性の」は、いずれの選択方法も、例えば、選択可能薬剤とその選択可能薬剤を解毒することができる選択可能マーカー遺伝子とを使用して、核酸分子(ベクター)又はトランスフェクトされていない細胞若しくは植物からの核酸構築物がトランスフェクトされた細胞又は植物を選択するために用いられないことを意味する。結果として、トランスフェクトされた核酸は、一般に、植物染色体DNAに安定的に導入されない。その代りに、一過性発現方法は、トランスフェクトされたまさしくその植物細胞におけるトランスフェクションの効果を利用する。

#### 【0048】

目的の前記ヌクレオチド配列の可能な発現達成方法は、目的の前記ヌクレオチド配列をコードするヌクレオチド配列を含有する自己複製(ウイルス)レプリコンの使用である。植物ウイルス発現系は、DNAウイルスベクターの使用についても、RNAウイルスベクターの使用についても、多くの出版物に、例えばWO2008028661、WO2006003018、WO2005071090、WO2005049839、WO2006012906、WO02101006又はWO02068664に記載されており、これらの文献にさらに多くの出版物が引用されている。

#### 【0049】

一過性発現のための植物又は植物部分へのDNA分子などの核酸分子の様々な導入方法が公知である。本発明では、核酸分子(ベクター)又は核酸構築物を、例えばアグロインフィルトレーションにより、植物にトランスフェクトするためにアグロバクテリアを好ましくは使用する。アグロバクテリアによる植物の大規模浸潤システム及び方法は、WO2009095183に記載されている。別の実施形態では、多くの植物への、例えば圃場

の植物への大規模散布によく適している、アグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液を植物又は植物部分に噴霧する。かかるスプレートランスフェクション方法は、W O 2 0 1 2 / 0 1 9 6 6 0 に詳細に記載されている。

【 0 0 5 0 】

前記アグロバクテリウム株は、植物形質転換及びトランスフェクションに一般に使用され、並びに一般知識から当業者に公知である、アグロバクテリウム・ツメファシエンス又はアグロバクテリウム・リゾゲネス ( *Agrobacterium rhizogenes* ) 種に属することがある。本発明の方法で使用されるアグロバクテリウム株は、目的のDNA配列を含有する核酸構築物を含むDNA分子 ( Ti - プラスミド ) を前記核酸分子として含む。目的のDNA配列は、植物において発現される1つ又は1つより多くのタンパク質をコードすることができる。核酸構築物は、アグロバクテリウム株の分泌系による植物細胞への核酸構築物の導入のためにTi - プラスミドのT - DNA内に典型的に存在する。核酸構築物の少なくとも片側に又は両側に、前記植物 ( 単数又は複数 ) のトランスフェクション及び前記核酸構築物の前記植物の細胞への導入を可能にするためにT - DNA境界配列が隣接している。好ましくは、前記核酸構築物は、T - DNA内に存在し、両側にT - DNA境界配列が隣接している。

10

【 0 0 5 1 】

最も好ましくは、核酸構築物は、アグロバクテリウム株のT - プラスミドのT - DNA内に存在する。Ti - プラスミドは、細菌におけるクローニング及び遺伝子改変を可能にするために前記T - DNAの外側に選択可能マーカを含有することがある。しかし、前記植物の細胞に移入されるT - DNAは、存在する場合には前記T - DNAを含有する植物又は植物細胞の選択を可能にすることになる、選択可能マーカを含有しないことが好ましい。この実施形態ではTi - プラスミドのT - DNA内に存在すべきでない選択可能マーカ遺伝子の例は、抗生物質抵抗性遺伝子又は除草剤抵抗性遺伝子である。本発明の方法は、目的の前記ヌクレオチド配列 ( 又は前記タンパク質 ) の一過性トランスフェクション及び発現を用いるので、本方法は、本発明の核酸分子を組み込んだ植物細胞を、かかる抗生物質抵抗性遺伝子又は除草剤抵抗性遺伝子を使用することによって選択するステップを含まない。したがって、いずれの抗生物質抵抗性遺伝子も除草剤抵抗性遺伝子も前記植物に組み込む必要がなく、それにより、かかる遺伝子を環境に拡散させる確率が本発明の方法では低い。

20

30

【 0 0 5 2 】

核酸構築物は、目的のヌクレオチド配列を、そのヌクレオチド配列が植物細胞において発現できるように含む。このために、目的のヌクレオチド配列は、前記核酸構築物中で、植物細胞内で活性なプロモーターの制御下にあることがある。好ましくは、目的のヌクレオチド配列は、非生物的ストレス耐性増加を植物にもたらすことができるタンパク質をコードする。目的のヌクレオチド配列の例は、DNAウイルスレプリコン若しくはRNAウイルスレプリコン又は発現される遺伝子をコードする、DNA配列である。前記遺伝子は、発現されると、植物に非生物的ストレス耐性増加をもたらす。好ましくは、前記遺伝子は、植物に非生物的ストレス耐性増加をもたらすことができるタンパク質をコードする。ウイルスレプリコンもまた、植物 ( 単数又は複数 ) の細胞において発現されるかかるタンパク質をコードする。核酸構築物は、目的のヌクレオチド配列に加えて、他の配列、例えば、目的のヌクレオチド配列の発現の調節配列、例えば転写プロモーター及びターミネーターを含むことがある。核酸構築物は、発現されるさらなる遺伝子、例えば、P 1 9 タンパク質などの遺伝子サイレンシングのサプレッサーをコードする遺伝子を含むことがある。かかるさらなる遺伝子の発現は、本発明のタンパク質を発現させるために使用されるプロモーターと同じプロモーターの制御下にあることもあり、又は異なるプロモーターの制御下にあることもある。アグロバクテリウム媒介遺伝子移入及びそのためのベクターは、例えば、上に列挙した参考文献から、又は植物生物学に関する教科書、例えばSlater、Scott及びFowler、Plant Biotechnology、第2版、Oxford University Press、2008から、当業者には公知で

40

50

ある。

【0053】

本明細書において用いる場合、用語「植物細胞内で活性なプロモーター」は、植物細胞内で転写を制御（開始）することができるDNA配列を意味する。これは、植物由来の任意のプロモーターを含むが、植物細胞内で転写を指示することができる非植物由来の任意のプロモーター、すなわち、ウイルス又は細菌由来の特定のプロモーター、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（CaMV35Sプロモーター）（Harpsterら（1988）Mol Gen Genet. 212（1）：182～90）、サブラネアアノクローパーウイルスプロモーター4番若しくは7番（WO9606932）、又はT-DNA遺伝子プロモーターも含み、組織特異的又は器官特異的プロモーターも含み、組織特異的又は器官特異的プロモーターとしては、種子特異的プロモーター（例えば、WO89/03887）、器官原基特異的プロモーター（Anら（1996）Plant Cell 8（1）：15～30）、茎特異的プロモーター（Kellerら（1988）EMBO J. 7（12）：3625～3633）、葉特異的プロモーター（Hudspethら（1989）Plant Mol Biol. 12：579～589）、葉肉特異的プロモーター（例えば、光誘導性Rubiscoプロモーター）、根特異的プロモーター（Kellerら（1989）Genes Dev. 3：1639～1646）、塊茎特異的プロモーター（Keilら（1989）EMBO J. 8（5）：1323～1330）、維管束組織特異的プロモーター（Pelemanら（1989）Gene 84：359～369）、雄蕊選択的プロモーター（WO89/10396、WO92/13956）、裂開帯特異的プロモーター（WO97/13865）などが挙げられるが、これらに限定されない。一過性発現には、構成的プロモーター、すなわち、発生学的に調節されていないプロモーターを使用することが好ましい。しかし、構成的プロモーターは、組織特異的であることもあり、又は器官特異的であることもある。好ましいプロモーターは、下記の実施例で使用するものである。

【0054】

本明細書において、用語「構築物」は、目的のヌクレオチド配列を含む組換え構築物を意味する。好ましくは、構築物は、前記植物に非生物的ストレス抵抗性増加をもたらすことができるタンパク質を少なくともコードする。

【0055】

タンパク質の強い発現が所望される実施形態では、核酸構築物は、植物細胞内で複製してウイルスベクターのレプリコンを形成することができるウイルスベクターをコードすることがある。複製し続けるために、ウイルスベクター及びレプリコンは、植物細胞内に存在する核酸ポリメラーゼによって、例えば、そのレプリコンから発現されたウイルスポリメラーゼによって認識され得る複製起点を含有する。RNAウイルスベクター（「RNAレプリコン」とも呼ばれる）の場合、レプリコンは、後者が植物細胞核に導入された後のDNA構築物からの、植物細胞内で活性なプロモーターの制御下での転写によって、形成されることがある。DNAレプリコンの場合、レプリコンは、例えば、WO00/17365及びWO99/22003に記載されているように、DNA構築物中のウイルスレプリコンをコードする配列に隣接する2つの組換え部位間の組換えによって形成されることがある。レプリコンがDNA構築物によってコードされている場合、RNAレプリコンのことが好ましい。DNA及びRNAウイルスベクター（DNA又はRNAレプリコン）の使用は、長年にわたって文献に広範に記載されている。一部の例は、次の特許公報である：WO2008028661、WO2007137788、WO2006003018、WO2005071090、WO2005049839、WO02097080、WO02088369、WO02068664。DNAウイルスベクターの例は、ジェミニウイルスに基づくものである。本発明のために、植物RNAウイルスに基づくウイルスベクター又はレプリコン、特に、一本鎖プラスセンスRNAウイルスに基づくものを用いることがある。したがって、ウイルスレプリコンは、一本鎖プラスセンスRNAレプリコンであることがある。タバコモザイクウイルス（TMV）及びポテックスウイルスX（PVX）

に基づくかかるウイルスベクターの例。「に基づく」は、ウイルスベクターが、複製系、例えば、レプリカーゼ、及び／又はこれらのウイルスの複製に関与する他のタンパク質を用いることを意味する。ポテックスウイルスに基づくウイルスベクター及び発現系は、EP 2 061 890又はWO 2 008 / 0 2 8 6 6 1に記載されている。多くの他の植物ウイルスレプリコンが上述の特許公報に記載されている。

#### 【0056】

1つの実施形態において、本発明の方法は、前記タンパク質を好ましくはコードする目的のDNA配列を含有する核酸構築物を含むDNA分子を含むアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液を前記植物の地上部に噴霧することを含む。

#### 【0057】

前記植物の地上部に供給するために使用することができる懸濁液は、液体に懸濁されたアグロバクテリウム細胞を含む液体組成物である。懸濁液は一般に水性であり、これは、その液体が少なくとも50、好ましくは少なくとも80、さらに好ましくは少なくとも90重量%水を含有することを意味する。液体中の他の成分は、生存可能な形態でのアグロバクテリウム細胞の維持に適合する他の液体成分であってもよく、これは、極性溶媒、例えば多価アルコール又はジメチルスルホキシドであってもよい。さらなる成分は、栄養素、ミネラル若しくは塩類、緩衝剤又はスプレーアジュバント（さらに下記参照）であってもよい。

#### 【0058】

本発明の方法で植物又は植物部分に噴霧するために使用される懸濁液は、最大で  $1.1 \times 10^9$  cfu/ml のアグロバクテリウム細胞の濃度を有することができ、これは、600nmで1の光学密度のLB培地中のアグロバクテリウム培養物にほぼ相当する。しかし、達成可能な高いトランスフェクション効率のため、特に、研磨剤及び／又は界面活性剤又は湿潤剤（下記参照）を使用して噴霧を行う場合は、はるかに低い濃度を用いることができ、これにより、アグロバクテリウム生産用の巨大発酵槽を必要とすることなく多くの植物、例えば圃場全体、の処理が可能になる。それ故、濃度は、最大で  $2.2 \times 10^7$  cfu/ml、好ましくは最大で  $1.1 \times 10^7$  cfu/ml、さらに好ましくは最大で  $4.4 \times 10^6$  cfu/ml であり得る。1つの実施形態において、濃度は、懸濁液1ml当たり最大で  $1.1 \times 10^6$  cfu である。cfu/mlでの細胞濃度の決定を避けるために、分光光度計を使用して600nmでの見掛けの光学密度を測定することによりアグロバクテリア懸濁液の濃度を評定することが多い。本明細書において、 $1.1 \times 10^7$  cfu/mlの濃度は、600nmで0.01の算出光学密度に相当し、それに従って前記算出光学密度は、600nmで1.0の光学密度を有する懸濁液の水又は緩衝液での100倍希釈によって定義される。同様に、 $4.4 \times 10^6$  cfu/ml及び  $1.1 \times 10^6$  cfu/mlの濃度は、600nmで0.004及び0.001の算出光学密度にそれぞれ相当し、それに従って前記算出光学密度は、600nmで1.0の光学密度を有する懸濁液の水又は緩衝液でのそれぞれ250倍又は1000倍希釈によって定義される。

#### 【0059】

植物又は植物の部分に噴霧するために使用されるアグロバクテリウム株の細胞を含有する懸濁液は、トランスフェクション効率を向上させるために、前記懸濁液に懸濁された少なくとも1つの研磨剤を含有することがある。使用することができる研磨剤は、アグロバクテリウム細胞の水性懸濁液に本質的に不溶性である粒状材料である。研磨剤は、特に湿潤剤とともに使用すると、葉などの植物組織の表面を脆弱にすると、及びその結果、植物組織の細胞間隙へのアグロバクテリウム細胞の浸透を助長すると考えられる。結果として、トランスフェクション効率は高い。

#### 【0060】

本発明の研磨剤として使用される粒状材料は、農薬製剤の水和剤（WP）において担体として一般に使用されるような担体材料であり得る。水和剤に関連して、これらの担体は、農薬製剤分野では「増量剤」又は「不活性増量剤」とも呼ばれる。水和剤製剤は、植物

10

20

30

40

50

保護分野における一般知識の一部である。ハンドブック PESTICIDE SPECIFICATIONS、「Manual for Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides」、世界保健機関（WHO）及び国際連合食糧農業機関編、ローマ、2002、ISBN 92-5-104857-6を参照されたい。植物保護のための水和剤製剤は、例えばEP1810569、EP1488697、EP1908348及びEP0789510に記載されている。研磨剤は、ミネラル材料、典型的には無機材料であり得る。かかる担体材料の例は、珪藻土、タルク、粘土、炭酸カルシウム、ベントナイト、酸性白土、アタパルジャイト、ゼオライト、絹雲母、海泡石又はケイ酸カルシウムである。石英粉末、例えば、WO02/087324に記載されている高純度石英粉末を使用することも可能である。好ましい例は、シリカ、例えば親水性沈降及びヒュームドシリカ、並びにカーボランダムである。水和剤に使用される希釈剤又は増量剤、例えばシリカの研磨特性は公知である（G. A. Matthewsによる「Pesticide Application Methods」、第3版、Blackwell Science、2000の52頁を参照されたい）。

10

#### 【0061】

研磨剤として使用するための粒状無機材料の市販品としては、Evonik Degussa製の親水性シリカSipernat（商標）22S及びSipernat（商標）50Sを挙げることができる。他の製品は、PPG Industries Taiwan Ltd.製の合成非晶質水和シリカ「Hi-Sil（商標）257」又はHuber Corporation製の合成ケイ酸カルシウム「Hubersorb 600（商標）」である。市販のサブミクロンサイズのシリカは、約0.02  $\mu\text{m}$ の平均粒径を有するHi-Sil（商標）233（PPG Industries）である。

20

#### 【0062】

研磨剤は、0.01  $\mu\text{m}$ と40  $\mu\text{m}$ の間、好ましくは0.015  $\mu\text{m}$ と30  $\mu\text{m}$ の間、さらに好ましくは0.05  $\mu\text{m}$ と30  $\mu\text{m}$ の間、さらにいっそう好ましくは0.1  $\mu\text{m}$ と30  $\mu\text{m}$ の間、さらにいっそう好ましくは0.1  $\mu\text{m}$ と20  $\mu\text{m}$ の間、さらにいっそう好ましくは0.5  $\mu\text{m}$ と20  $\mu\text{m}$ の間、及び最も好ましくは1.0  $\mu\text{m}$ と16  $\mu\text{m}$ の間の中位粒径を有することができる。1つの実施形態において、中位粒径は、0.015  $\mu\text{m}$ と1  $\mu\text{m}$ の間、又は0.02  $\mu\text{m}$ と0.5  $\mu\text{m}$ の間である。中位粒径は、Malvern Instruments, LtdからのMastersizer（商標）を使用してレーザー回折により測定することができる体積中位粒径である。噴霧ノズルの目詰まりを避けるために、研磨剤に含有される最も大きい粒子の最大粒径は、最大で45  $\mu\text{m}$ 、好ましくは最大で40  $\mu\text{m}$ であるべきであり、この粒径は、篩分析によって判定することができる。この条件は、（ISO 3262-19に従って）篩い残分が1.5重量%未満である場合に満たされると考えられる。研磨剤は、上記のレーザー回折によって測定して、最大で40  $\mu\text{m}$ の、好ましくは最大で30  $\mu\text{m}$ のD90値を有することができる。典型的に、上記粒径は、一次粒径に関する。本発明の水性懸濁液中の研磨剤の含量は、前記懸濁液の0.01重量%と3重量%の間、好ましくは0.02重量%と2重量%の間、さらに好ましくは0.05重量%と1重量%の間、及びさらにいっそう好ましくは0.1重量%と0.5重量%の間であり得る。

30

40

#### 【0063】

植物の部分への噴霧に使用可能な懸濁液は、農業用スプレーアジュバントを含有することが好ましい。スプレーアジュバントは、界面活性剤又は湿潤剤であることもある。本発明において界面活性剤又は湿潤剤には複数の利点がある。界面活性剤又は湿潤剤は、水性懸濁液の水の表面張力を低下させ、アグロバクテリアが植物の葉の表面により浸透できるようにする。さらに、界面活性剤又は湿潤剤は、懸濁液の安定性を向上させ、懸濁液中の研磨剤の沈降を低減させる。本発明において使用される界面活性剤は、特に限定されない。しかし、非イオン性界面活性剤のことが好ましい。界面活性剤を説明するために用いられることが多い測定法は、HLB（親水性/親油性バランス）である。HLBによって親

50

水性及び親油性化合物と会合する界面活性剤の能力が説明される。高いHLBバランスを有する界面活性剤は、油溶性化合物より水溶性化合物とよく会合する。本明細書において、HLB値は、12以上、好ましくは少なくとも13であるべきである。非イオン性界面活性剤としては、オルガノシリコン界面活性剤、例えばポリアルキレンオキシド変性ヘプタメチルトリシロキサンが、本発明において最も好ましい。市販品は、GE Advanced MaterialsからのSilwet L77(商標)スプレーアジュバントである。

#### 【0064】

本発明において使用可能なアグロバクテリウム株は、当技術分野において植物のトランスフェクション又は形質転換に一般に使用されているものである。一般に、バイナリーベクター系及びバイナリー株が使用される、すなわち、一方で植物細胞へのT-DNAの移入に必要なvir遺伝子及び他方でT-DNAが別々のプラスミド上にある。使用可能なアグロバクテリウム株の例は、Trends in Plant Science 5(2000)446~451のバイナリーアグロバクテリウム株及びベクター系に関するHellenesらの論文に与えられている。バイナリーアグロバクテリウム株に関連して、vir遺伝子を含有するプラスミドは、「virプラスミド」又は「virヘルパープラスミド」と呼ばれる。トランスフェクトされるT-DNAを含有するプラスミドがいわゆるバイナリーベクターであり、これを本明細書では「DNA分子」又は「ベクター」とも呼ぶ。用語「株」又は「アグロバクテリウム株」は、バイナリーベクター以外のアグロバクテリウムの成分に関する。したがって、本明細書では、バイナリーベクターを含有しないバイナリーアグロバクテリウム株とバイナリーベクター導入後のバイナリーアグロバクテリウム株を、同じ株名で呼ぶ。

#### 【0065】

アグロバクテリアの懸濁液は、次のように生成することができる。核酸構築物を含有するDNA分子又はベクターをアグロバクテリウム株に形質転換することができ、形質転換されたアグロバクテリウム培養物を、前記DNA分子の維持のために場合により選択圧をかけながら増殖させる。1つの方法では、その後、本発明の方法で使用するアグロバクテリウム株を培養培地に接種し、高い細胞濃度まで増殖させる。大量の培養培地を得るために、小容量の高濃度培養培地をより多数の培養物に接種してもよい。一般に、アグロバクテリアを600nmで少なくとも1、典型的には約1.5のODに相当する細胞濃度まで増殖させる。その後、かかる高濃度アグロバクテリア懸濁液を希釈して所望の細胞濃度を達成する。高濃度アグロバクテリア懸濁液の希釈には水を使用する。この水は、緩衝剤又は塩類を含有することもある。水は、上述の界面活性剤をさらに含有することもある。或いは、濃厚アグロバクテリア懸濁液を水で希釈してもよく、その希釈工程後又は中に任意の添加剤、例えば界面活性剤及び任意選択の緩衝物質を添加する。研磨剤を希釈前、中又は後に添加してもよい。しかし、アグロバクテリア懸濁液に研磨剤を均一に分散させるために研磨剤の添加中に懸濁液を攪拌することが好ましい。濃厚アグロバクテリア懸濁液を希釈するステップを、希釈した懸濁液を噴霧するために使用される噴霧器の噴霧タンクの中で行ってもよい。

#### 【0066】

本発明の方法において植物又は植物部分のトランスフェクションに使用される噴霧器は、植物の数又は噴霧する面積に主として依存する。1つ又は少数の植物に噴霧するために、家庭及びガーデニングに広く使用されているようなポンプ噴霧器を使用することができる。これらは、0.5リットルと2リットルの間の噴霧タンク容量を有することができる。中規模の散布には、手動操作型液体噴霧器、例えば、レバー操作型ナップサック噴霧器又は手動操作型圧縮噴霧器を使用することができる。しかし、本発明で達成される高いトランスフェクション効率は、圃場又は温室で生育する植物などの多くの植物のトランスフェクションにその最大の可能性がある。このために、電動式液体噴霧器、例えば、噴霧ブームを装備したトラクター搭載液体噴霧器を使用することができる。広い畑にはヘリコプター又は飛行機を使用する空中散布技術も可能である。これらすべてのタイプの噴霧器が

当技術分野において公知であり、例えば G . A . M a t t h e w s による書籍「P e s t i c i d e A p p l i c a t i o n M e t h o d s」、第3版、B l a c k w e l S c i e n c e、2000に記載されている。噴霧器の噴霧タンク内での均質な懸濁を確保するために、小又は中型噴霧器を噴霧中、一定の間隔で又は継続的に振ってもよい。トラクター搭載噴霧器などの大きい噴霧器には噴霧タンク内に攪拌機を装備すべきである。

【0067】

噴霧する懸濁液中のアグロバクテリア細胞及び場合により研磨剤を考慮して、本発明で使用する噴霧器は、少なくとも微粒噴霧液滴サイズの噴霧を生じさせるべきである。また、G . A . M a t t h e w s による上述の書籍、74頁において使用されている噴霧の分類の中粒噴霧又は粗粒噴霧を用いてもよい。本発明の噴霧の主な目的は、懸濁液での植物組織の湿潤である。したがって、正確な液滴サイズは重要でない。しかし、圧力を上昇させて植物表面に噴霧を施すことにより、トランスフェクション効率をさらに向上させることができる。

【0068】

本発明の方法でもたらされる非生物的ストレス抵抗性向上以外の任意の所望の形質を植物にもたらす遺伝子を含有する遺伝子導入植物に本発明の方法を適用することが可能である。

【0069】

本発明は、アグロバクテリウム株の細胞を含有する組成物であって、前記アグロバクテリウム株が、プロモーターに作動可能に連結された目的の異種DNA配列を含有する核酸構築物を含み、目的の前記ヌクレオチド配列が、植物に非生物的ストレス抵抗性増加を、前記植物において発現されると、もたらす上記組成物も提供する。この組成物は、液体であることもあり、又は固体であることもある。固体組成物の例は、前記アグロバクテリウム株の細胞を含有する乾燥又は凍結乾燥組成物である。液体組成物の例は、下で述べる懸濁液である。凍結乾燥組成物は、アグロバクテリウム細胞を含有する懸濁液を、好ましくは、グリセロールなどの凍結防止剤の存在下で冷凍乾燥させることによって調製することができる。前記組成物は、スプレーアジュバント又は上述の好ましくは非イオン性の湿潤剤、例えばオルガノシリコン界面活性剤をさらに含むことがある。例えば水又は水性溶媒での希釈により、噴霧用の懸濁液を生成するために、前記組成物を使用することができる。

【0070】

本発明の方法では、非生物的ストレス抵抗性増加を前記植物にもたらすことができる目的の前記ヌクレオチド配列又は前記タンパク質を多細胞植物、特に高等植物において発現させることができる。農業に使用される作物植物が好ましい。単子葉植物と双子葉（作物）植物の両方を使用することができる。本発明での使用のための一般的な作物植物としては、アルファルファ、オオムギ、マメ、キャノーラ、ササゲ、ワタ、トウモロコシ、クローバー、ハス、レンズマメ、ハウチワマメ、キビ、オートムギ、エンドウマメ、ピーナッツ、イネ、ライムギ、スイートクローバー、ヒマワリ、スイートピー、ダイズ、モロコシ、ライコムギ、クズイモ、ハッシュウマメ、カラスノエンドウ、コムギ、フジ及び堅果植物が挙げられる。本発明の実施に好ましい植物種としては、イネ科、キク科、ナス科及びバラ科の代表物が挙げられるが、それらに限定されない。好ましい植物は、植物連鎖に通常は入らない植物、例えば、タバコ属種、例えばタバコ（*N . t a b a c u m*）及びベンサミアナタバコ（*N . b e n t h a m i a n a*）であり、使用することができる。

【0071】

一般に、前記タンパク質を前記植物又は植物部分の細胞のサイトゾルにおいて発現させる。この場合、特定の区画にタンパク質を指向させるいずれのシグナルペプチドも酵素に加えない。

【0072】

本発明において発現及び使用される、非生物的ストレス抵抗性増加を前記植物にもたらすことができるタンパク質は、一般に、本発明においてそのタンパク質を発現させること

10

20

30

40

50



ができる植物又は植物部分とは異種のタンパク質であり、すなわち、前記植物又はその部分は、そのタンパク質を天然に生産しない。これらの酵素をコードする遺伝子の植物における発現への、特にそれらの発現に用いられる植物における発現へのコドン使用頻度を最適化することが可能である。コドン最適化は、発現収率を増加させる標準的方法である。コドン最適化遺伝子及び核酸を商業的供給源、例えば、ドイツ、レーゲンスブルクの *Entelechon GmbH* に発注することができる。

#### 【0073】

植物の非生物的ストレス抵抗性増加は、本発明の懸濁液での植物の処理、及び対照又はリファレンスとして、前記アグロバクテリウム株の前記細胞を含有しない懸濁液での同じタイプの植物の他の点では同一の条件下での処理によって判定することができる。その後、両方の植物を同一の条件の非生物的ストレスに付す。本発明に従って処理した植物の非生物的ストレス抵抗性増加を、より元気な生育又はより良好な健康状態によって検出することができる。

10

#### 【0074】

本発明に従って増加させることができる非生物的ストレス抵抗性の例は、以下である：乾燥抵抗性、塩抵抗性、浸透圧ストレス抵抗性、低温抵抗性、凍結抵抗性、熱抵抗性、重金属に対する抵抗性、低酸素に対する抵抗性又は酸化ストレス抵抗性。

#### 【0075】

植物の乾燥ストレス耐性を向上させるための目的のヌクレオチド配列及びタンパク質の例を以下に与える。遺伝子及びタンパク質の参照先も与える。

20

#### 【0076】

JH642などの枯草菌亜種スプチリス株からの *CspB* (AAB01346)。Castiglioniら、*Plant Physiology* 147(2008)446~455及びHungerら、*J. Bacteriol.* 188(2006)240~248。植物における発現のためにコドン最適化された *CspB* のコード配列を配列番号1に与える。アミノ酸配列を配列番号2に与える。

#### 【0077】

大腸菌低温ショックタンパク質7.4 (*cspA*) 遺伝子。植物における発現に適した *CspA* タンパク質のコード配列を配列番号3に与える。アミノ酸配列を配列番号4に与える。

30

#### 【0078】

シロイヌナズナ核転写因子YサブユニットB-1 (NF-YB1) (NM\_129445.2) は、遺伝子導入植物の乾燥抵抗性を増加させる；Nelsonら、*PNAS* 104(2007)16450~16455を参照されたい。コード配列を配列番号5に与える。アミノ酸配列を配列番号6に与える。

#### 【0079】

BnLAS-GRASファミリー遺伝子。植物におけるそれらの異所発現は、生育を阻害し、開花を遅らせ、葉の老化を遅らせ、乾燥抵抗性を増加させる；Yangら(2011) *Plant Cell Rep* 30(3):373~88を参照されたい。コード配列を配列番号7に与える。アミノ酸配列を配列番号8に与える。

40

#### 【0080】

IPT (イソペンテニルトランスフェラーゼ) 発現は、湯水中、光合成タンパク質複合体の分解を防止する；Riveroら、*Plant Cell Physiol.* 51(2010)1929~1941、及びOriら、*The Plant Cell* 11(1999)1073~1080を参照されたい。IPTコード配列を配列番号21に与える。アミノ酸配列を配列番号22に与える。

#### 【0081】

BcWRKY46-TF、WRKYタンパク質ファミリーのメンバー、は、タバコの低温、塩及び脱水ストレス耐性を強化することが報告された；Wangら、*Mol. Biol. Rep* 39(2012)4553~4564を参照されたい。BcWRKY46の

50

コード配列を配列番号 11 に与える。アミノ酸配列を配列番号 12 に与える。

【0082】

ヒマワリからの H a H B 1、A t H B 13、A t P R 2、A t P R 4 及び A t G L U - ホメオドメイン・ロイシンジッパー転写因子は、乾燥及び塩分ストレスに対する耐性を付与する；C a b e l l o 及び C h a n ( 2012 ) P l a n t B i o t e c h n o l . J . 10 ( 2012 ) 815 ~ 825 を参照されたい。スプライス部位を除去した完全コード配列を配列番号 13 に与える。アミノ酸配列を配列番号 14 に与える。

【0083】

グラム陰性植物病原菌からのハーピン - 過敏細胞死 ( H C D )、病原体防御を刺激し、植物の生育を増進し、乾燥耐性を強化する；Z h a n g ら、J . E x p . B o t . 62 ( 2011 ) 4229 ~ 4238 を参照されたい。

10

【0084】

A V P 1 H + ポンプ ( 液胞 H 1 - ピロホスファターゼ ) - 液胞 H 1 - ピロホスファターゼを過剰発現する植物は、同質遺伝子野生型株より高 N a C l 濃度及び水分欠乏に対する抵抗性はるかに高い；G a x i o l a ら、2001 P N A S 98 ( 20 ) 11444 ~ 11449；P a r k ら、P N A S 102 ( 2005 ) 18830 ~ 18835；Z h a n g ら ( 2011 ) P l a n t S i g n a l i n g & B e h a v i o r 6 : 6、861 ~ 863 を参照されたい。コード配列を配列番号 17 に与える。アミノ酸配列を配列番号 18 に与える。

【0085】

20

イネからのストレス応答性遺伝子 S N A C 1 ( ストレス応答性 N A C 1 ) ( G e n B a n k : D Q 394702 ) - S N A C 1 ( ストレス応答性 N A C 1 ) は、過酷な乾燥ストレス条件下の圃場で生殖生長期の遺伝子導入イネの乾燥抵抗性を有意に強化し、その上、表現型の不利益も収量損失も示さない；H u ら ( 2006 ) P N A S 103 : 12987 ~ 12992 を参照されたい。コード配列を配列番号 19 に示す。アミノ酸配列を配列番号 20 に示す。

【0086】

以下のタンパク質を植物において発現させることによって塩耐性を増加させることができる：

G m R D 22 ( ダイズからのアポプラスト局在 B U R P - ドメインタンパク質 ) は、遺伝子導入シロイヌナズナ及びイネの塩分及び浸透圧ストレス耐性を増加させ、リグニン生産を増加させる；W a n g ら ( 2012 ) P l a n t C e l l E n v i r o n . 35 ( 2012 ) 1932 ~ 1947 を参照されたい。G m R D 22 のコード配列を配列番号 9 に与える。アミノ酸配列を配列番号 10 に与える。

30

【0087】

ヒマワリからの H a H B 1、A t H B 13、A t P R 2、A t P R 4 及び A t G L U - 上述のホメオドメイン・ロイシンジッパー転写因子を、植物の塩耐性を増加させるために使用することができる。

【0088】

アポプラストのアスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子の発現抑制は、植物の塩耐性を増加させる；Y a m a m o t o ら、J . E x p B o t a n y 56 ( 2005 ) 1785 ~ 1796 を参照されたい。タバコからの遺伝子のコード配列を配列番号 15 に与える。アミノ酸配列を配列番号 16 に与える。当技術分野において公知であるように R N A 干渉を用いることによってアスコルビン酸オキシダーゼの発現を抑制することができる。

40

【0089】

A V P 1 H + ポンプ ( 液胞 H 1 - ピロホスファターゼ ) - 液胞 H 1 - ピロホスファターゼを過剰発現する遺伝子導入植物は、同質遺伝子野生型株より高 N a C l 濃度及び水分欠乏に対する抵抗性はるかに高い；G a x i o l a ら、2001 P N A S 98 ( 20 ) 11444 ~ 11449；Z h a n g ら ( 2011 ) P l a n t S i g n a l i n g & B e h a v i o r 6 : 6、861 ~ 863 を参照されたい；配列については上

50

を参照されたい。

【0090】

イネからのストレス応答性遺伝子SNAC1(ストレス応答性NAC1)(GenBank: DQ394702) - SNAC1(ストレス応答性NAC1)は、過酷な乾燥ストレス条件下の圃場で遺伝子導入イネの乾燥塩抵抗性を強化する; Huら(2006)PNAS 103: 12987~12992を参照されたい。コード配列を配列番号19に示す。アミノ酸配列を配列番号20に示す。

【0091】

以下のタンパク質を植物において発現させることによって低温耐性を増加させることができる:

BcWRKY46-TF、WRKYタンパク質ファミリーのメンバー。遺伝子導入タバコにおける構成的発現は、低温、ABA、塩及び脱水ストレスに対する感受性を低減させた。Wangら(2012)Mol. Biol. Rep.

【0092】

SNAC1標的遺伝子OsSRO1cは、イネにおいて過酸化水素を調節することにより酸化ストレス耐性を修飾する; Youら、J. Experimental Botany(2013)を参照されたい。

【0093】

LeCYP1-トマトシクロフィリン。コード配列を配列番号23に与える。アミノ酸配列を配列番号24に与える。根形成向上により乾燥抵抗性; Ohら(2006)Plant 224: 133~144を参照されたい。

【0094】

本発明に従って非生物的ストレス抵抗性増加を植物にもたらすために、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22及び24のタンパク質のいずれかを植物において発現させてもよい。同じ目的が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22及び24の配列のいずれかと100%未満の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質を前記植物において発現させることによって達成されることもある。発現されるタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22及び24のいずれか1つのアミノ酸配列全体と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する変異体タンパク質であることもある。前記アミノ酸配列同一性は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22及び24のいずれか1つのアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%及びさらに好ましくは少なくとも97%であることもある。アミノ酸配列同一性パーセントを算出する場合、2つの配列を最適にアラインメントし、それら2配列間のヌクレオチド又はアミノ酸残基の完全一致数を決定する。その完全一致数をアラインメントした領域(すなわち、アラインメントしたアミノ酸残基の数)で割り、100をかけて、配列同一性パーセント値に到達する。ギャップ、すなわち、残基が一方の配列には存在するが他方には存在しないアラインメント内の位置は、非同一残基がある位置と考えられる。アミノ酸配列同一性は、標準設定を用いてBLASTX2.2.14を使用して決定することができる。標準設定は、例えば、アラインメント内の配列ギャップを可能にする。

【0095】

アラインメントする領域の長さは、好ましくは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22又は24のそれぞれのタンパク質の全長にわたる。

【0096】

別の実施形態において、発現されるタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22及び24のいずれか1つのアミノ酸残基数の少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の、且つ、かかる長さにならってそれぞれ配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22又は24と少なくとも90%の配列同一性のアミノ酸配列を含む又はから成

10

20

30

40

50

る。別の実施形態において、発現されるタンパク質は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のいずれか 1 つのアミノ酸残基数の少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、さらに好ましくは少なくとも 95% の、且つ、かかる長さにならってそれぞれ配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 又は 24 と少なくとも 95% の配列同一性のアミノ酸配列を含む又はから成る。これらの実施形態において、変異体タンパク質は、好ましくは、植物に配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 又は 24 のそれぞれのタンパク質の非生物的ストレス抵抗性増加をそれぞれもたらすことが尚できる。

#### 【0097】

或いは、変異体タンパク質は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と比較して 1 ~ 数個のアミノ酸付加、置換又は欠失を有するアミノ酸配列を有する、又はから成り、前記変異体タンパク質は、好ましくは、非生物的ストレス抵抗性増加を前記植物にもたらすことが尚できる。アミノ酸付加、置換又は欠失の最大数は、最大で 20、好ましくは最大で 15、さらに好ましくは最大で 10、及びさらにいっそう好ましくは最大で 5 であり得、それに従って、付加、置換及び付加の合計数により「アミノ酸付加、置換又は欠失」の数が決まる。

#### 【0098】

他の実施形態において、発現されるタンパク質は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のいずれか 1 つのアミノ酸配列とこれらの配列番号の全長にならって比較して少なくとも 90% のアミノ酸配列類似性を有する。好ましくは、配列同一性は、これらの配列番号の全長にならって少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 98% である。別の実施形態において、発現されるタンパク質は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のいずれか 1 つのアミノ酸残基数の少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、さらに好ましくは少なくとも 95% の、且つ、かかる全長にならってそれぞれ配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 のいずれか 1 つと少なくとも 90%、好ましくは少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 98% の配列類似性の、アミノ酸配列を含む又はから成る。

#### 【0099】

タンパク質配列の配列類似性は、あるアミノ酸と別のアミノ酸のすべての可能な交換についてのスコアに関する置換行列を用いる。タンパク質配列間の類似度は、例えば、BLOSUM 62 置換行列 (Henikoff 及び Henikoff、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 10915) で評価することができる。

#### 【0100】

前記植物に乾燥ストレス抵抗性増加をもたらすことができるタンパク質は、低温ショックドメインを有することがあり、好ましくは、前記タンパク質は、一本鎖 RNA の結合部位を有する RNA シャペロンである。低温ショックタンパク質などの RNA シャペロンは、ミスフォールドした RNA 分子を、RNA 二本鎖の不安定化又は一本鎖核酸への結合によって回復させると考えられる (例えば、Hunger ら、J. Bacteriol. 188 (2006) 240 ~ 248 を参照されたい)。好ましくは、前記タンパク質は、配列番号 2 の枯草菌 CspB であるか、又は配列番号 2 の枯草菌 CspB の (上で定義したとおりの) 変異体である。1 つの実施形態において、前記タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。

#### 【0101】

タンパク質が、配列番号 2 のアミノ酸配列によって定義されるタンパク質の変異体である場合、前記タンパク質は、大腸菌からの CspA のアミノ酸残基 W11、F18、F20、F31、H33 及び F34 を、大腸菌からの CspA 中のこれらの位置に対応する位置に、少なくとも有する。大腸菌からの CspA 中の位置に対応する位置は、アラインメントによって決定することができ、前記タンパク質配列の最適アラインメントに対応する

。

## 【0102】

1つの実施形態において、非生物的ストレス耐性は、乾燥耐性であり、前記タンパク質は、配列番号8の植物転写因子LAS、又は配列番号10のGmRE222、又は上で定義したとおりのその変異体である。かかる実施形態において、植物は、双子葉植物、好ましくはナス科植物、及びさらに好ましくはトマト植物である。

## 【実施例】

## 【0103】

(参照例1)

コロニー形成単位(cfu)での液体培地中のアグロバクテリウム細胞濃度の決定

液体懸濁液1ml当たりのコロニー形成単位(cfu/ml)での液体懸濁液中のアグロバクテリウム細胞の濃度を、次のプロトコルを用いて決定することができる。構築物pNMD620で形質転換したアグロバクテリウム・ツメファシエンスICF320株の細胞を、25mg/L カナマイシン(AppliChem、A1493)と50mg/L リファンピシン(Carl Roth、4163.2)とを含有する7.5mlの液体LBS培地中で増殖させた。細菌培養物を継続的に振盪しながら28℃でインキュベートした。分光光度計を使用して、600nm波長で、吸光度単位(AU)で表される細菌培養物の吸光度又は光学密度(OD600)を培養物の1mlアリコートでモニターした。液体培養物1ミリリットル当たりのコロニー形成単位数(cfu/ml)として概算される細胞濃度をOD600値1、1.3、1.5、1.7及び1.8で分析することができる。このために、液体培養物の250µlアリコートをLBS培地で希釈して、25mlの最終体積を達成した(希釈1:100)。2.5mlのかかる1:100希釈物を22.5mlのLBSと混合して、希釈1:1000を達成した。液体培養希釈物1:100、1:1,000、1:10,000、1:100,000、1:1,000,000、1:1,000,000、1:10,000,000及び1:100,000,000を同様に調製した。25mg/L カナマイシンと50mg/L リファンピシンとを補足した寒天凝固LBS培地に少なくとも3種の希釈物のアリコート(直径90mmのプレート1枚当たり250µlの細菌培養物)を塗布した。各希釈物のアリコートのプレーティングを三重反復で行った。28℃で2日のインキュベーション後、細菌コロニーをプレートごとに計数した。1:1,000,000及び1:10,000,000希釈物のプレーティングにより、それぞれ、プレート1枚当たり数百及び数十のコロニーを得た。プレート1枚当たりほんの少数のコロニーしかもたらさない希釈1:100,000に関しては、この希釈を細胞濃度の算出に用いなかった。細胞濃度を次の式に従って概算した： $cfu/ml = 4 \times \text{コロニー数} \times \text{プレート} \times \text{希釈係数}$ 。

## 【0104】

600nm(LB培地中)での及び細胞形成単位での吸光度測定により測定する場合の形質転換細胞濃度について、本明細書では次の関係を用いる：1.0のOD600は、 $1 \times 10^9 cfu/ml$ に相当する。

## 【0105】

LBS培地(液体)

1%大豆ペプトン(大豆粕のパパイン水解物; Duchefa、S1330)

0.5%酵母エキス(Duchefa、Y1333)

1%塩化ナトリウム(Carl Roth、9265.2)

を水に溶解し、それを1M NaOH(Carl Roth、6771.2)でpH7.5に調整する。

## 【0106】

固体LBS培地を調製するために、液体LBS培地に1.5%寒天(Carl Roth、2266.2)を補足した。培地を121℃で20分間、オートクレーブで処理した。

## 【0107】

## (例1)

## 後続の例で使用するベクター

本研究において、本発明者らは、35S CaMVプロモーターと細胞間移行能力を有する又は有さない、TMVに及びPVXに基づくウイルスレプリコンとに基づく標準的な転写ベクターを使用した。5つすべてのタイプのクローニングベクターについてのプラスミドマップを図1に示す。すべての場合、catg及びgattc(taag)5'及び3'オーバーハングをそれぞれ有するBsaIクローニング部位を用いて目的の遺伝子を挿入した。pNMD2492転写ベクターは、pLCBV10、pBIN19由来バイナリーベクター(Marillonnetら、2004、2006)に基づいて作成した。このベクターは、T-DNAの左右の境界の間に挿入された2個の発現カセットを含有する。右の境界に隣接する発現カセットは、CAMV 35Sプロモーターと、オメガ翻訳エンハンサーと、目的の遺伝子の挿入のためのBsaIクローン部位と、nosターミネーターとを含んだ(配列順に記載)。左の境界に隣接する発現カセットは、35Sプロモーター、続いてオメガ翻訳エンハンサー、トマトブッシュスタントウイルス(TBSV)からのサイレンシングのP19サブプレッサーのコード配列(GenBank受託番号CAB56483.1)及びocsターミネーターを含有した。

10

## 【0108】

細胞間移行能力を有する、TMVに基づくベクターpNMD035、細胞間移行能力がない、TMVに基づくベクターpNMD661、細胞間及び全身移行能力を有する、PVXに基づくベクターpNMD670、並びに全身移行も細胞間移行も不可能にされた、PVXに基づくベクターpNMD694は、特許「植物をトランスフェクトする方法(Process for transfecting plants)」に既に記載されている。

20

## 【0109】

BsaIクローニング部位を用いてpNMD1426クローニングベクターにシロイヌナズナ核転写因子YサブユニットB-1(NF-YB1)のコード配列(GenBank:NM\_129445.2)を直接挿入することにより、プラスミド構築物pNMD3486を作成した。同様に、同じクローニングベクターに枯草菌亜種スプチリスJH642株からの低温ショックタンパク質のコード最適化コード配列(GenBank:AA01346)を挿入して、プラスミド構築物pNMD3493を得た(図2)。

30

## 【0110】

## (例2)

ナタネ植物の乾燥抵抗性に対するNF-YB1及びCspB遺伝子の一過性発現の影響  
7週齢セイヨウアブラナ植物に、pNMD3486及びpNMD3493構築物(それぞれ、35Sプロモーターの制御下にあるNF-YB1及びCspBコード配列を含有する転写ベクター)(図2)を保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンスCryX株を噴霧した。A.ツメファシエンスCryX株は、国際特許出願PCT/EP2013/000994に記載されている。噴霧当日、植物の灌水を停止した。11日の渇水後、その後7日、植物に灌水した。その後、植物を13日の渇水に付し、再び1日灌水した。第1の渇水処理(11日)の終了までは、NF-YB1、CspB及び未処理対照植物すべてが、一切の群間有意差なくしおれて見えた(図3)。その後7日の灌水中にすべての植物は、渇水処理前に有した形状を回復し、植物は健康且つ元気に見えた(図4)。第2の渇水処理(8日)の終了までは、CspB植物は、NF-YB1植物と比較した場合、わずかにしおれが少なかった(図5)。1日の再灌水後、CspB植物は、他の2群よりはるかに元気であった(図6)。

40

## 【0111】

## (例3)

トマト植物の乾燥耐性に対するBnLAS及びGmRD22遺伝子の一過性発現の影響  
3週齢トマト栽培品種バルコニー・レッド植物に、pNMD7570、pNMD7600及びpNMD600構築物(それぞれ、BnLAS、GmRD22及びGFPコード配

50

列を含有する全身移行能力を有する、P V Xに基づくベクター）（図 7）を保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンシ I C F 3 2 0 株を噴霧した。植物の灌水を噴霧 3 週間後に停止した。湯水曝露は 1 4 日間続いた。湯水処理の終了までは、B n L A S 及び G m R D 2 2 トランスフェクト植物のほうがトランスフェクトされていない対照植物よりしおれが少なかった（図 8）。1 4 日の湯水（土壌の水飽和率およそ 3 4 %）後、果実を収穫するまで植物に再び灌水した。湯水に曝されたトマト植物の果実収量を、アグロバクテリアを噴霧してから 1 0 0 日後に評価した。この実験に含めた個々の植物について収穫された果実を図 9 に示す。湯水曝露後、G m R D 2 2 トランスフェクト植物は、トランスフェクトされていない植物及び B n L A S がトランスフェクトされた植物及び G F P 植物と比較した場合、高い果実バイオマスを示した（図 1 0）。

10

#### 【 0 1 1 2 】

稚苗の乾燥抵抗性に対する B n L A S の一過性発現の効果を評価するために、土壌で生育した 1 2 日齢トマト（栽培品種バルコニー・レッド）小植物に、P V X ベクター p N M D 7 5 8 0 （B n L A S 挿入）及び p N M D 5 8 0 0 （G F P 挿入、トランスフェクション対照）を保有するアグロバクテリアの懸濁液を噴霧した。噴霧 1 3 日後、苗を 1 0 日の湯水に曝し、その後、再び灌水した。1 0 日の湯水処理後、トランスフェクトされていない苗及び G F P ベクターがトランスフェクトされた苗と比較して、B n L A S トランスフェクト植物のほうが元気であり、しおれが少なかった（図 1 1、上のパネル）。その差は、2 時間の水回復後、よりいっそう明らかである（図 1 1、下のパネル）。

20

#### 【 0 1 1 3 】

##### （例 4）

トマト植物の浸透圧ストレス抵抗性に対する B n L A S 及び G m R D 2 2 遺伝子の一過性発現の影響

土壌で生育した 1 2 日齢トマト（栽培品種バルコニー・レッド）苗に、P V X ベクター p N M D 7 5 8 0 （B n L A S 挿入）、p N M D 7 6 1 0 （G m R D 2 2 挿入）及び p N M D 5 8 0 0 （G F P 挿入、トランスフェクション対照）を保有するアグロバクテリアの懸濁液を噴霧した。噴霧 1 3 日後、P E G 6 0 0 0 の 2 0 % 溶液が入っているビーカーに苗を移し、そこで 2 0 時間インキュベートした。図 1 2 に描写されているように、トランスフェクトされていない植物及び G F P ベクターがトランスフェクトされた植物と比較して、B n L A S 及び G m R D 2 2 トランスフェクト植物のほうが生育可能であり、しおれが少なかった。

30

#### 【配列表フリーテキスト】

#### 【 0 1 1 4 】

本明細書において言及する核酸及びアミノ酸配列

C s p B - 枯草菌からの低温ショックタンパク質

配列番号 1 : E n t e l e c h o n によって合成された、セイヨウアブラナのコドン最適化された完全 C D S、G e n B a n k : A A B 0 1 3 4 6

#### 【化 1】

Atgctagagggcaaaagtgaagtgggttcaacagcgagaagggaattcggctttatcgaagtggaaggcc  
aggatgacgtgtttgttcacttctctgccatccaagggaaggattcaagacactggaggaaggaca  
ggcagtcctcattcgagatagtcgaggggaatagaggacctaagctgcgaacgttaccaaaggagct  
tga

40

配列番号 2 : アミノ酸配列 :

#### 【化 2】

MLEGKVKWFNSEKGFIEVEGQDDVFVHFSAIQGGFKTLEEGQAVSFEIVEGNRGPQAANVTKEA

大腸菌低温ショックタンパク質 7 . 4 ( c s p A ) 遺伝子、完全 c d s

G e n B a n k : M 3 0 1 3 9 . 1

50

配列番号 3 : C D S :

【化 3】

Atgtccggtaaaatgactggtatcgtaaaatggttcaacgctgacaaaggcttcggcttcactc  
ctgacgatggctctaaagatgtgttcgtacacttctctgctatccagaacgatggttaciaaatctct  
ggacgaaggctcagaaagtgtccttcaccatcgaaagcggcgctaaaggcccgagctggtaacgta  
accagcctgtaa

配列番号 4 : タンパク質 :

【化 4】

Msgkmtgivkwfnadkgfgfitpddgskdvfvhfsaiqnogyksldegqkvsftiesgakgpaagnv  
tsl

10

M F - Y B 1 - シロイヌナズナ核転写因子 Y サブユニット B - 1

配列番号 5 : E n t e l e c h o n によって合成された O R F 原配列

G e n B a n k : N M \_ 1 2 9 4 4 5 . 2

【化 5】

atggcggatagccttcgagcccagctggagatggcggagaaagcggcggttcggttagggagcagg  
atcgataccttcctatagctaataatcagcaggatcatgaagaaagcgttgccctcctaattggttaagat  
tggaagagatgctaaggatacagttcaggaatgcgtctctgagttcatcagcttcactagcagag  
gccagtgataagtgtcaaaaagagaaaaaggaaaactgtgaatggtgatgatttgttgtgggcaatgg  
caacattaggatttgaggattacctggaacctctaaagatatacctagcaggtacagggagttgga  
gggtgataataagggatcaggaaagagtggagatggatcaaataagagatgctggtggcggtgtttct  
ggtgaagaaatgccgagctgg

20

配列番号 6 : アミノ酸配列

【化 6】

MADTPSSPAGDGGESGGSVREQDRYLPANISRIMKKALPPNGKIGKDAKDTVQECVSEF  
ISFITSEASDKCQKEKRKTVNGDLLWAMATLGFEDYLEPLKIYLARYRELEGDNKGSGK  
SGDGSNRDAGGVSSEEMPSW

B n L A S - セイヨウアブラナ栽培品種ホワ・シュワーン ( H u a s h u a n g ) 5  
番転写因子 L A S

30

配列番号 7 : E u r o f i n s M W G O p e r o n によって合成された完全 C D S  
スプライス部位を除去 : 4 5 4 - 4 5 6 : A G T C 、 C 6 5 1 T

G e n B a n k : H Q 3 2 4 2 3 3 . 1



## 【化 7】

atgcttacttctctcaaatcctctagctcctcctccgaagatgccaccgagaatcctcctcctcctc  
 ctcggttatgcctcgctcatcttctgccgcaacatccgctcctcatcacctcgtcgtctactatt  
 cacagctgcggtttcatctctcagtcacacgtctccgctcctcaaacatactctcaatcctctcc  
 tcaactcttcccttacggggactccacggagcggctcgtccatctcttcaccaaaagccttggtcgg  
 tacggatcggttggtctgaaaacactgccacgtggacagcgaacgaaatggcttctagctccacgggt  
 ttttacaagcagtgatgcaaagaacagttcttggttcgaaccaagaacaacaactctgatctc  
 gagtcttggtactatctttgggtgaaccaactaacaccgtttatttcggttctcccatttaacggcga  
 accaagcgatcctcgacgcgactgagacaaacaacggtaacggagctttacataacttgacttaga  
 tatatcacaaggacttcaatggcctccgttgatgcaagccctagccgagagatcatcatcaaacct  
 agcagtactccacctccttccctccgcataaccggatgtggtcgagatgtaaccgtattaaaccgaa  
 ccggagatcggttaaccgggttgctaaactctctaggtcttcagtttcagtttcacacgcttgat  
 cgctgaagaagacctcgccggacttttgcttcagatcagattattagctctctccgccgtacaagga  
 gagtccatcgccgtcaactgcgtccacttcttcacagattctttaacgacgacggagacatgatcg  
 gtcacttctgtcgccgatcaagagcttaaaccttagaatcgtgacaatggcggagagagaagcgaa  
 ccatggagatccttcgttcttgactagattctcagaggcttttagatcatttcattggcgatatttgat  
 tcgttggaagcgactttgccgcaaacagcaaagagaggctaaccctagagcaacgggtggttcggta  
 tggagattttggatggttggtggcggaagcggcggaagaaagcaaagacatcgagggttgagggt  
 ttgggaggagatgatgaagagacatggcttgctaacgtgccaataggaagctttgcttctctcaa  
 gctaagcttctgcttagactccattatcttcagaaggttataatcttcagtttctcaacgactctt  
 tgttcttggtggaaaaatcgtcttctcttctccgtttcgtcgtggaaa

10

配列番号 8 : アミノ酸配列

20

## 【化 8】

MLTSFKSSSSSEDATEENPPPPPLCLASSAATSAAHHLRRLFTAADFISQSNVSAQAQNILSILS  
 SNSSPYGDSTERLVHLFTKALSVRIGLSENTATWTANEMASSSTVFTSSVCKEQFLFRTKNNNNNDL  
 ESCYYLWLNQLTPFIRFSLTANQAILDATETNNGNGALHILDLDISQGLQWPPPLMQALAERSSSNP  
 SSTPPPSLRITGCGRDVTVLNRTGDRLTRFANSLGLQFQFHTLVIAEEDLAGLLLQIRLLALSAVQG  
 ESIAVNCVHFLHRRFFNDGDMIGHFLSAIKSLNPRIVTMAEREANHGDPSTLRFSEALDHFMIFD  
 SLEATLPNSKERLTLEQRWFGMEILDVVAEAAERKQRHRRFEVWEEMMKRHGFANVPIGSFAFSQ  
 AKLLLRLLHYPSEGYNLQFLNDSLFLGWKNRLLFSVSSWK

GmRD22 - サイズからのアポプラスト局在BURP - ドメインタンパク質

配列番号 9 : Eurofins MWG Operonによって合成された完全CDS  
 (Bsai部位除去のためにC843Gサイレント突然変異)

30

GenBank : BT097299.1

## 【化 9】

Atggagtatcgtctcctaccatttttactttactcaatcttgcaactgggtggcaatccatgctgctt  
 tacctcctgaagtttactggaagtcggtgcttctactacgccaatgccaaaagccatcactgatat  
 cttttaccccgattgggtggaagagaaaagtaacctcagtgaatggtggaggcaaggcgtaaacgtg  
 catgcaggaaaaggaggagggtggcaccatgtcaacgttggtggaaaaggatcaggcggaggcgtga  
 acgtgcatgcaggtcacaagggaagccagtgcatgtttctgttggtcaaagtctccattcaatta  
 catctacgcttcaacggagactcaattacacgatgacccaacgtcgactcttcttcttgaaaag  
 gacttgcatcccggaacaaagttgaacttgcaacttaccaccagttccaatattcaagccacattct  
 tgccacgccaagttgcggttctataaccttttcatccagcaagggtggaggttgattcaacaagtt  
 ttccgtaaaaccgggtcagaggaggccagatcatgaagaatactctcagtgaagtgtgaagagggt  
 ggcataaaaggagaggaaaagtactgtgccacttcgcttgaaatccatgattgatttcagcactcca  
 agcttggaaaaaatggtgaggttggtgtccacggaagtagtgaggacaaggaaacgggattgcagaa  
 atacaccgtagcaccgggagtgacaagttatcaggggacaaggctgtgtgtgccacaagcagaac  
 tacccttatgctgttttttactgtcacaactgagacgacaagagcttactctgtgcctttggagg  
 gtgctaattgggttagggttaaagcggtagcagtggtgccacactcacacgtcggaatggaacctaa  
 acatttgcccttcaagtgtcaaagttaaagccaggaaccgttctgtgtgccacttctacctgag  
 gatcatggttggttggttcccaag

40

配列番号 10 : アミノ酸配列



## 【化 1 3】

Atgacttgactggaatggctttctctcctccaatttcattgttacaatcctcccaagaagatgacc  
 atcatgccctacatctctctcctccaatcctcccaccttgagtagaccaccactcaagatttcagtgg  
 tgcgtgctttcttgggaaaaagatctatgtcttcttactcaggtttgaacaacaacaacatggatgga  
 tgtgatcaagaagggaacatgaatggagaagatgagttatcagatgatggatcacagcttcttgcag  
 gagagaaaaagaggagattaaacatggaacaagtgaagacacttgagagaaactttgagttaggaaa  
 taagcttgaaactgagaggaaaatgcaacttgcaagagcacttggaactacaaccaagacagattgct  
 atatgggtttcaaaacagaagagctagatggaaaactaaacagttggaaaaagactatgatgcctca  
 agagacagtttgaaactgttaagctgagaatgattcactccaatctcaaaatcataaacttcattgc  
 tgagataatggcactaaaaaatagagagccagcagaactaatcaacctcaacataaaagaaacagaa  
 ggatcttgcagcaaccgaagcgaaaacagctctgaaatcaaactagacatctcaagaacaccggcta  
 ccgatagccctttatcatcacaccatcaacaccaacaccagccaatacctaattctttttccatcgtc  
 gaatatcgatagacctaattcgaataacattgtggcgcatcaactttccacaattcgtcatcaagg  
 ccggcagatcatcaacttcattgccacaaactcgatcaatcgaatgccattaaagaagaatgtttta  
 gcacaatgtttgttggtatggatgatcaatcaggggttttgccatggttggaacaaccacaattcaa  
 t

10

配列番号 14 : アミノ酸配列

## 【化 1 4】

MTCTGMAFFSSNFMQLQSSQEDDHHAPTSLSPILPPCSTTTQDFSGAAFLGKRSMSSYSGLNNNNMDG  
 CDQEGNMNGEDELSDDGSQLLAGKKRRRLNMEQVKTLERNFELGNKLEPERKMQRLARALGLQPRQIA  
 IWFQNRARRWKTKQLEKDYDALKRQFEAVKAENDSLQSNHKLHAEIMALKNREPAELINLNKETE  
 GSCSNRSENSSEIKLDISRTPATDSPLSSHQHQHQPIPNLFPSSNIDRPNNSNNIVAHQLFHNSSSR  
 PADHQLHCHKLDQSNAIKEECFSTMFVGMDDQSGFWPWLEQPQFN

20

N t A A O - タバコアスコルビン酸オキシダーゼ前駆体

配列番号 15 : Eurofins MWG Operon によって合成された完全 C D S。

GenBank : D43624

## 【化 1 5】

atggcttccttaggcttcttgttcttcttcttgttgccattgattttgcttgagttatcttcatcta  
 ggtcagtaatggcagcaaaaacacggcatttttaaatgggacgtggaatatattcattggtcaccaga  
 tggatgaagaaagtgtagtaatgggaatcaatggacagtttcttggccaactattaggggcaaaagct  
 ggtgatactgttgcgtgttcatcttactaacaagctacatactgaaggtgttgcattcattggcatg  
 gaatccgacagatcggaacaccatgggctgatggaactgcagcaatttcccaatgcgccattaacc  
 tggagagacatttctctataggtttaaagttgataaggcagggacatacttctaccatggacactat  
 ggaatgcaaagatcagcagggctatatggttcactaatagtggaagttggagaaggtgaaaaagaac  
 cattccattatgatggagaattcaatttattgcttagtgactggtggcacaaggttcccatgaaca  
 agaagttgacctctcttccaatcctcttctggttgattggtgaaccccagacattggttgctaaatggg  
 agaggtcaatacaattggttcacttgcggcgcggttagcaaaccaccacttccacagtgcaagttaa  
 gagggggtgaacagtacgcaccccagattctgcgcgtgcgtccaacaagatttacaggcttaggg  
 ggcaagtactactgcattgggttcaactcagcttggccattggggggtcacaagatggtggttagtagaa  
 gcagatggaaactatgttcaaccattttcagtagaagacatggacatttattcaggtgaaagctatt  
 cagtccttttcaaaacagatcaagatcctacaaaaactattggatttcaataaatgtaagaggaag  
 agaaccaaaaacacctcaaggcctcaccttattaaactatcttccaaattctgcatccaaatttcca  
 actttaccaccacctatagcacccttttggatgattataaccatagtaagtcattttctaacaaaa  
 tttttgccttaatgggatcacctaagccaccacctcagaaccatcgctcgatcatcctgctcaatac  
 tcagaacaaaatcgatggttacacgaaatgggctataaataacgtgtcggttggtcttgccaacgcaa  
 ctttatttaggctcgattagatatggcataaacgcgtttgacacgaaacctccaccggacaacttcc  
 ctaaggactatgatgtcctaaaacaagcaccacaaattctaattctacatatggtaatggtgtgtatat  
 gctaaagttcaatactacaattgacattatcctacaaaatgcaaatgccttagctaaagatgttagt  
 gaaattcatccttggcatttgcattggacatgatttttgggtattgggatatggagaagggaaattta  
 gtgaaaaagatgtcaagaagttcaatttaagaatccaccattgagaaatactgctgtgatttttcc  
 ctttgggttgactgcactaagatttgtgacagataatcctggagtttgggcttttcatgtcatatt  
 gagccacatttacatatgggaatgggagttatatgttgcgaaggtgttcatcttgcgaagaaatac  
 ctaagaagctttggcttgtggtttgacaggggaaaatgttgatgagtaacaagcataat

30

40

50

配列番号 16 : アミノ酸配列

【化 16】

MASLGFLFFLLPLILLELSSSRVMAAKTRHFKWDVEYIHWSPDGEESVVMGINGQFPGPTIRAKA  
GDTVAVHLTNKLHTEGVVHWHGIRQIGTPWADGTAAISQCAINPGETFLYRFKVDKAGTYFYHGHY  
GMQRSAGLYGSLIVEVGEKEPFHYDGEFNLLLSDDWHKGSHEQEVLDSSNPLRWIGEPQTLLNG  
RGQYNCSLAARFSKPPLPQCKLRGGEQYAPQILVRPNKIYRLRVASTTALGSLSLAIGGHKMVVVE  
ADGNYVQPFVQDMDIYSGESYSVLFKTDQDPTKNYWISINVRGREPKTPQGLTLLNYLPNSASKFP  
TLPPPIAPLWNDYNHKSFSNKFALMGSPKPPPQNHRIILLNTQNKIDGYTKWAINNVSLVLPQTQ  
LYLGSIRYGINAFDTKPPDNFPKDYDVLKQAPNSNSTYNGVYMLKFNTTIDIILQANALAKDVS  
EIHPLHLMGMGVFAEGVHLVKKIPKEALACGLTGKMLMSNKHN

10

AVP1\_\_ARATH: シロイヌナズナ液胞 H<sup>+</sup> - ピロホスファターゼ (AVP - 3)

配列番号 17 : Eurofins MWG Operon によって合成された完全 CDS ; (E229D 突然変異を有する ; スプライス部位を除去 : A261G、C2004G、A2190T)

GenBank : AEE29349.1

【化 17】

atggtggcgccctgctttgttaccggagctctggacggagatccttgtaccgatttgtgcggtgattg  
gtatcgcccttttcgcttttccaatgggtacgttgatctcgcggtgaaactcacctctgacctcggcgc  
atcgctcttccggtggagctaaacaatgggaagaatggatacgggtgattatctaatacgaggaagaggaa  
ggtgttaatgaccagagtggtgtcgctaagtgcgctgagattcagactgctatttccgaggggtgcaa  
cttcattcctattcacggagtacaaatatgttgggtgtcttcattgatttctttgctgctgttatctt  
tgttttcctcggtctgttgagggttcagcactgataacaagccttgacttacgacaccaccaga  
acctgcaagcctgcattggctactgcagctttcagtaaccattgctttcgtgcttggtgctgttacct  
ctgttctatctggtttccttgggatgaagattgctacatacgctaatactaggaccactttggaggc  
gaggaaagggtgttggaaggcgttcattggtgcattcaggtctggtgctgtgatgggtttccttctt  
gcagcgagtggtctattggtgctttacattactatcaatgtgttcaagatctattacggagatgact  
gggaaggctcttttgacgctattactggttatggtcttggtgggtcttccatggctctctttggcgc  
tggtggtggtgggatctacactaaggctgctgatgtcggcgctgacctgtcggtaaaattgagagg  
aatattccagaggatgatccaagaaaccagctgtcattgctgataatgtcggtgacaatgttggtg  
acattgctggtatgggatctgatctctttggatcatatgctgaagcatcatgcgctgctcttggtgt  
tgctcgatctcatcttccggaatcaaccagacttccactgccatgtgctacccattgctcatcagt  
tcaatgggaatcttggtttggttgatcacaactctcttggcactgacttctttgagattaagcttg  
tcaaggagattgaaccagcattgaagaaccagctcattatctcaactgttattatgactgttggtat  
tgctattgtgtcatgggttggttaccgacctcctttaccatcttcaacttggaaacacaaaaagtt  
gtcaagaactggcagctattcctttgtgtttgtgttggtcttgggctggactcattattggtttcg  
tcaactgagtaactacactagtaacgcctacagccctgtgcaagatgttgagattcatgcagaactgg  
tgcagctaccaatgttatcttcggccttgccttgggtacaaatccgtcattattccaatctttgct  
attgctatcagtatattcggttagcttcagctttgctgctatgtatgggtgttgctgttgctgctcttg  
gtatgctcagtaaccattgccactgggtttggcaattgatgcttatgggtcccatcagtgacaatgctgg  
tggtattgctgaaatggctggaatgagccaccgcatccgtgaaagaactgatgctcttgatgccgct  
ggaaacaccactgctgctattggaaagggtttgccattggctctgctgcctagctctccttggtctc  
tctttggtgctttgtgagccgtgcagggtacacaccgtagatgttttgaccctaaagttatcat  
tgggctccttggttggtgccatgcttccttactggttctctgccatgacaatgaagagtgtgggaagt  
gcagctcttaagatgggtgaagaagttcgagggcagttcaacaccatccctggacttatggaaggaa  
ccgcaaaaccagactacgccacatgtgtcaagatctccaccgatgcttccatcaaggaaatgatacc  
tcttggttgcttgcctgtcatgctcacacctctcattggttggtttcttctttggagttgagacgctctc  
ggtgctcctcgccgatctcttgatccggtgttcagatcgccatatacagcatctaacactggtggtg  
cctgggacaacgccaagaaatacatcgaggctggtgtatcagagcacgcaaagagccttggaacaaa  
gggttcagagccacacaaggcagctgtgattggagacacaattggtgaccattgaaggatacttca  
ggaccttcatgaacatcctcatcaagctcatggctgttgagtctcttgctcttctgctccttcttcg  
ccactcacgggtggtatccttttcaagtacttc

20

30

40

配列番号 18 : アミノ酸配列

## 【化 18】

MVAPALLPELWTEILVPICAVIGIAFSLFQWYVVSRLKTSDLGASSSGGANNGKNGYGDYLIIEEE  
 GVNDQSVVAKCAEIQTASEGATSFLFTEYKYVGVFMIFFAAVIFVFLGSVEGFSTDNKPCTYDTTR  
 TCKPALATAAFSTIAFVLGAVTSVLSGFLGMKIATYANARTTLEARKGVGKAFIVAFRSGAVMGFLL  
 AASGLLVLYITINVFKIYYGDDWEGLFDAITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAADVGADLVGKIER  
 NIPEDDPRNPAVIADNVGDNVGDIAGMGSDLFGSYAEASCAALVVASISSFGINHDFAMCYPLIS  
 SMGILVCLITTLFATDFFEIKLVKEIEPALKNQLIISTVIMTVGIAIVSWVGLPTSFTIFNFGTQKV  
 VKNWQLFLCVCVGLWAGLIIGFVTEYYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYKSVIIPIFA  
 IASIFVSFSFAAMYGVAVAALGMLSTIATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHRIRERTDALDAA  
 GNTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRAGIHTVDVLT PKVIIGLLVGAMLPYWFSA MTMKS VGS  
 AALKMVEEVRRQFNTIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGCLVMLTPLIVGFFFGVETLS  
 GVLAGSLVSGVQIAISASNTGGAWDNAKYIEAGVSEHAKSLGPKGSEPHKAAVIGDTIGDPLKDTSG  
 PSLNILIKLMAVESLVFAPFFATHGGILFKYF

10

SNAC1 - イネ (*Oryza sativa*) (日本型栽培品種群) ストレス誘導転写因子 NAC1 (SNAC1)

配列番号 19 : Entlechon によって合成された、ベンサミアナタバコのコドン最適化された完全 CDS

GenBank : DQ394702.1

## 【化 19】

ATGGGAATGAGACGAGAACGAGACGCAGAAGCCGAGCTTAATCTGCCACCTGGCTTTCGTTTTTCATC  
 CGACTGATGATGAAGTAGTGGAACACTACCTTTGCAGAAAAGCAGCTGGTCAAAGGCTCCCAGTTCC  
 TATCATAGCTGAGGTTGATCTCTATAAATTTGACCCCTGGGATCTTCCGGAAGGGCATTGTTGGG  
 GCTCGTGAATGGTACTTTTTACCCACGCGATAGGAAGTACCCAAACGGATCTCGTCCAAACAGGG  
 CCGCTGGAAACGGTTATTGGAAAGCGACTGGAGCTGACAAGCCAGTAGCTCCTAGGGGGAGAACGCT  
 CGGTATTAAAAGGCTCTAGTTTTCTACGCTGGAAAAGCCCCAAGAGGCGTTAAGACTGACTGGATT  
 ATGCATGAATATAGACTGGCTGATGCTGGAAGAGCTGCTGCGGGGGCTAAGAAAGGTAGTTTGAGAT  
 TAGACGATTGGGTCCTCTGTCCGCTATATAACAAGAAGAACGAGTGGGAGAAGATGCAACAGGGGAA  
 AGAGGTTAAGGAGGAAGCCTCGGATATGGTGACTTCCAGTCGCATAGCCACACCCACTCTTGGGGA  
 GAAACCCGCACACCAGAGTCTGAGATCGTTGATAACGACCCCTTCCGGAATTGGATTCTTCCCTG  
 CCTTTCAACCTGCACCTCCACCTGCAACTGCAATGATGGTCCCGAAGAAAGAATCAATGGACGACGC  
 AACAGCAGCAGCTGCTGCTGCCGCGACAATCCCTAGGAATAATTCAAGCCTTTTCGTAGATCTTCC  
 TACGACGATATTAGGGGATGTATAGCGGCTTAGACATGTTGCCTCCCGGCGACGACTTCTATTCTC  
 CATTGTTTCGCAAGTCCCCGTGTCAAAGGAACAACACCTCGAGCAGGTGCTGGAATGGGAATGGTGCC  
 TTTTAA

20

30

配列番号 20 : アミノ酸配列

## 【化 20】

MGMRRERDAEAEINLPPGFRFHPTDDELVEHYLCRKAAGQRLPVPIIAEVDLYKFDPWDL  
 PERALFGAREWYFFTPRDRKYPNGSRPNRAAGNGYWKATGADKPVAPRGRTLGIKKALVF  
 YAGKAPRGVKTWDWIMHEYRLADAGRAAAGAKKGSRLDDWVLCRLYNKKNEWEKMQQKE  
 VKEEASDMVTSQSHSHTHSWGETRTPESIEVDNDPFPPELDSFPAFQPPPPATAMMVPKK  
 ESMDDATAAAAAAATIPRNNSSLFVDLSYDDIQGMYSGLDMLPPGDDFYSSLFASPRVKG  
 TTPRAGAGMGMVVF-

40

アグロバクテリウム・ツメファシエンス C58 からの IPT イソペンテニルトランスフェラーゼ IPT (E88G)

配列番号 21 : CDS、E88G 突然変異 GenBank : AB025109.1

## 【化 2 1】

Atggatctgctctaattttcgggtccaacttgacacaggaaagacgtcgaccgcggtagctcttgccc  
 agcagactgggcttccagtcctttcgctcgatcggtccaatggtgtcctcagctgtcaaccggaag  
 cggacgaccaacagtggagaactgaaagggaacgagccgtctataccttgatgatcggcctctgggtg  
 aagggatcatcgagccaagcaagctcatgaaaggctgatgggggaggtgtataattatgagggcc  
 acggcgggcttattcttgagggaggatctatctcggttgctcaagtgcagggcgaagcagttattg  
 gaggcggttttcttggtcatattattcgccacgagttagcagacgaggagaccttcatgaacgtg  
 gccaaaggccagagtttaagcagatgttacgccttgctgcaggccttctattatccaagagttgggtg  
 atctttggaaagagcctcggtgagggccatactgaaagagatcgatggatatcgatatgccatgtt  
 gtttgctagccagaaccagatcacatccgatatgctattgcagcttgacgcagatatggaggataag  
 ttgattcatgggatcgctcaggagtatctcatccatgcacgccgacaagaacagaaattccctcgag  
 ttaacgcagccgcttacgacggattcgaaggtcatccattcggaatgtat

10

配列番号 2 2 : アミノ酸配列

## 【化 2 2】

MDLRLIFGPTCTGKTSTAVALAQQTGLPVLSLDRVQCCPQLSTGSGRPTVEELKGTSRLYLDDRPLV  
 KGIIAAKQAHERLMGEVYNYEAHGGILILEGGSISLLKMAQSSYWSADFRWHIIRHELAHEETFMNV  
 AKARVKQMLRPASGLSIIQELVDLWKEPRLRRILKEIDGYRYAMLVFSQNQITSDMLLQLDADMEDK  
 LIHGIAQEYLIHARRQEQKFPRVNAAAYDGFEGHPFGMY

L e C Y P - トマトシクロフィリン

20

配列番号 2 3 : C D S

## 【化 2 3】

M550019.1; gi:170439

Atggcaaatccaaagggttttctttgaccttaccatcggtgggtgcaccagctgggtcggtggtgatgg  
 agctcttcgccgataccactcccaaaaccgctgagaacttccgagctctttgtaccgggtgagaaagg  
 tggttgaaagatggggaagcctttgcaactacaagggctcaaccttccaccgtgtgatccagggttc  
 atgtgtcaaggaggtgatttcaccgccggaacgggaccggaggagagtcgatctatggagccaaat  
 tcaacgatgagaacttcgtaagaagcacaccggccctggaatcctctccatggctaagtctggacc  
 tggaaccaacgggttctcagtttttcatctgtaccgctaagactgagtggtcaacggaaagcacgtc  
 gtgtttggacaagttgttgaaagcatggatgtgattaagaaggcagaggctgttggtatctagctctg  
 gaagggtgctccaagcctgtggttattgctgactgcgggtcaactc

30

配列番号 2 4 : アミノ酸配列

## 【化 2 4】

MANPKVFFDLTIGGAPAGRVVMEFADTTPKTAENFRALCTGEKGVGKMGKPLHYKGSTFHRVIPGF  
 MCQGGDFTAGNGTGGESIYGAKFNDENFVKKHTGPGILSMANAGPGTNGSQFFICTAKTEWLNKGHV  
 VFGQVVEGMDVIKKA EAVGSSSGRCSKPVVIADCGQL

配列番号 2 5 : p N M D 2 4 9 2 の T - D N A 領域

配列番号 2 6 : p N M D 0 3 5 の T - D N A 領域

配列番号 2 7 : p N M D 6 6 1 の T - D N A 領域

40

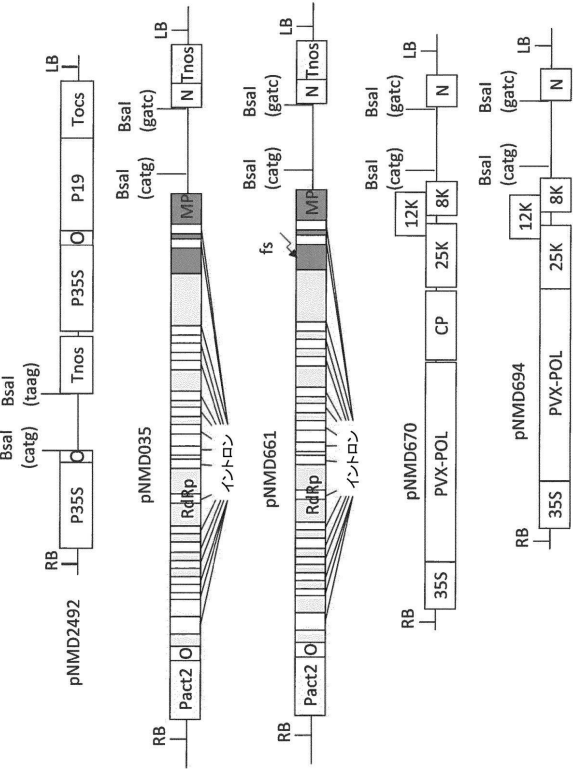
配列番号 2 8 : p N M D 6 7 0 の T - D N A 領域

配列番号 2 9 : p N M D 6 9 4 の T - D N A 領域

配列番号 3 0 : p N M D 3 4 8 6 の T - D N A 領域

配列番号 3 1 : p N M D 3 4 9 3 の T - D N A 領域

【図 1】



【図 2】

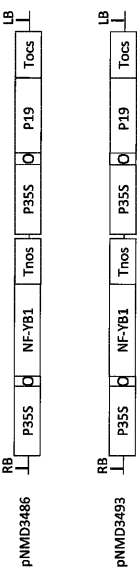
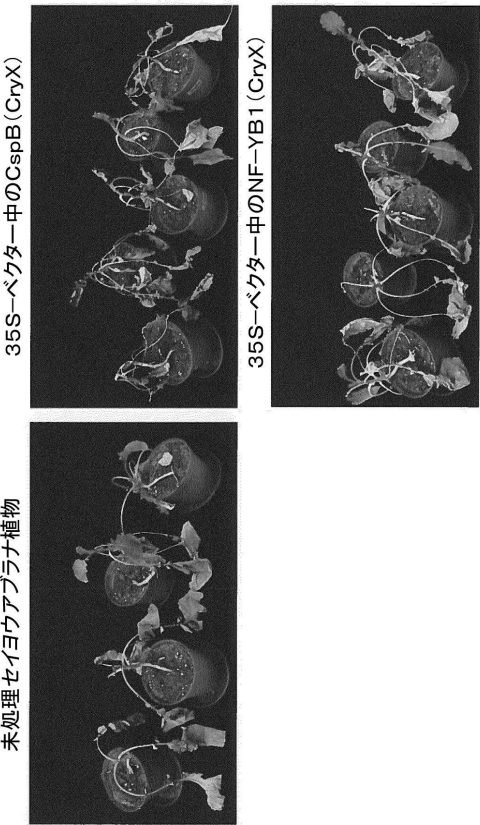
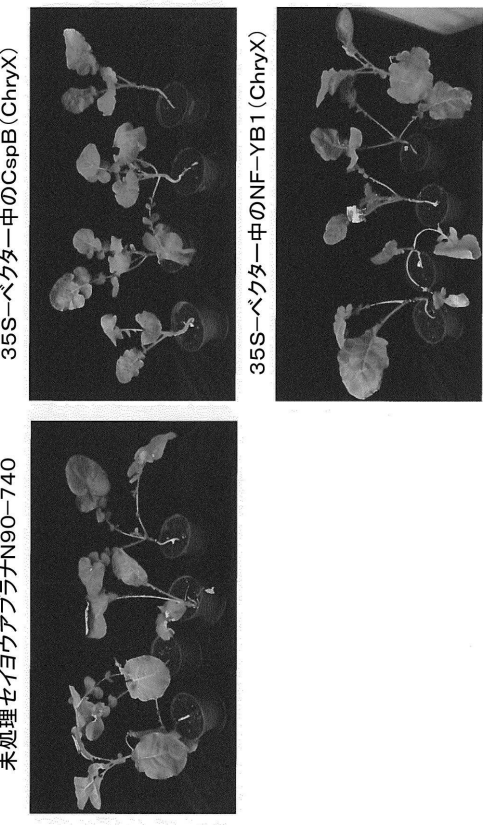


Fig. 2

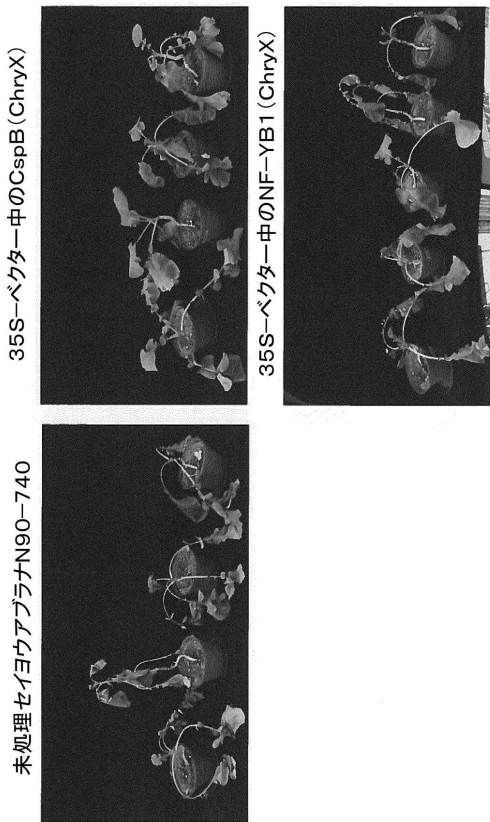
【図 3】



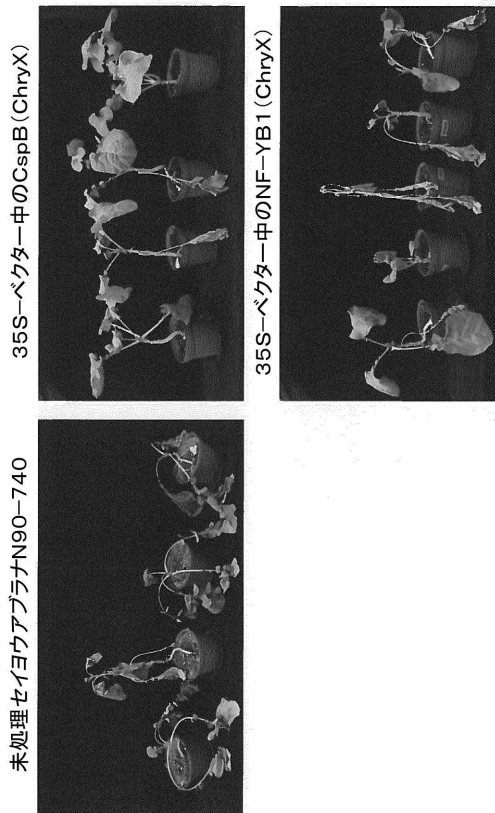
【図 4】



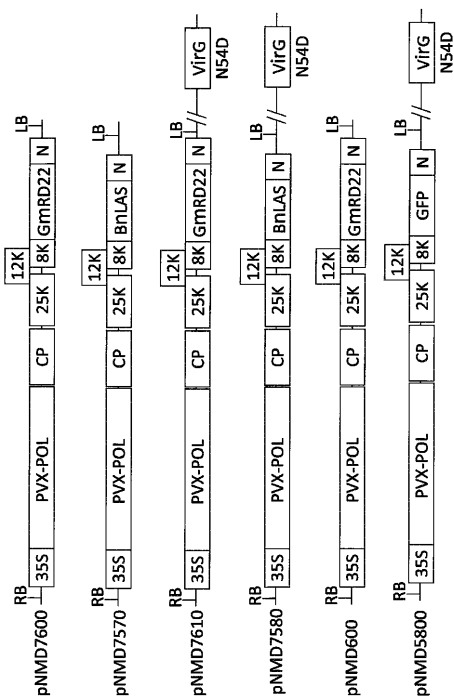
【図 5】



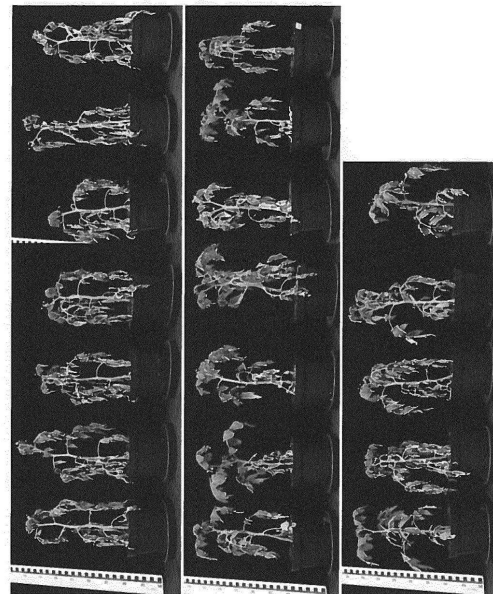
【図 6】



【図 7】



【図 8】



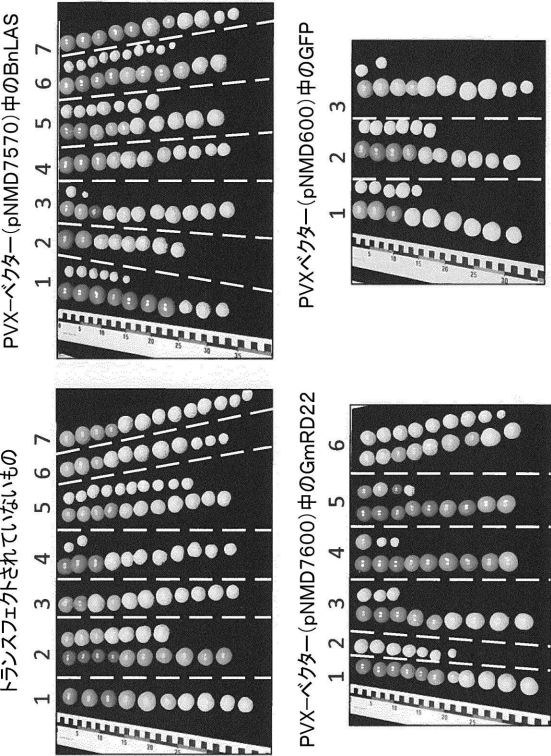
トランスフェクト  
されていないもの

PVX-ベクター  
(pNMD7570) 中の  
BnLAS

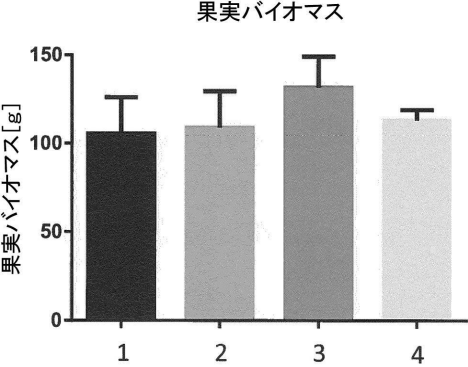
PVX-ベクター  
(pNMD7600) 中の  
GmRD22



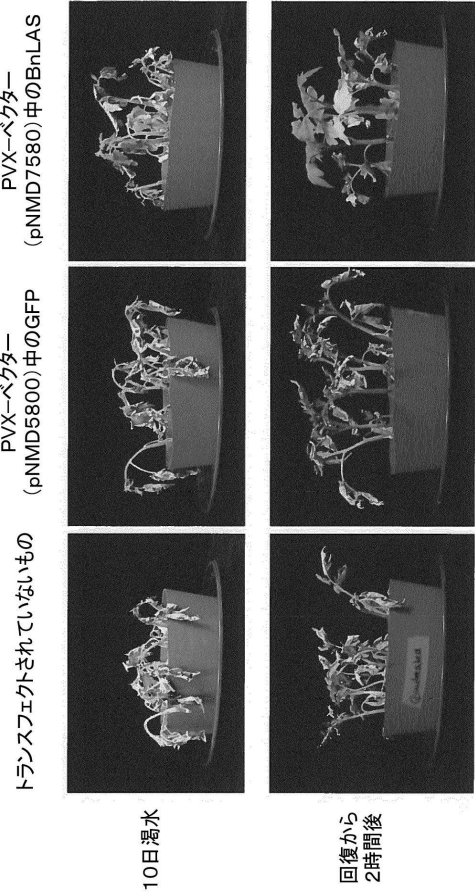
【 図 9 】



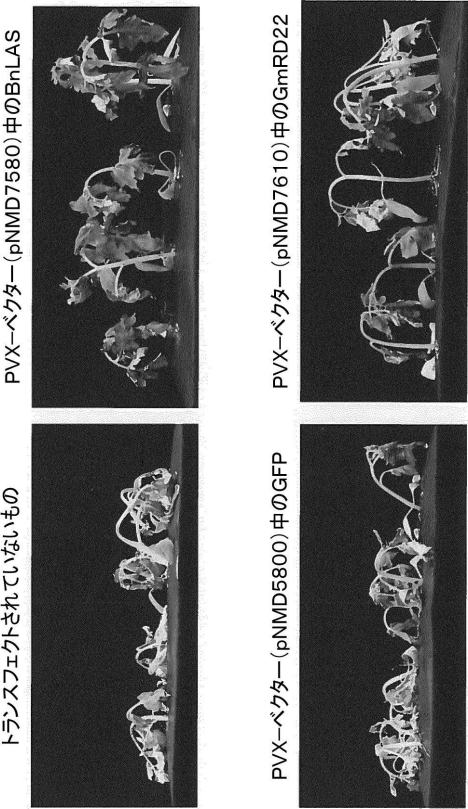
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【配列表】

0006453315000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 グリッチ、アナトリ  
ドイツ連邦共和国、ハレ(ザーレ)、ベルクシュトラーク 1
- (72)発明者 グレバ、ユリ  
ドイツ連邦共和国、ベルリン、ベーレンシュトラーク 28

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 国際公開第2012/019660(WO, A1)  
国際公開第2010/019838(WO, A2)  
国際公開第2008/043268(WO, A1)  
J. Exp. Bot., 2008年, Vol.59, No.4, p.739-751

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
PubMed  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)