

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-165295

(P2016-165295A)

(43) 公開日 平成28年9月15日(2016.9.15)

|                         |                       |             |
|-------------------------|-----------------------|-------------|
| (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   |
| A O 1 H 4/00 (2006.01)  | A O 1 H 4/00          | 4 B 0 6 4   |
| A O 1 H 5/10 (2006.01)  | A O 1 H 5/10          | 4 B 0 6 5   |
| A O 1 H 5/00 (2006.01)  | A O 1 H 5/00 A        |             |
| C 1 2 P 21/00 (2006.01) | C 1 2 P 21/00 A       |             |

審査請求 有 請求項の数 18 O L 外国語出願 (全 213 頁) 最終頁に続く

|              |                                     |          |                                                            |
|--------------|-------------------------------------|----------|------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2016-77447 (P2016-77447)          | (71) 出願人 | 501231613                                                  |
| (22) 出願日     | 平成28年4月7日 (2016.4.7)                |          | モンサント テクノロジー エルエルシー                                        |
| (62) 分割の表示   | 特願2014-501215 (P2014-501215)<br>の分割 |          | アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス<br>ノース リンドバーグ プールバード<br>800           |
| 原出願日         | 平成24年3月21日 (2012.3.21)              | (74) 代理人 | 100081422                                                  |
| (31) 優先権主張番号 | 61/467,875                          |          | 弁理士 田中 光雄                                                  |
| (32) 優先日     | 平成23年3月25日 (2011.3.25)              | (74) 代理人 | 100084146                                                  |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                             |          | 弁理士 山崎 宏                                                   |
|              |                                     | (74) 代理人 | 100122301                                                  |
|              |                                     |          | 弁理士 富田 憲史                                                  |
|              |                                     | (72) 発明者 | スタニスラフ・フラシンスキー                                             |
|              |                                     |          | アメリカ合衆国 63167 ミズーリ州 セン<br>トルイス、ノース・リンドバーグ・プール<br>バード 800 番 |
|              |                                     |          | 最終頁に続く                                                     |

(54) 【発明の名称】 植物調節要素およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】植物において、調節要素、調節要素を含むDNAコンストラクト、並びに転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結された調節要素を含むトランスジェニックな植物細胞、植物、および種子、及び商品生産物、並びにそれらの使用方法の提供。

【解決手段】a) 特定の配列に対して少なくとも85パーセントの配列同一性を有する配列；b) 前記特定の配列のいずれかを含む配列；並びにc) 遺伝子調節活性を有する、前記特定の配列のいずれかのフラグメントからなる群より選択されるDNA配列を含み、該配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されていて、植物および植物細胞における遺伝子発現を調整するのに有用な新規DNA分子およびコンストラクト（それらのヌクレオチド配列を含む）。

【選択図】 図8

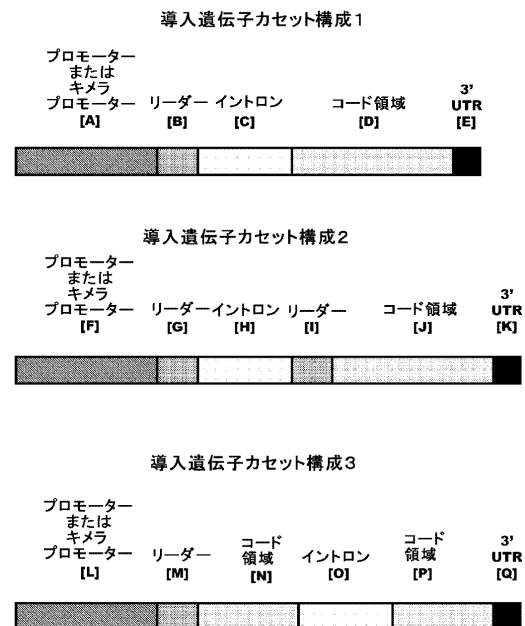


FIG. 8

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a) 配列番号1～158および180～183のいずれかに対して少なくとも85パーセントの配列同一性を有する配列；
- b) 配列番号1～158および180～183のいずれかを含む配列；ならびに
- c) 遺伝子調節活性を有する、配列番号1～158および180～183のいずれかのフラグメントからなる群より選択されるDNA配列を含み、該配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されているDNA分子。

## 【請求項 2】

該配列が配列番号1～158および180～183のいずれかのDNA配列に対して少なくとも90パーセントの配列同一性を有する、請求項1に記載のDNA分子。

10

## 【請求項 3】

該配列が配列番号1～158および180～183のいずれかのDNA配列に対して少なくとも95パーセントの配列同一性を有する、請求項1に記載のDNA分子。

## 【請求項 4】

DNA配列が遺伝子調節活性を有する、請求項1に記載のDNA分子。

## 【請求項 5】

異種転写可能ポリヌクレオチド分子が作物栽培学的関心対象の遺伝子を含む、請求項1に記載のDNA分子。

## 【請求項 6】

20

作物栽培学的関心対象の遺伝子が植物における除草剤耐性を付与する、請求項5に記載のDNA分子。

## 【請求項 7】

作物栽培学的関心対象の遺伝子が植物における病虫害耐性を付与する、請求項5に記載のDNA分子。

## 【請求項 8】

- a) 配列番号1～158および180～183のいずれかに対して少なくとも85パーセントの配列同一性を有する配列；
- b) 配列番号1～158および180～183のいずれかを含む配列；ならびに
- c) 遺伝子調節活性を有する、配列番号1～158および180～183のいずれかのフラグメントからなる群より選択される配列を含み、該配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されている異種DNA分子を含むトランスジェニック植物細胞。

30

## 【請求項 9】

単子葉植物細胞である、請求項8に記載のトランスジェニック植物細胞。

## 【請求項 10】

双子葉植物細胞である、請求項8に記載のトランスジェニック植物細胞。

## 【請求項 11】

請求項1に記載のDNA分子を含むトランスジェニック植物またはその部分。

## 【請求項 12】

該DNA分子を含む、請求項11に記載のトランスジェニック植物の子孫植物またはその部分。

40

## 【請求項 13】

請求項1に記載のDNA分子を含むトランスジェニック種子。

## 【請求項 14】

請求項11に記載のトランスジェニック植物またはその部分を取得すること、およびそこから商品生産物を生産することを含む、商品生産物を生産する方法。

## 【請求項 15】

商品生産物が、タンパク質濃縮物、タンパク質単離物、穀物、デンプン、種子、粗挽き粉、穀粉、バイオマス、または種油である、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 16】

50

請求項1に記載のDNA分子を含む商品生産物。

【請求項17】

タンパク質濃縮物、タンパク質単離物、穀物、デンプン、種子、粗挽き粉、穀粉、バイオマス、または種油である、請求項16に記載の商品生産物。

【請求項18】

転写可能ポリヌクレオチド分子を発現させる方法であって、請求項11に記載のトランスジェニック植物を取得すること、および植物を栽培することを含み、そこで転写可能ポリヌクレオチドが発現する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

〔関連出願の参照〕

本願は、2011年3月25日に出願された米国仮特許出願第61/467,875号の利益を主張し、この仮特許出願は引用によりそのまま本明細書に組み込まれる。

【0002】

〔配列表の組み込み〕

347キロバイト（Microsoft Windows（登録商標）による計測）であって2012年3月21日に作成された「MONS282W0\_seq.txt」という名称のファイルに含まれている配列表を、電子提出によって、ここに添付する。この配列表は引用により本明細書に組み込まれる。

【0003】

20

〔発明の分野〕

本発明は、植物分子生物学および植物遺伝子工学の分野に関し、植物における遺伝子発現を調整するのに有用なDNA分子に関する。

【背景技術】

【0004】

〔背景〕

調節要素は、作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の転写を調整することによって、遺伝子活性を調節する遺伝要素である。そのような要素には、プロモーター、リーダー、イントロン、および3'非翻訳領域が含まれ、これらは植物分子生物学および植物遺伝子工学の分野において有用である。

30

【発明の概要】

【0005】

〔発明の概要〕

本発明は、植物において使用するための新規遺伝子調節要素を提供する。本発明は、調節要素を含むDNAコンストラクトも提供する。本発明は、調節要素を含むトランスジェニックな植物細胞、植物、および種子も提供する。配列は、転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結された状態で提供されうる。ある実施形態において、転写可能ポリヌクレオチド分子は、ここに提供する調節配列に対して異種であることができる。したがって本発明が提供する調節要素配列は、特定の実施形態では、異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されていると定義することができる。本発明は、調節要素、調節要素を含むDNAコンストラクト、ならびに転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結された調節要素を含むトランスジェニックな植物細胞、植物、および種子を作製し、使用方法も提供する。

40

【0006】

したがって、ある態様において、本発明は、a) 配列番号1～158および180～183のいずれかに対して少なくとも約85パーセントの配列同一性を有する配列；b) 配列番号1～158および180～183のいずれかを含む配列；ならびにc) 遺伝子調節活性を有する、配列番号1～158および180～183のいずれかのフラグメントからなる群より選択されるDNA配列を含み、その配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されているDNA分子を提供する。具体的実施形態では、DNA分子が、配列番号1～158および180～183のいずれかのD

50

NA配列に対して少なくとも約90パーセント、少なくとも約95パーセント、少なくとも約98パーセント、または少なくとも約99パーセントの配列同一性を含む。DNA分子の一定の実施形態では、DNA配列が調節要素を含む。いくつかの実施形態では、調節要素がプロモーターを含む。特定の実施形態では、異種転写可能ポリヌクレオチド分子が、作物栽培学的関心対象の遺伝子、例えば植物において除草剤耐性を提供する能力を有する遺伝子、または植物において植物病虫害耐性を提供する能力を有する遺伝子を含む。

#### 【0007】

本発明は、配列番号1~158および180~183のいずれかまたはそのフラグメントもしくは変異体の配列を含み、該配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されている、本発明が提供する異種DNAコンストラクトを含む、トランスジェニック植物細胞も提供する。一定の実施形態では、トランスジェニック植物細胞が単子葉植物細胞である。別の実施形態では、トランスジェニック植物細胞が双子葉植物細胞である。

#### 【0008】

さらに、a) 配列番号1~158および180~183のいずれかに対して少なくとも85パーセントの配列同一性を有する配列；b) 配列番号1~158および180~183のいずれかを含む配列；ならびにc) 遺伝子調節活性を有する、配列番号1~158および180~183のいずれかのフラグメント；からなる群より選択されるDNA配列を含み、その配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されている、ここに提供されるDNA分子を含むトランスジェニック植物またはその部分も、本発明によって提供される。具体的実施形態において、トランスジェニック植物は、前記DNA分子を含む出発トランスジェニック植物との比較で、前記DNA分子を含む任意の世代の子孫植物であることができる。さらに、本発明のDNA分子を含むトランスジェニック種子も提供される。

#### 【0009】

さらにもう一つの態様において、本発明は、商品生産物を生産する方法であって、本発明のトランスジェニック植物またはその部分を取得すること、およびそこから商品生産物を生産することを含む方法を提供する。ある実施形態において、本発明の商品生産物は、タンパク質濃縮物、タンパク質単離物、穀物、デンプン、種子、粗挽き粉、穀粉、バイオマス、または種油である。もう一つの態様において、本発明は上記の方法を使って生産された商品を提供する。例えば、ある実施形態において本発明は、a) 配列番号1~158および180~183のいずれかに対して少なくとも85パーセントの配列同一性を有する配列；b) 配列番号1~158および180~183のいずれかを含む配列；ならびにc) 遺伝子調節活性を有する、配列番号1~158および180~183のいずれかのフラグメント；からなる群より選択されるDNA配列を含み、その配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されている、ここに提供されるDNA分子を含む商品生産物を提供する。

#### 【0010】

さらにもう一つの態様において、本発明は、転写可能ポリヌクレオチド分子を発現させる方法であって、本発明のトランスジェニック植物、例えば本明細書に記載するDNA分子を含む植物を取得すること、および植物を栽培することを含み、そこでDNA分子中の転写可能ポリヌクレオチドが発現する方法を提供する。

#### 【0011】

本明細書および特許請求の範囲の全体を通して、文脈上別段の必要がある場合を除き、「含む (comprise)」という単語とその変形、例えば「comprises」および「comprising」は、明記した組成、ステップ、および/もしくは値、またはその群の包含を含意するが、他の任意の組成、ステップ、および/もしくは値、またはその群の除外を含意するわけではないと理解されるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1a】図1a~hは、イネ科植物種 *Andropogon gerardii* から単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図1a~hは、転写調節発現要素群 EXP-ANDge.Ubq1:1:9 (配列番号1) 中に見いだされる2603

10

20

30

40

50

bpプロモーター配列P-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）と、P-ANDge.Ubq1-1:1:11の欠失分析によって派生したプロモーター配列とのアラインメントを示している。欠失（例えばP-ANDge.Ubq1-1:1:11の5'端の欠失）は、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）内に見いだされる2114bp配列であるプロモーターP-ANDge.Ubq1-1:1:9（配列番号6）をもたらした。図1に記載の他のプロモーター配列には、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）内に含まれる1644bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:10（配列番号9）；EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）内に含まれる1472bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:12（配列番号11）；EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）内に含まれる1114bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:8（配列番号13）；EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）内に含まれる771bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:13（配列番号15）；およびEXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）内に含まれる482bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:14（配列番号17）が含まれる。

【図1b】図1a～hは、イネ科植物種Andropogon gerardiiから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図1a～hは、転写調節発現要素群EXP-ANDge.Ubq1:1:9（配列番号1）中に見いだされる2603bpプロモーター配列P-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）と、P-ANDge.Ubq1-1:1:11の欠失分析によって派生したプロモーター配列とのアラインメントを示している。欠失（例えばP-ANDge.Ubq1-1:1:11の5'端の欠失）は、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）内に見いだされる2114bp配列であるプロモーターP-ANDge.Ubq1-1:1:9（配列番号6）をもたらした。図1に記載の他のプロモーター配列には、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）内に含まれる1644bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:10（配列番号9）；EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）内に含まれる1472bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:12（配列番号11）；EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）内に含まれる1114bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:8（配列番号13）；EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）内に含まれる771bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:13（配列番号15）；およびEXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）内に含まれる482bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:14（配列番号17）が含まれる。

【図1c】図1a～hは、イネ科植物種Andropogon gerardiiから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図1a～hは、転写調節発現要素群EXP-ANDge.Ubq1:1:9（配列番号1）中に見いだされる2603bpプロモーター配列P-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）と、P-ANDge.Ubq1-1:1:11の欠失分析によって派生したプロモーター配列とのアラインメントを示している。欠失（例えばP-ANDge.Ubq1-1:1:11の5'端の欠失）は、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）内に見いだされる2114bp配列であるプロモーターP-ANDge.Ubq1-1:1:9（配列番号6）をもたらした。図1に記載の他のプロモーター配列には、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）内に含まれる1644bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:10（配列番号9）；EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）内に含まれる1472bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:12（配列番号11）；EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）内に含まれる1114bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:8（配列番号13）；EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）内に含まれる771bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:13（配列番号15）；およびEXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）内に含まれる482bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:14（配列番号17）が含まれる。

【図1d】図1a～hは、イネ科植物種Andropogon gerardiiから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図1a～hは、転写調節発現要素群EXP-ANDge.Ubq1:1:9（配列番号1）中に見いだされる2603bpプロモーター配列P-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）と、P-ANDge.Ubq1-1:1:11の欠失分析によって派生したプロモーター配列とのアラインメントを示している。欠失（例えばP-ANDge.Ubq1-1:1:11の5'端の欠失）は、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）内に見いだされる2114bp配列であるプロモーターP-ANDge.Ubq1-1:1:9（配列番号6）をもたらした。図1に記載の他のプロモーター配列には、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）内に含まれる1644bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:10（配列番号9）；EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）内に含まれる1472bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:12（配列番号11）；EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）内に含まれる1114bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:8（配列番号13）；EXP

-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号14）内に含まれる771bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:13（配列番号15）；およびEXP-ANDge.Ubq1-1:1:12（配列番号16）内に含まれる482bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:14（配列番号17）が含まれる。

【図1 e】図1a～hは、イネ科植物種Andropogon gerardiiから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図1a～hは、転写調節発現要素群EXP-ANDge.Ubq1:1:9（配列番号1）中に見いだされる2603bpプロモーター配列P-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）と、P-ANDge.Ubq1-1:1:11の欠失分析によって派生したプロモーター配列とのアラインメントを示している。欠失（例えばP-ANDge.Ubq1-1:1:11の5'端の欠失）は、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）内に見いだされる2114bp配列であるプロモーターP-ANDge.Ubq1-1:1:9（配列番号6）をもたらしした。図1に記載の他のプロモーター配列には、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）内に含まれる1644bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:10（配列番号9）；EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）内に含まれる1472bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:12（配列番号11）；EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）内に含まれる1114bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:8（配列番号13）；EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）内に含まれる771bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:13（配列番号15）；およびEXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）内に含まれる482bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:14（配列番号17）が含まれる。

10

【図1 f】図1a～hは、イネ科植物種Andropogon gerardiiから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図1a～hは、転写調節発現要素群EXP-ANDge.Ubq1:1:9（配列番号1）中に見いだされる2603bpプロモーター配列P-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）と、P-ANDge.Ubq1-1:1:11の欠失分析によって派生したプロモーター配列とのアラインメントを示している。欠失（例えばP-ANDge.Ubq1-1:1:11の5'端の欠失）は、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）内に見いだされる2114bp配列であるプロモーターP-ANDge.Ubq1-1:1:9（配列番号6）をもたらしした。図1に記載の他のプロモーター配列には、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）内に含まれる1644bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:10（配列番号9）；EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）内に含まれる1472bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:12（配列番号11）；EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）内に含まれる1114bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:8（配列番号13）；EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）内に含まれる771bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:13（配列番号15）；およびEXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）内に含まれる482bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:14（配列番号17）が含まれる。

20

30

【図1 g】図1a～hは、イネ科植物種Andropogon gerardiiから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図1a～hは、転写調節発現要素群EXP-ANDge.Ubq1:1:9（配列番号1）中に見いだされる2603bpプロモーター配列P-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）と、P-ANDge.Ubq1-1:1:11の欠失分析によって派生したプロモーター配列とのアラインメントを示している。欠失（例えばP-ANDge.Ubq1-1:1:11の5'端の欠失）は、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）内に見いだされる2114bp配列であるプロモーターP-ANDge.Ubq1-1:1:9（配列番号6）をもたらしした。図1に記載の他のプロモーター配列には、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）内に含まれる1644bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:10（配列番号9）；EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）内に含まれる1472bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:12（配列番号11）；EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）内に含まれる1114bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:8（配列番号13）；EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）内に含まれる771bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:13（配列番号15）；およびEXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）内に含まれる482bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:14（配列番号17）が含まれる。

40

【図1 h】図1a～hは、イネ科植物種Andropogon gerardiiから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図1a～hは、転写調節発現要素群EXP-ANDge.Ubq1:1:9（配列番号1）中に見いだされる2603bpプロモーター配列P-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）と、P-ANDge.Ubq1-1:1:11の欠失分析によって派生したプロモーター配列とのアラインメントを示している。欠失（例えば

50

P-ANDge.Ubq1-1:1:11の5'端の欠失)は、EXP-ANDge.Ubq1:1:7(配列番号5)内に見いだされる2114bp配列であるプロモーターP-ANDge.Ubq1-1:1:9(配列番号6)をもたらしした。図1に記載の他のプロモーター配列には、EXP-ANDge.Ubq1:1:8(配列番号8)内に含まれる1644bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:10(配列番号9)；EXP-ANDge.Ubq1:1:10(配列番号10)内に含まれる1472bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:12(配列番号11)；EXP-ANDge.Ubq1:1:6(配列番号12)内に含まれる1114bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:8(配列番号13)；EXP-ANDge.Ubq1:1:11(配列番号14)内に含まれる771bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:13(配列番号15)；およびEXP-ANDge.Ubq1:1:12(配列番号16)内に含まれる482bp配列であるP-ANDge.Ubq1-1:1:14(配列番号17)が含まれる。

【図2a】図2a～2gは、イネ科植物*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)から単離されたプロモーター変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図2a～2gは、2536bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:10(配列番号19)(例えば転写調節発現要素群EXP-ERIRA.Ubq1(配列番号18)内に見いだされる)と、P-ERIRA.Ubq1-1:1:10の欠失解析から派生したプロモーター配列、すなわち2014bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:9(配列番号23)；1525bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:11(配列番号26)；1044bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:8(配列番号28)；796bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:12(配列番号30)；および511bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:13(配列番号32)とのアラインメントを示している。

【図2b】図2a～2gは、イネ科植物*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)から単離されたプロモーター変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図2a～2gは、2536bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:10(配列番号19)(例えば転写調節発現要素群EXP-ERIRA.Ubq1(配列番号18)内に見いだされる)と、P-ERIRA.Ubq1-1:1:10の欠失解析から派生したプロモーター配列、すなわち2014bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:9(配列番号23)；1525bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:11(配列番号26)；1044bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:8(配列番号28)；796bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:12(配列番号30)；および511bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:13(配列番号32)とのアラインメントを示している。

【図2c】図2a～2gは、イネ科植物*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)から単離されたプロモーター変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図2a～2gは、2536bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:10(配列番号19)(例えば転写調節発現要素群EXP-ERIRA.Ubq1(配列番号18)内に見いだされる)と、P-ERIRA.Ubq1-1:1:10の欠失解析から派生したプロモーター配列、すなわち2014bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:9(配列番号23)；1525bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:11(配列番号26)；1044bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:8(配列番号28)；796bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:12(配列番号30)；および511bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:13(配列番号32)とのアラインメントを示している。

【図2d】図2a～2gは、イネ科植物*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)から単離されたプロモーター変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図2a～2gは、2536bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:10(配列番号19)(例えば転写調節発現要素群EXP-ERIRA.Ubq1(配列番号18)内に見いだされる)と、P-ERIRA.Ubq1-1:1:10の欠失解析から派生したプロモーター配列、すなわち2014bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:9(配列番号23)；1525bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:11(配列番号26)；1044bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:8(配列番号28)；796bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:12(配列番号30)；および511bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:13(配列番号32)とのアラインメントを示している。

【図2e】図2a～2gは、イネ科植物*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)から単離されたプロモーター変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図2a～2gは、2536bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:10(配列番号19)(例えば転写調節発現要素群EXP-ERIRA.Ubq1(配列番号18)内に見いだされる)と、P-ERIRA.Ubq1-1:1:10の欠失解析から派生したプロモーター配列、すなわち2014bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:9

10

20

30

40

50

(配列番号23) ; 1525bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:11 (配列番号26) ; 1044bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:8 (配列番号28) ; 796bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:12 (配列番号30) ; および511bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:13 (配列番号32) とのアラインメントを示している。

【図2f】図2a~2gは、イネ科植物Saccharum ravennae (Erianthus ravennae) から単離されたプロモーター変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図2a~2gは、2536bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:10 (配列番号19) (例えば転写調節発現要素群EXP-ERIRA.Ubq1 (配列番号18) 内に見いだされる) と、P-ERIRA.Ubq1-1:1:10の欠失解析から派生したプロモーター配列、すなわち2014bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:9 (配列番号23) ; 1525bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:11 (配列番号26) ; 1044bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:8 (配列番号28) ; 796bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:12 (配列番号30) ; および511bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:13 (配列番号32) とのアラインメントを示している。

10

【図2g】図2a~2gは、イネ科植物Saccharum ravennae (Erianthus ravennae) から単離されたプロモーター変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図2a~2gは、2536bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:10 (配列番号19) (例えば転写調節発現要素群EXP-ERIRA.Ubq1 (配列番号18) 内に見いだされる) と、P-ERIRA.Ubq1-1:1:10の欠失解析から派生したプロモーター配列、すなわち2014bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:9 (配列番号23) ; 1525bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:11 (配列番号26) ; 1044bpプロモーター配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:8 (配列番号28) ; 796bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:12 (配列番号30) ; および511bp配列P-ERIRA.Ubq1-1:1:13 (配列番号32) とのアラインメントを示している。

20

【図3a】図3a~3cは、イネ科植物種Setaria viridisから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図3a~3cは、1493bpプロモーター配列P-Sv.Ubq1-1:1:1 (配列番号34) と、P-Sv.Ubq1-1:1:1の5'端の欠失解析から派生したプロモーター、すなわち1035bpサイズのプロモーターP-Sv.Ubq1-1:1:2 (配列番号38) ; および681bpプロモーター配列P-Sv.Ubq1-1:1:3 (配列番号40) とのアラインメントを示している。

【図3b】図3a~3cは、イネ科植物種Setaria viridisから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図3a~3cは、1493bpプロモーター配列P-Sv.Ubq1-1:1:1 (配列番号34) と、P-Sv.Ubq1-1:1:1の5'端の欠失解析から派生したプロモーター、すなわち1035bpサイズのプロモーターP-Sv.Ubq1-1:1:2 (配列番号38) ; および681bpプロモーター配列P-Sv.Ubq1-1:1:3 (配列番号40) とのアラインメントを示している。

30

【図3c】図3a~3cは、イネ科植物種Setaria viridisから単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図3a~3cは、1493bpプロモーター配列P-Sv.Ubq1-1:1:1 (配列番号34) と、P-Sv.Ubq1-1:1:1の5'端の欠失解析から派生したプロモーター、すなわち1035bpサイズのプロモーターP-Sv.Ubq1-1:1:2 (配列番号38) ; および681bpプロモーター配列P-Sv.Ubq1-1:1:3 (配列番号40) とのアラインメントを示している。

40

【図4a】図4a~4eは、イネ科植物Zea mays subsp. mexicanaに由来する転写調節発現要素群変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図4a~4eは、EXP-Zm.UbqM1:1:2 (配列番号49) と呼ばれる2005bp転写調節発現要素群を、アレル変異体EXP-Zm.UbqM1:1:5 (配列番号53)、ならびに長さが1922bpであるサイズ変異体EXP-Zm.UbqM1:1:1 (配列番号41) および長さが1971bpであるEXP-Zm.UbqM1:1:4 (配列番号45) と比較している。

【図4b】図4a~4eは、イネ科植物Zea mays subsp. mexicanaに由来する転写調節発現要素群変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図4a~4eは、EXP-Zm.UbqM1:1:2 (配列番号49) と呼ばれる2005bp転写調節発現要素群を、アレル変異体EXP-Zm.UbqM1:1:5 (配列番号53)、ならびに長さが1922bpであるサイズ変異体EXP-Zm.UbqM1:1:1 (配列番号41) および長さが1971bpであるEXP-Zm.UbqM1:1:4 (配列番号45) と比較している。

50

【図 4 c】図4a～4eは、イネ科植物 *Zea mays* subsp. *mexicana* に由来する転写調節発現要素群変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図4a～4eは、EXP-Zm.UbqM1:1:2（配列番号49）と呼ばれる2005bp転写調節発現要素群を、アレル変異体EXP-Zm.UbqM1:1:5（配列番号53）、ならびに長さが1922bpであるサイズ変異体EXP-Zm.UbqM1:1:1（配列番号41）および長さが1971bpであるEXP-Zm.UbqM1:1:4（配列番号45）と比較している。

【図 4 d】図4a～4eは、イネ科植物 *Zea mays* subsp. *mexicana* に由来する転写調節発現要素群変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図4a～4eは、EXP-Zm.UbqM1:1:2（配列番号49）と呼ばれる2005bp転写調節発現要素群を、アレル変異体EXP-Zm.UbqM1:1:5（配列番号53）、ならびに長さが1922bpであるサイズ変異体EXP-Zm.UbqM1:1:1（配列番号41）および長さが1971bpであるEXP-Zm.UbqM1:1:4（配列番号45）と比較している。

【図 4 e】図4a～4eは、イネ科植物 *Zea mays* subsp. *mexicana* に由来する転写調節発現要素群変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図4a～4eは、EXP-Zm.UbqM1:1:2（配列番号49）と呼ばれる2005bp転写調節発現要素群を、アレル変異体EXP-Zm.UbqM1:1:5（配列番号53）、ならびに長さが1922bpであるサイズ変異体EXP-Zm.UbqM1:1:1（配列番号41）および長さが1971bpであるEXP-Zm.UbqM1:1:4（配列番号45）と比較している。

【図 5 a】図5a～5bは、イネ科植物 *Sorghum bicolor* から単離されたプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図5a～5bは、転写調節発現要素群EXP-Sb.Ubq6（配列番号59）内に含まれている791bpサイズのプロモーター要素P-Sb.Ubq6-1:1:2（配列番号60）と、EXP-Sb.Ubq6:1:1（配列番号63）内に含まれている855bpプロモーター要素P-Sb.Ubq6-1:1:1（配列番号64）とのアラインメントを示している。

【図 5 b】図5a～5bは、イネ科植物 *Sorghum bicolor* から単離されたプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図5a～5bは、転写調節発現要素群EXP-Sb.Ubq6（配列番号59）内に含まれている791bpサイズのプロモーター要素P-Sb.Ubq6-1:1:2（配列番号60）と、EXP-Sb.Ubq6:1:1（配列番号63）内に含まれている855bpプロモーター要素P-Sb.Ubq6-1:1:1（配列番号64）とのアラインメントを示している。

【図 6 a】図6a～6cは、イネ科植物 *Setaria italica* から単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図6a～6cは、1492bpプロモーター変異体P-SETit.Ubq1-1:1:1（配列番号70）と、1492bpプロモーター変異体P-SETit.Ubq1-1:1:4（配列番号74）、1034bpプロモーター要素P-SETit.Ubq1-1:1:2（配列番号76）、および680bpプロモーター要素P-SETit.Ubq1-1:1:3（配列番号78）とのアラインメントを示している。

【図 6 b】図6a～6cは、イネ科植物 *Setaria italica* から単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図6a～6cは、1492bpプロモーター変異体P-SETit.Ubq1-1:1:1（配列番号70）と、1492bpプロモーター変異体P-SETit.Ubq1-1:1:4（配列番号74）、1034bpプロモーター要素P-SETit.Ubq1-1:1:2（配列番号76）、および680bpプロモーター要素P-SETit.Ubq1-1:1:3（配列番号78）とのアラインメントを示している。

【図 6 c】図6a～6cは、イネ科植物 *Setaria italica* から単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体のアラインメントを図示している。具体的には、図6a～6cは、1492bpプロモーター変異体P-SETit.Ubq1-1:1:1（配列番号70）と、1492bpプロモーター変異体P-SETit.Ubq1-1:1:4（配列番号74）、1034bpプロモーター要素P-SETit.Ubq1-1:1:2（配列番号76）、および680bpプロモーター要素P-SETit.Ubq1-1:1:3（配列番号78）とのアラインメントを示している。

【図 7 a】図7a～7bは、イネ科植物種 *Coix lachryma-jobi* から単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体およびエンハンサー要素のアラインメントを図示している。具体的には、図7aおよび7bは、転写調節発現要素群EXP-Cl.Ubq1:1:1（配列番号79）内に見いだされる837bpプロモーター変異体P-Cl.Ubq1-1:1:1（配列番号80）と、P-Cl.Ubq1-1:1:1に由来するE-Cl.Ubq1:1:1（配列番号89）と呼ばれる長さ798bpのエンハンサーフラグメント、ならびにP-Cl.Ubq1-1:1:1の3つの5'端欠失変異体、すなわち742bp要素P-Cl.Ubq1-1:1:4（配列番号84）、401bp要素P-Cl.Ubq1-1:1:3（配列番号86）および54b

10

20

30

40

50

p最小プロモーター要素P-Cl.Ubq1-1:1:5（配列番号88）とのアラインメントを示している。

【図7b】図7a～7bは、イネ科植物種*Coix lachryma-jobi*から単離されたプロモーター要素に対応するプロモーターサイズ変異体およびエンハンサー要素のアラインメントを図示している。具体的には、図7aおよび7bは、転写調節発現要素群EXP-Cl.Ubq1:1:1（配列番号79）内に見いだされる837bpプロモーター変異体P-Cl.Ubq1-1:1:1（配列番号80）と、P-Cl.Ubq1-1:1:1に由来するE-Cl.Ubq1:1:1（配列番号89）と呼ばれる長さ798bpのエンハンサーフラグメント、ならびにP-Cl.Ubq1-1:1:1の3つの5'端欠失変異体、すなわち742bp要素P-Cl.Ubq1-1:1:4（配列番号84）、401bp要素P-Cl.Ubq1-1:1:3（配列番号86）および54bp最小プロモーター要素P-Cl.Ubq1-1:1:5（配列番号88）とのアラインメントを示している。

10

【図8】図8は、本発明の導入遺伝子カセットの構成を図示している。

【発明を実施するための形態】

【0013】

[配列の簡単な説明]

配列番号1、5、8、10、12、14、16、18、22、25、27、29、31、33、37、39、41、45、49、53、55、59、63、65、69、73、75、77、79、83、85、87、90、93、95、97、98、99、100、102、104、106、108、110、112、114、115、116、117、119、121、123、124、125、126、128、130、132、133、134、136、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、180、181および183は、イントロン配列の5'側に作動的に連結されたリーダー配列の5'側に作動的に連結されたプロモーター配列を含む転写調節発現要素群の配列またはEXP配列である。

20

【0014】

配列番号2、6、9、11、13、15、17、19、23、26、28、30、32、34、38、40、42、46、50、56、60、64、66、70、74、76、78、80、84、86、88、91、96および135は、プロモーター配列である。

【0015】

配列番号3、20、35、43、47、51、57、61、67、71および81は、リーダー配列である。

【0016】

配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182は、イントロン配列である。

30

【0017】

配列番号89は、エンハンサーの配列である。

【0018】

[発明の詳細な説明]

本明細書に開示する発明は、植物種由来の有益な遺伝子調節活性を有するポリヌクレオチド分子を提供する。これらのポリヌクレオチド分子の設計、構築および使用が、本発明によって提供される。これらのポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列は、配列番号1～158および180～183の中に記載されている。これらのポリヌクレオチド分子は、例えば、植物組織において、作動的に連結されている転写可能ポリヌクレオチド分子の発現に影響を及ぼす能力を有し、それゆえに、トランスジェニック植物において、遺伝子発現またはコードされている遺伝子産物の活性を選択的に調節する能力を有する。本発明は、それらを修飾し、作製し、使用方法も提供する。本発明は、プロモーターおよび/または他の開示されたヌクレオチド配列を含有する組成物、形質転換宿主細胞、トランスジェニック植物、および種子、ならびにそれらを調製し使用するための方法も提供する。

40

【0019】

本発明をより明確に説明し、本発明を実施する当業者に指針を与えるために、以下に定義および方法を記載する。別段の注記がある場合を除き、用語は関連分野の当業者による従来の用法に従って理解されるものとする。

50

## 【0020】

DNA分子

本明細書において使用する用語「DNA」または「DNA分子」は、5'（上流）端から3'（下流）端に向かって読まれる、ゲノム起源または合成起源の二本鎖DNA分子、すなわちデオキシリボヌクレオチド塩基のポリマーまたはポリヌクレオチド分子を指す。本明細書において使用する用語「DNA配列」は、DNA分子のヌクレオチド配列を指す。本明細書において使用する命名法は、米国特許規則 § 1.822によるものおよび標準ST.25（1998）付属書2、表1および表3に記載されているものに対応する。

## 【0021】

本明細書において使用する用語「単離されたDNA分子」は、その天然状態または自然状態において通常それに付随している他の分子から少なくとも部分的に分離されているDNA分子を指す。ある実施形態において、「単離された」という用語は、天然状態または自然状態においてそのDNA分子に通常隣接している核酸の一部から少なくとも部分的に分離されているDNA分子を指す。したがって、通常はそれらに付随しない調節配列またはコード配列に、例えば組換え技法の結果として融合されたDNA分子は、本明細書においては単離されているとみなされる。そのような分子が、宿主細胞の染色体に組み込まれているか、他のDNA分子と共に核酸溶液中に存在する場合には、それらがその天然状態にはないことから、単離されているとみなされる。

## 【0022】

本発明において開示されるDNA分子またはそのフラグメントを単離し操作するには、当業者によく知られているいくつかの方法を使用することができる。例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）技術を使って、特定の出発DNA分子を増幅し、かつ/または元の分子の変異体を作製することができる。DNA分子、またはそのフラグメントは、例えば一般に自動オリゴヌクレオチド合成装置を使って実施されているように、化学的手段によってフラグメントを直接合成するなど、他の技法によって取得することもできる。

## 【0023】

本明細書において使用する用語「配列同一性」は、最適にアラインメントされた2つのポリヌクレオチド配列または最適にアラインメントされた2つのポリペプチド配列が同一である程度を指す。最適配列アラインメントは、2つの配列、例えば参照配列ともう一つの配列とを、適当な内部ヌクレオチドの挿入、欠失またはギャップを使って配列アラインメントにおけるヌクレオチドマッチの数が最大になるように手作業でアラインメントすることによって作成される。本明細書において使用する用語「参照配列」は、配列番号1～158および180～183のポリヌクレオチド配列として提供される配列を指す。

## 【0024】

本明細書において使用する用語「パーセント配列同一性」または「パーセント同一性」または「%同一性」は、同一性分率×100である。参照配列と最適にアラインメントされた配列に関する「同一性分率」は、最適アラインメント中のヌクレオチドマッチの数を、参照配列中のヌクレオチドの総数（例えば参照配列全体の全長中のヌクレオチドの総数）で割ったものである。したがって、本発明の一実施形態は、ここに配列番号1～158および180～183として提供される参照配列と最適にアラインメントした場合に、参照配列に対して少なくとも約85パーセントの同一性、少なくとも約90パーセントの同一性、少なくとも約95パーセントの同一性、少なくとも約96パーセントの同一性、少なくとも約97パーセントの同一性、少なくとも約98パーセントの同一性、または少なくとも約99パーセントの同一性を有する配列を含むDNA分子である。特定の実施形態では、そのような配列を、遺伝子調節活性を有すると定義することができる。

## 【0025】

調節要素

調節要素は、遺伝子調節活性を有するDNA分子、すなわち作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の転写および/または翻訳に影響を及ぼす能力を有するものである。したがって「遺伝子調節活性」という用語は、作動的に連結された転写可能ポリヌクレ

オチド分子の転写および/または翻訳に影響を及ぼすことによって、その作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の発現パターンに影響を及ぼす能力を指す。本明細書にいう転写調節発現要素群または「EXP」配列は、作動的に連結された、エンハンサー、プロモーター、リーダーおよびイントロンなどの発現要素から構成されうる。したがって転写調節発現要素群は、例えばリーダー配列の5'側に作動的に連結されたプロモーターであって、そのリーダー配列がさらにイントロン配列の5'側に作動的に連結されているものから構成されうる。イントロン配列は、天然配列の第1イントロン/エクソンスプライスジャンクションから始まる配列から構成され、さらに、転写と、結果として生じる転写産物の適正なプロセッシングとが容易になるように、適正なイントロン/エクソンプロセッシングに備えて、第2イントロン/エクソンスプライスジャンクションを含む小さなリーダーフラグメントから構成されうる。リーダーおよびイントロンは、作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の転写ならびに結果として生じる転写されたRNAの翻訳に、正の影響を及ぼしうる。プレプロセッシングされたRNA分子はリーダーとイントロンを含み、これらは、転写されたRNAの転写後プロセッシングおよび/または転写されたRNA分子の細胞核から細胞質への搬出に影響を及ぼしうる。転写されたRNA分子の転写後プロセッシングに続いて、リーダー配列は最終的なメッセンジャーRNAの一部として保持されて、メッセンジャーRNA分子の翻訳に正の影響を及ぼしうる。

#### 【0026】

プロモーター、リーダー、イントロン、および転写終結領域（または3'UTR）などの調節要素は、遺伝子調節活性を有し、生細胞における遺伝子の総合的発現に欠くことのできない役割を果たす、DNA分子である。「調節要素」という用語は、遺伝子調節活性を有するDNA分子、すなわち作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の転写および/または翻訳に影響を及ぼす能力を有するものを指す。それゆえに、植物において機能する単離された調節要素、例えばプロモーターおよびリーダーは、遺伝子工学の方法によって植物の表現型を修飾するのに有用である。

#### 【0027】

調節要素は、それらの発現パターン効果（定性的および/または定量的）、例えば正または負の効果、および/または構成的効果もしくは他の効果、例えばそれらの時間的、空間的、発生段階的、組織的、環境的、生理学的、病理学的、細胞周期的、および/または化学応答性発現パターン、およびそれらの任意の組み合わせ、ならびに定量的または定性的指標によって特徴づけることができる。プロモーターは、作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の発現を調整するための調節要素として有用である。

#### 【0028】

本明細書にいう「遺伝子発現パターン」は、作動的に連結されたDNA分子の、転写されたRNA分子への転写の任意のパターンである。転写されたRNA分子は翻訳されてタンパク質分子を生産するか、アンチセンスRNA分子または他の調節RNA分子、例えばdsRNA、tRNA、rRNA、miRNAなどを与えうる。

#### 【0029】

本明細書において使用する用語「タンパク質発現」は、転写されたRNA分子の、タンパク質分子への翻訳の任意のパターンである。タンパク質発現は、その時間的、空間的、発生段階的、または形態学的な特性、ならびに定量的または定性的指標によって特徴づけることができる。

#### 【0030】

本明細書において使用する用語「プロモーター」は、転写を開始するためのRNAポリメラーゼIIおよび他のタンパク質（トランス作用性転写因子）の認識および結合に関与するDNA分子を広く指す。プロモーターは、まず最初に、ある遺伝子のゲノムコピーの5'非翻訳領域（5'UTR）から単離されうる。あるいは、プロモーターは合成的に作製されたDNA分子または操作されたDNA分子であることもできる。プロモーターはキメラ型、すなわち2つ以上の異種DNA分子の融合によって作製されたプロモーターであってもよい。本発明の実施に際して有用なプロモーターには、配列番号2、6、9、11、13、15、17、19、23、26、2

10

20

30

40

50

8、30、32、34、38、40、42、46、50、56、60、64、66、70、74、76、78、80、84、86、88、91、96および135、またはそのフラグメントもしくは変異体が含まれる。本発明の具体的実施形態では、本明細書に記載するそのような分子およびその任意の変異体または誘導体は、さらに、プロモーター活性を含むと定義される。すなわち、それらは宿主細胞において、例えばトランスジェニック植物において、プロモーターとして作用する能力を有する。さらなる具体的実施形態において、フラグメントは、それが由来する出発プロモーター分子が有するプロモーター活性を示すと定義されうるか、またはフラグメントは基礎レベルの転写を与え、転写を開始するためにRNAポリメラーゼII複合体を認識および結合するためのTATAボックスまたは等価な配列から構成される、「最小プロモーター」を含みうる。

10

#### 【0031】

ある実施形態では、本明細書に開示するプロモーター配列のフラグメントが提供される。プロモーターフラグメントは上述のようにプロモーター活性を含むか、単独で、または他のプロモーターおよびプロモーターフラグメントとの組合せで、例えばキメラプロモーターの構築などにおいて有用でありうる。具体的実施形態では、本明細書に開示するプロモーター活性を有するポリヌクレオチド分子の少なくとも約50、95、150、250、500、750、または少なくとも約1000個の連続ヌクレオチドを含む、またはそれ以上の長さの、プロモーターのフラグメントが提供される。

#### 【0032】

例えば発現を改善または変化させるために、当技術分野において知られている方法を使って、配列番号2、6、9、11、13、15、17、19、23、26、28、30、32、34、38、40、42、46、50、56、60、64、66、70、74、76、78、80、84、86、88、91、96および135として提示されるプロモーターのいずれかに由来する組成物、例えば内部欠失体または5'欠失体を、発現に対して正または負のいずれか一方の効果を有する要素を除去すること；発現に対して正または負の効果を有する要素を重複させること；および/または発現に対して組織特異的または細胞特異的効果を有する要素を重複させまたは除去することなどによって作製することができる。TATAボックス要素またはその等価配列および下流配列が除去されている3'欠失体から構成される、配列番号2、6、9、11、13、15、17、19、23、26、28、30、32、34、38、40、42、46、50、56、60、64、66、70、74、76、78、80、84、86、88、91、96および135として提示されるプロモーターのいずれかに由来する組成物を、例えばエンハンサー要素を作るために使用することができる。発現に対して正または負の効果；組織特異的効果；細胞特異的効果；または時機特異的効果（例えば限定するわけではないが概日リズム）を有する任意の要素を除去するために、さらなる欠失を行うこともできる。配列番号2、6、9、11、13、15、17、19、23、26、28、30、32、34、38、40、42、46、50、56、60、64、66、70、74、76、78、80、84、86、88、91、96および135として提示されるプロモーター、ならびにそれらに由来するフラグメントまたはエンハンサーはいずれも、他のエンハンサーおよびプロモーターに作動的に連結された配列番号2、6、9、11、13、15、17、19、23、26、28、30、32、34、38、40、42、46、50、56、60、64、66、70、74、76、78、80、84、86、88、91、96および135として提示されるプロモーターならびにそれらに由来するフラグメントまたはエンハンサーのいずれかから構成されるキメラ転写調節要素組成物を作るために使用することができる。本明細書に記載する修飾、重複または欠失が特定導入遺伝子の所望の発現態様に及ぼす効力は、出発分子に加えられた変化および出発分子における変化の目標に依存して異なりうる結果が検証されるように、本明細書の実施例で説明するような安定および一過性植物アッセイにおいて、実験的に試験することができる。

20

30

40

#### 【0033】

本明細書において使用する用語「リーダー」は、ある遺伝子のゲノムコピーの非翻訳5'領域（5'UTR）から単離され、転写開始部位（TSS）とタンパク質コード配列開始部位の間のヌクレオチドセグメントと広く定義される、DNA分子を指す。あるいは、リーダーは、合成的に作製されたDNA要素または操作されたDNA要素であることもできる。リーダーは、

50

作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の発現を調整するための5'調節要素として使用することができる。リーダー分子は、異種プロモーターと共に使用するか、その天然プロモーターと共に使用することができる。したがって本発明のプロモーター分子はその天然リーダーに作動的に連結するか、または異種リーダーに作動的に連結することができる。本発明の実施に際して有用なリーダーには、配列番号3、20、35、43、47、51、57、61、67、71および81、またはそのフラグメントもしくは変異体が含まれる。具体的実施形態では、例えばトランスジェニック植物細胞を含む宿主細胞においてリーダーとして作用する能力を有すると定義される、そのような配列が提供されうる。ある実施形態では、そのような配列が、リーダー活性を含むものとしてデコードされる。

#### 【0034】

10

配列番号3、20、35、43、47、51、57、61、67、71および81として提示されるリーダー配列(5'UTR)は、調節要素から構成されるか、導入遺伝子の転写または翻訳に対して効果を有することができる二次構造をとることができる。配列番号3、20、35、43、47、51、57、61、67、71および81として提示されるリーダー配列は、導入遺伝子の転写または翻訳に影響を及ぼすキメラ調節要素を作るために、本発明に従って使用することができる。加えて、配列番号3、20、35、43、47、51、57、61、67、71および81として提示されるリーダー配列は、導入遺伝子の転写または翻訳に影響を及ぼすキメラリーダー配列を作るために使用することができる。

#### 【0035】

20

外来遺伝子を新しい植物宿主に導入しても、新たに入った遺伝子の高発現が、いつでも起こるわけではない。さらにまた、複雑な形質を扱う場合は、時には、空間的または時間的に異なる発現パターンを有する数個の遺伝子を調整する必要もある。イントロンは主にそのような調整を提供することができる。しかし、一つの植物における同じイントロンの多重使用は、短所を示すことが明らかにされている。そのような場合は、適当な組換えDNA要素を構築するために基本制御要素のコレクションを持つておくことが必要である。発現強化特性を有する当技術分野で知られているイントロンの利用可能なコレクションは限られているので、代替的選択肢が必要とされている。

#### 【0036】

30

配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182として提示されるイントロンのいずれかに由来する組成物は、シス調節要素の内部欠失または重複から構成されることができ、かつ/またはイントロン/エクソンスプライスジャンクションを含む5'および3'配列の改変を使って、プロモーター+リーダーもしくはキメラプロモーター+リーダーおよびコード配列に作動的に連結された場合の発現または発現の特異性を改良するために使用することができる。イントロン/エクソンスプライスジャンクションを含む5'および3'領域の改変は、メッセンジャーRNAのプロセッシングおよびスプライシング後に結果として生じる転写産物において偽の開始コドンまたは停止コドンの導入が起こる潜在的可能性を低下させるために行うこともできる。イントロンは、導入遺伝子の発現に対するイントロンの効果を決定するために、実施例において述べるように実験的に試験することができる。

40

#### 【0037】

本発明によれば、プロモーターまたはプロモーターフラグメントは、既知のプロモーター要素、すなわちTATAボックスおよび他の既知の転写因子結合部位モチーフなどのDNA配列特徴の存在について、解析することができる。当業者は、そのような既知プロモーター要素の同定を使って、元のプロモーターと類似する発現パターンを有するプロモーターの変異体を設計することができる。

#### 【0038】

本明細書において使用する用語「エンハンサー」または「エンハンサー要素」は、総合的な発現パターンの一態様を付与するが、作動的に連結されたポリヌクレオチド配列の転写を駆動するには、通常は単独では不十分である、シス作用性転写調節要素、別名シス要

50

素を指す。プロモーターとは異なり、エンハンサー要素は、通常は、転写開始部位（TSS）またはTATAボックスまたは等価な配列を含まない。プロモーターは、作動的に連結されたポリヌクレオチド配列の転写に影響を及ぼす1つ以上のエンハンサー要素を、本質的に含みうる。単離されたエンハンサー要素をプロモーターに融合して、遺伝子発現の総合的調整の一態様を付与するキメラプロモーターシス要素を作製することもできる。プロモーターまたはプロモーターフラグメントは、作動的に連結された遺伝子の転写を達成する1つ以上のエンハンサー要素を含みうる。多くのプロモーターエンハンサー要素は、DNA結合タンパク質に結合し、かつ/またはDNAトポロジーに影響を及ぼして、DNAテンプレートへのRNAポリメラーゼのアクセスを選択的に可能にするか制限する局所的コンフォメーションまたは転写開始の部位における二重らせんの選択的な開放を容易にする局所的コンフォメーションを作り出すと考えられる。エンハンサー要素は転写を調節する転写因子に結合する機能を果たしうる。一部のエンハンサー要素は2つ以上の転写因子に結合し、転写因子は異なるアフィニティで2つ以上のエンハンサードメインと相互作用しうる。エンハンサー要素は、いくつかの技法によって、例えば欠失解析、すなわち1つ以上のヌクレオチドをプロモーターの5'端または内部から欠失させること；DNaseIフットプリント法、メチル化干渉法、電気泳動移動度シフトアッセイ、ライゲーション媒介（ligation-mediated）PCRによるインビボゲノムフットプリント法、および他の従来アッセイを使ったDNA結合タンパク質解析；またはターゲット配列もしくはターゲットモチーフとして既知のシス要素モチーフまたはエンハンサー要素を使用し、従来のDNA配列比較法、例えばBLASTで、DNA配列類似性解析を行うことなどによって、同定することができる。エンハンサードメインの微細構造は、1つ以上のヌクレオチドの変異誘発（または置換）によって、または他の従来法によって、さらに研究することができる。エンハンサー要素は、化学合成によって取得するか、またはそのような要素を含む調節要素からの単離によって取得することができ、部分配列操作を容易にするために有用な制限酵素部位を含有する隣接ヌクレオチドを追加して合成することができる。したがって、作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の発現を調整するための本明細書に開示する方法によるエンハンサー要素の設計、構築、および使用は、本発明に包含される。

#### 【0039】

植物では、遺伝子コンストラクトにいくつかのイントロンを含めることが、イントロンを欠くコンストラクトと比較して、mRNAおよびタンパク質の蓄積量の増加につながる。

#### 【0040】

この効果は、遺伝子発現の「イントロン媒介性強化（intron mediated enhancement）」（IME）と名付けられている（Mascarenhas et al., (1990) Plant Mol. Biol. 15:913-920）。植物における発現を刺激することが知られているイントロンは、トウモロコシ遺伝子（例えばtubA1、Adh1、Sh1、Ubi1（Jeon et al. (2000) Plant Physiol. 123:1005-1014；Callis et al. (1987) Gene Dev. 1:1183-1200；Vasil et al. (1989) Plant Physiol. 91:1575-1579；Christiansen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689）およびイネ遺伝子（例えばsalt、tpi；McElroy et al., Plant Cell 2:163-171 (1990)；Xu et al., Plant Physiol. 106:459-467 (1994)）中に同定されている。同様に、ペチュニア（例えばrbcS）、ジャガイモ（例えばst-lsl）およびArabidopsis thaliana（例えばubq3およびpat1）の遺伝子のような双子葉植物遺伝子からのイントロンも、遺伝子発現速度を上昇させることが見いだされている（Dean et al. (1989) Plant Cell 1:201-208；Leon et al. (1991) Plant Physiol. 95:968-972；Norris et al. (1993) Plant Mol Biol 21:895-906；Rose and Last (1997) Plant J. 11:455-464）。イントロンのスプライス部位内の欠失または変異は遺伝子発現を低下させることが示されており、これはスプライシングがIMEにとって必要なかもしれないことを示している（Mascarenhas et al. (1990) Plant Mol Biol. 15:913-920；Clancy and Hannah (2002) Plant Physiol. 130:918-929）。ただし、双子葉植物における一定のIMEにはスプライシングそのものは必要でないことが、A. thaliana由来のpat1遺伝子のスプライス部位内の点変異によって示されている（Rose and Beliakoff (2000) Plant Physiol. 122:535-542）。

## 【0041】

イントロンによる遺伝子発現の強化は一般的な現象ではない。なぜなら、組換え発現カセットへのいくつかのイントロン挿入は発現を強化することができないからである（例えば双子葉植物遺伝子（エンドウ由来のrbcS遺伝子、インゲンマメ由来のファゼオリン遺伝子およびSolanum tuberosum由来のstls-1遺伝子）からのイントロンならびにトウモロコシ遺伝子からのイントロン（adh1遺伝子第9イントロン、hsp81遺伝子第1イントロン））（Chee et al. (1986) Gene 41:47-57; Kuhlemeier et al. (1988) Mol Gen Genet 212:405-411; Mascarenhas et al. (1990) Plant Mol. Biol. 15:913-920; Sinibaldi and Mettler (1992)、WE Cohn, K Moldave編「Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology」Vol 42 (Academic Press、ニューヨーク) の229-257頁; Vancanneyt et al. 1990 Mol. Gen. Genet. 220:245-250)。したがって、トランスジェニック植物における非内因性遺伝子または内因性遺伝子の遺伝子発現レベルを操作するために、どのイントロンでも使用できるわけではない。所与の遺伝子の発現速度を高めるためにどのような特徴または具体的配列特色がイントロン配列中に存在しなければならないかは、従来技術ではわかっていないので、所与の植物イントロンが、異種性に使用された場合に、DNAレベルまたは転写産物レベルでの発現の強化（IME）を引き起こすかどうかを予測することは、従来技術からは不可能である。

## 【0042】

本明細書において使用する用語「キメラ」は、第1DNA分子を第2DNA分子に融合することによって作製された単一のDNA分子を指し、この場合、第1DNA分子と第2DNA分子はどちらも、通常は、その構成では、すなわち他方に融合された構成では、見いだされないであろう。したがってキメラDNA分子は、他の場合には通常は自然界に見いだされることがない、新しいDNA分子である。本明細書において使用する用語「キメラプロモーター」は、そのようなDNA分子の操作によって作製されたプロモーターを指す。キメラプロモーターは2つ以上のDNAフラグメントを併せもつことができ、一例は、プロモーターのエンハンサー要素への融合物であるだろう。したがって、作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の発現を調整するための本明細書に開示する方法によるキメラプロモーターの設計、構築、および使用は、本発明に包含される。

## 【0043】

本明細書において使用する用語「変異体」は、第1DNA分子と組成は似ているが同一ではない第2DNA分子を指し、かつこの第2DNA分子は、第1DNA分子の全般的機能（すなわち同じまたは類似する発現パターン）を依然として維持している。変異体は、第1DNA分子の短縮型または切断型、かつ/または第1DNA分子の配列の改変型、例えば異なる制限酵素部位および/または内部欠失、置換、および/または挿入を有するものでありうる。「変異体」は、参照配列の1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および/または挿入を含むヌクレオチド配列を有する調節要素も包含することができ、ここで、誘導体調節要素は、対応する親調節分子より高いまたは低いまたは等しい転写または翻訳活性を有する。調節要素「変異体」は、細菌細胞形質転換および植物細胞形質転換において自然に起こる変異から生じる変異体も包含するであろう。本発明では、元の調節要素のポリヌクレオチド配列と組成が似ているが同一ではなく、同時に元の調節要素の全般的機能（すなわち同じまたは類似する発現パターン）を依然として維持している変異体を、配列番号1~158および180~183として提供されるポリヌクレオチド配列を使って作出することができる。本発明のそのような変異体の作製は、本明細書に照らせば当技術分野の通常の技能の範囲内にあり、本発明の範囲に包含される。キメラ調節要素「変異体」は、参照配列と同じ構成要素を含むが、キメラ調節要素を構成する構成要素は、当技術分野において知られるさまざまな方法、例えば制限酵素消化およびライゲーション、ライゲーション非依存的クローニング（ligation independent cloning）、増幅中のPCR産物のモジュールアセンブリ、または調節要素の直接化学合成、ならびに当技術分野において知られる他の方法によって、作動的に連結することができる。結果として生じるキメラ調節要素「変異体」は、参照配列と同じ構成要素または同じ構成要素の変異体から構成されうるが、構成パーツの作動的な連結を可能に

する1つまたは複数の連結配列を含む1つまたは複数の配列が異なりうる。本発明では、配列番号1~158および180~183として提供されるポリヌクレオチド配列が参照配列を与え、参照配列を構成する構成要素は、当技術分野において知られている方法によって接合することができ、また、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および/もしくは挿入または細菌細胞形質転換および植物細胞形質転換において自然に起こる変異を含むことができる。

#### 【0044】

##### コンストラクト

本明細書において使用する用語「コンストラクト」は、1つ以上のポリヌクレオチド分子が機能的に作動するように連結されている（すなわち作動的に連結されている）ポリヌクレオチド分子を含み、ゲノムへの組込み能または自律的複製能を有する、任意の供給源に由来する任意の組換えポリヌクレオチド分子、例えばプラスミド、コスミド、ウイルス、自律的に複製するポリヌクレオチド分子、ファージ、または線状もしくは環状の一本鎖もしくは二本鎖DNAもしくはRNAポリヌクレオチド分子を意味する。本明細書において使用する用語「ベクター」は、形質転換（すなわち宿主細胞への異種DNAの導入）のために使用することができる、任意の組換えポリヌクレオチドコンストラクトを意味する。この用語には、上述の分子のいずれかから単離された発現カセットも含まれる。

#### 【0045】

本明細書において使用する用語「作動的に連結された」は、第1分子が第2分子に接合されていて、第1分子が第2分子の機能に影響を及ぼすように分子が配置されているものを指す。2つの分子は、連続する単一分子の一部分であっても、そうでなくてもよいし、隣接していても、隣接していなくてもよい。例えばプロモーターは、そのプロモーターが細胞において関心対象の転写可能ポリヌクレオチド分子の転写を調整するのであれば、転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されている。リーダーは、例えばそれが、コード配列がコードするポリペプチドにとってリーダーとして役立つ能力を有する場合に、そのコード配列に作動的に連結されている。

#### 【0046】

ある実施形態において、本発明のコンストラクトは、A. tumefaciens細胞によって提供されるトランスファー分子と協同して植物細胞のゲノムへのT-DNAの組込みを可能にする、T-DNAを含むAgrobacterium tumefaciensから単離されたTiプラスミドの右境界領域（RBまたはAGRtu.RB）と左境界領域（LBまたはAGRtu.LB）とを有する二重Tiプラスミド境界DNAコンストラクトとして提供されうる（例えば米国特許第6,603,061号を参照されたい）。本コンストラクトは、細菌細胞における複製機能および抗生物質選択、例えばori322などのEscherichia coli複製起点、oriVまたはoriRiなどの広宿主域複製起点、およびスペクチノマイシンまたはストレプトマイシンに対する耐性を付与するTn7アミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ（aadA）をコードするSpec/Strpなどの選択可能マーカーのコード領域、またはゲンタマイシン（Gm、Gent）選択可能マーカー遺伝子を提供するプラスミドバックボーンDNAセグメントも含有しうる。植物形質転換の場合、宿主細菌株は、多くの場合、A. tumefaciens ABI、C58、またはLBA4404であるが、植物形質転換の分野における当業者に知られている他の株も、本発明において機能することができる。

#### 【0047】

転写可能ポリヌクレオチド分子が機能的なmRNA分子に転写され、それが翻訳されて、タンパク質産物として発現するような形で、コンストラクトをアセンブルして細胞に導入するための方法は、当技術分野において知られている。本発明の実施に関して、コンストラクトを調製し使用するための従来の組成物および方法ならびに宿主細胞は、当業者にはよく知られている。例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版、第1、2および3巻（2000）（J. Sambrook、D.W. Russell、およびN. Irwin、Cold Spring Harbor Laboratory Press）を参照されたい。植物形質転換に特に適した組換えベクターを作るための方法には、米国特許第4,971,908号；同第4,940,835号；同第4,769,061号；および同第4,757,011号の全体に記載されているものがあるが、これらに限るわけではない。これらのタイプのベクターについては科学文献にも総説がある（例えばRodriguezら「Vecto

10

20

30

40

50

rs: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses」Butterworths、ボストン（1988）およびGlickら「Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology」CRC Press、フロリダ州ボカトン（1993）参照）。高等植物における核酸の発現に有用な典型的ベクターは当技術分野ではよく知られており、これにはAgrobacterium tumefaciensの腫瘍誘発（Ti）プラスミド由来のベクターが含まれるRogers, et al., Methods in Enzymology 153: 253-277 (1987))。植物形質転換に有用な他の組換えベクター、例えばpCaMVCNトランスファーコントロールベクターなども、科学文献に記載されている（例えばFromm, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824-5828 (1985)参照）。

#### 【0048】

コンストラクトには、さまざまな調節要素を、例えばここに提供されるものはどれでも、含めることができる。そのような調節要素はいずれも、他の調節要素と組み合わせて提供することができる。そのような組み合わせは、望ましい調節特色がもたらされるように設計または修飾することができる。ある実施形態において、本発明のコンストラクトは、3'UTRに作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結された調節要素を少なくとも1つは含む。

#### 【0049】

本発明のコンストラクトは、ここに提供される、または当技術分野において知られている、任意のプロモーターまたはリーダーを含みうる。例えば、本発明のプロモーターは、異種非翻訳5'リーダー、例えば熱ショックタンパク質遺伝子に由来するものなどに、作動的に連結することができる（例えば米国特許第5,659,122号および同第5,362,865号参照）。あるいは、本発明のリーダーを、カリフラワーモザイクウイルス35S転写産物プロモーターなどの異種プロモーターに作動的に連結することができる（米国特許第5,352,605号参照）。

#### 【0050】

本明細書において使用する用語「イントロン」は、ある遺伝子のゲノムコピーから単離または同定することができ、翻訳に先だってmRNAプロセッシング中に切り出される領域と広く定義することができるDNA分子を指す。あるいは、イントロンは合成的に作製されたDNA要素または操作されたDNA要素であってもよい。イントロンは、作動的に連結された遺伝子の転写を達成するエンハンサー要素を含有しうる。イントロンは、作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子の発現を調整するための調節要素として使用することができる。DNAコンストラクトはイントロンを含むことができ、イントロンは、転写可能ポリヌクレオチド分子配列に対して異種であっても異種でなくてもよい。当技術分野におけるイントロンの例には、イネアクチンイントロン（米国特許第5,641,876号）およびトウモロコシHSP70イントロン（米国特許第5,859,347号）などがある。本発明の実施に際して有用なイントロンとして、配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182が挙げられる。さらに、イントロン/エクソン境界配列を修飾する場合は、最終転写産物へのメッセンジャーRNAのプロセッシング中に、望まれない開始コドンが形成される潜在的可能性を排除するために、スプライス部位の5'端（GT）の直前にヌクレオチド配列ATまたはヌクレオチドAを使用すること、およびスプライス部位の3'端（AG）の直後にそれぞれヌクレオチドGまたはヌクレオチド配列TGを使用することは避ける方が好ましいであろう。したがって、イントロンの5'端または3'端スプライスジャンクション部位付近の配列は、この方法で修飾することができる。

#### 【0051】

本明細書において使用する用語「3'転写終結分子」または「3'UTR」は、転写中に使用されてmRNA分子の3'非翻訳領域（3'UTR）を生じるDNA分子を指す。mRNA分子の3'非翻訳領域は、特異的切断と3'ポリアダニル化、別名ポリAテールによって、生成しうる。3'UTRは、転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されて、転写可能ポリヌクレオチド分子の下流に位置することができ、これは、ポリアダニル化シグナル、および転写、mRNAプロ

10

20

30

40

50

セシング、または遺伝子発現に影響を及ぼす能力を有する他の調節シグナルを与えるポリヌクレオチドを含みうる。ポリAテールは、mRNAの安定性および翻訳の開始にその機能を果たすと考えられている。当技術分野における3'転写終結分子の例は、ノパリンシンターゼ3'領域 (Fraley, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4803-4807 (1983)参照) ; コムギhsp17 3'領域 ; エンドウRubisco小サブユニット3'領域 ; ワタE6 3'領域 (米国特許第6,096,950号) ; W00011200A2に開示されている3'領域 ; およびコイキシン (coixin) 3'UTR (米国特許第6,635,806号) である。

#### 【0052】

3'UTRは典型的には特異的遺伝子の組み換え発現に有益に利用することができる。動物系では、3'UTRの機構が明確にされている (例えばZhao et al., Microbiol Mol Biol Rev 63:405-445 (1999) ; Proudfoot, Nature 322:562-565 (1986) ; Kim et al., Biotechnology Progress 19:1620-1622 (2003) ; Yonaha and Proudfoot, EMBO J. 19:3770-3777 (2000) ; Cramer et al., FEBS Letters 498:179-182 (2001) ; Kuerstem and Goodwin, Nature Reviews Genetics 4:626-637 (2003))。形質成績の妨げになりうる形質とは無関係な (下流) 配列の望まれない転写を防止するには、RNA転写の効果的な終結が必要である。複数の遺伝子発現カセットを (例えば1つのT-DNA内で) 互いに位置的に近接して配置すると、独立した挿入と比較して、そのコンストラクトでは、1つ以上の遺伝子の遺伝子発現の抑制が起こりうる (Padidam and Cao, BioTechniques 31:328-334 (2001))。これは、例えば全てのカセットからの強い遺伝子発現が望まれる場合などに、十分な発現レベルを達成することの妨げになりうる。

#### 【0053】

植物では、明確に定義づけられたポリアデニル化シグナル配列が知られていない。Hasegawa et al., Plant J. 33:1063-1072, (2003)は、Nicotiana sylvestrisにおいて、インビトロ系でもインビボ系でも、保存されたポリアデニル化シグナル配列を同定することができず、一次 (非ポリアデニル化) 転写産物の実際の長さを決定することができなかった。弱い3'UTRはリードスルーを生じさせる潜在的可能性を有し、それは、隣接発現カセット中に位置する遺伝子の発現に影響を及ぼしうる (Padidam and Cao, BioTechniques 31:328-334 (2001))。転写終結の適当な制御によって、下流に局在する配列 (例えば他の発現カセット) へのリードスルーを防止することができ、さらにまた、RNAポリメラーゼの効率のよい再利用を可能にすることで、遺伝子発現を改善することができる。転写の効率のよい終結 (DNAからのRNAポリメラーゼIIの放出) は、転写の再開にとって不可欠であり、それゆえに、全体的な転写産物レベルに直接的な影響を及ぼす。転写終結に続いて、合成の部位およびテンプレートから、細胞質へと成熟mRNAが放出される。真核mRNAは、ポリ(A)型としてインビボに蓄積するので、従来の方法によって転写終結部位を検出することは困難である。しかし、バイオインフォマティクスの方法による機能的で効率のよい3'UTRの予測は、効果的な3'UTRの容易な予測を可能にするであろう保存的配列がないことから、困難である。

#### 【0054】

実用的観点からみれば、典型的には、導入遺伝子カセットに使用される3'UTRは以下の特徴を有することが有益である。3'UTRは、効率よくかつ効果的に、導入遺伝子の転写を終結させ、複数のカセットが一つのT-DNA中に存在する場合などのようにもう一つの導入遺伝子カセットから構成される任意の隣接DNA配列への、またはT-DNAが挿入された隣接染色体DNAへの、転写産物のリードスルーを防止することができるべきである。3'UTRは、導入遺伝子の発現を駆動するために用いられているプロモーター、リーダーおよびイントロンによって付与される転写活性の低下を引き起こしてはならない。植物バイオテクノロジーでは、3'UTRは、形質転換植物から抽出される逆転写RNAの増幅反応のプライミングに使用されること、ならびに (1) 植物染色体に組み込まれた後の導入遺伝子カセットの転写活性または発現を評価するため ; (2) 植物DNA内での挿入のコピー吸うを評価するため ; および (3) 育種後に結果として生じた種子の接合性を評価するために使用されることが多い。3'UTRは、挿入されたカセットの完全性を特徴づけるために形質転換植物から抽

出されたDNAの増幅反応にも使用される。

#### 【0055】

植物において導入遺伝子を発現させる際に有用な3'UTRは、ビッグブルーステム (Big bluestem) (Andropogon gerardii)、ラベンナグラス (Plume grass) (Saccharum ravennae (Erianthus ravennae))、エノコログサ (Green bristlegrass) (Setaria viridis)、テオシント (Zea mays subsp. mexicana)、アワ (Setaria italica)、またはハトムギ (Coix) (Coix lacryma-jobi) に由来する種子、花および他の組織から単離されたメッセンジャーRNAから作成されたcDNAライブラリーにおける発現配列タグ (EST) の発現に基づいて同定することができる。cDNAのライブラリーは、花組織、種子、葉および根から当業者に知られている方法を使って、選ばれた植物種から単離された組織から作成される。結果として得られたcDNAを、当技術分野において知られているさまざまな配列決定方法を使って、配列決定する。その結果得られたESTを、`clc_ref_assemble_complete` バージョン2.01.37139 (CLC bio USA、02142マサチューセッツ州ケンブリッジ) などのバイオインフォマティクスソフトウェアを使ってクラスターにアセンブルする。各クラスターについてcDNAリードの数をカウントすることによって、各クラスターの転写産物存在量を決定する。同定される3'UTRは、cDNA配列由来の配列およびゲノムDNA由来の配列から構成される。cDNA配列を使ってプライマーを設計し、次にそれを、製造者のプロトコールに従って構築されたGenomeWalker (商標) (Clontech Laboratories, Inc、カリフォルニア州マウンテンビュー) ライブラリーと共に使用して、対応するゲノムDNA配列の3'領域をクローニングすることで、より長い終結配列を得る。各組織ライブラリーについて観察された配列リードの直接カウントまたは標準化カウントのどちらかによる相対的な転写産物存在量の解析は、発現のパターンに関する性質を推測するために使用することができる。例えば、いくつかの3'UTRは、葉ではなく根に、より高い存在量で認められる転写産物中に見いだしうる。これは、その転写産物が根において高度に発現すること、およびその根発現の性質はプロモーター、リード、イントロン、または3'UTRの転写調節に原因があると考えうることを示唆している。特定器官、組織または細胞タイプ内での発現の性質によって同定された3'UTRの実験的試験は、その特定期間、組織または細胞タイプにおける発現を強化する3'UTRの同定をもたらすことができる。

#### 【0056】

コンストラクトおよびベクターは、タンパク質産物のターゲティング、特にクロロプラスト、白色体、または他のプラスチド細胞小器官；ミトコンドリア；ペルオキシソーム；液胞；または細胞外位置へのターゲティングに有用な連結されたペプチドを発現する輸送ペプチドコード配列も含みうる。クロロプラスト輸送ペプチドの使用の説明については、米国特許第5,188,642号および米国特許第5,728,925号を参照されたい。多くのクロロプラスト局在化タンパク質は、核内遺伝子から前駆体として発現し、クロロプラスト輸送ペプチド (CTP) によってクロロプラストにターゲティングされる。そのような単離されたクロロプラストタンパク質の例には、リブローズ-1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼの小サブユニット (SSU)、フェレドキシン、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、集光複合体タンパク質Iおよびタンパク質II、チオレドキシンF、エノールピルビルシキミ酸ホスフェートシンターゼ (EPSPS)、および米国特許第7,193,133号に記載の輸送ペプチドに関連するものがあるが、これらに限るわけではない。異種CTPとのタンパク質融合物の使用によって非クロロプラストタンパク質をクロロプラストにターゲティングしうることと、CTPがタンパク質をクロロプラストにターゲティングするのに十分であることは、インビボおよびインビトロで実証されている。Arabidopsis thaliana EPSPS CTP (CTP2) (Klee et al., Mol. Gen. Genet. 210:437-442 (1987) 参照) または Petunia hybrida EPSPS CTP (CTP4) (della-Cioppa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6873-6877 (1986) 参照) などの適切なクロロプラスト輸送ペプチドの組込みは、トランスジェニック植物において、異種EPSPSタンパク質配列をクロロプラストにターゲティングすることが示されている (米国特許第5,627,061号；同第5,633,435号；および同第5,312,910号ならびにEP 0218571；EP 189707；EP 508909；およびEP 924299参照)。

10

20

30

40

50

## 【0057】

転写可能ポリヌクレオチド分子

本明細書において使用する用語「転写可能ポリヌクレオチド分子」は、RNA分子に転写される能力を有する任意のDNA分子を指し、タンパク質コード配列を有するもの、および遺伝子抑制に有用な配列を有するRNA分子を生産するものなどが含まれるが、これらに限るわけではない。「導入遺伝子」は、少なくともゲノム内でのその位置に関して宿主細胞にとって異種である転写可能ポリヌクレオチド分子および/または細胞の現世代においてまたは任意の先行世代において宿主細胞ゲノムに人工的に組み込まれた転写可能ポリヌクレオチド分子を指す。

## 【0058】

本発明のプロモーターは、そのプロモーター分子に対して異種である転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結することができる。本明細書において使用する用語「異種」は、2つ以上のポリヌクレオチド分子の組み合わせであって、その組合せが自然界に通常は見いだされない場合を指す。例えば、それら2つの分子が異なる種に由来してもよく、かつ/またはそれら2つの分子が異なる遺伝子、例えば同じ種の異なる遺伝子または異なる種の同じ遺伝子に由来しうる。したがってプロモーターは、作動的に連結された転写可能ポリヌクレオチド分子に対して、その組合せが自然界に通常は見いだされないものであるならば、すなわちその転写可能ポリヌクレオチド分子がそのプロモーター分子との組み合わせで作動的に連結された状態で自然には存在しないのであれば、異種である。

## 【0059】

転写可能ポリヌクレオチド分子は、一般に、対応するRNA転写産物の発現が望まれる任意のDNA分子でありうる。RNA転写産物のそのような発現は、結果として生じるmRNA分子の翻訳を、したがってタンパク質発現をもたらす。あるいは、例えば転写可能ポリヌクレオチド分子は、最終的にはある特定遺伝子またはタンパク質の発現の減少を引き起こすように設計することもできる。ある実施形態では、アンチセンス方向に向けた転写可能ポリヌクレオチド分子によって、これを達成することができる。そのようなアンチセンス技術の使用は当業者にはよく知られている。簡単に述べると、アンチセンス転写可能ポリヌクレオチド分子が転写されるにつれて、そのRNA産物は細胞内部の相補的RNA分子にハイブリダイズし、それを封鎖する。この二重鎖RNA分子は細胞の翻訳機構によってタンパク質に翻訳されることができず、細胞内で分解される。この方法で任意の遺伝子を負に調節することができる。

## 【0060】

したがって、本発明の一実施形態は、コンストラクトが植物細胞のゲノムに組み込まれた時に、転写可能ポリヌクレオチド分子の転写が所望のレベルにまたは所望のパターンに調整されるように、転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結された本発明の調節要素、例えば配列番号1~158および180~183として提供されるものなどである。ある実施形態では、転写可能ポリヌクレオチド分子が、遺伝子のタンパク質コード領域を含み、プロモーターは、翻訳されてタンパク質産物として発現されるRNA分子の転写に影響を及ぼす。もう一つの実施形態では、転写可能ポリヌクレオチド分子が遺伝子のアンチセンス領域を含み、プロモーターは、ターゲット宿主細胞内の関心対象の特定RNA分子の発現を阻害するために、アンチセンスRNA分子、二本鎖RNAまたは他の類似の阻害RNA分子の転写に影響を及ぼす。

## 【0061】

作物栽培学的関心対象の遺伝子

転写可能ポリヌクレオチド分子は、作物栽培学的関心対象の遺伝子であることができる。本明細書において使用する用語「作物栽培学的関心対象の遺伝子」は、特定の植物組織、細胞または細胞タイプにおいて発現させた場合に、植物の形態、生理学、成長、発生、収量、産物、栄養プロファイル、疾病または病害虫耐性、および/または環境耐性もしくは化学耐性などに関連して、望ましい特徴を付与する転写可能ポリヌクレオチド分子を指す。作物栽培学的関心対象の遺伝子には、収穫タンパク質 (yield protein)、ストレス

耐性タンパク質、発生制御タンパク質、組織分化タンパク質、分裂組織タンパク質、環境応答タンパク質、老化タンパク質、ホルモン応答タンパク質、脱離タンパク質、ソースタンパク質 (source protein)、シンクタンパク質 (sink protein)、花制御タンパク質、種子タンパク質、除草剤耐性タンパク質、疾病耐性タンパク質、脂肪酸生合成酵素、トコフェロール生合成酵素、アミノ酸生合成酵素、病虫害防除タンパク質、または他の任意の薬剤、例えば抑制のために特定の遺伝子を標的とするアンチセンス分子またはRNAi分子をコードするものなどがあるが、これらに限るわけではない。作物栽培学的関心対象の遺伝子の産物は、植物生理学または代謝に対する効果を引き起こすために植物内で作用しうるか、または植物を餌にする病虫害の飲食物における病虫害防除剤として作用しうる。

#### 【0062】

本発明のある実施形態では、作物栽培学的関心対象の遺伝子である転写可能ポリヌクレオチド分子にプロモーターが作動的に連結されるように、本発明のプロモーターがコンストラクトに組み込まれる。作物栽培学的に有益な形質を付与するために、作物栽培学的関心対象の遺伝子の発現は望ましい。有益な作物栽培学的形質は、例えば限定するわけではないが、除草剤耐性、昆虫防除、改変された収量、真菌病耐性、ウイルス耐性、線虫耐性、細菌病耐性、植物の成長および発生、デンプン生産、改変された油生産、高い油生産量、改変された脂肪酸含有量、高いタンパク質生産量、果実成熟、強化された動物およびヒト栄養、生体高分子、環境ストレス耐性、医薬ペプチドおよび分泌性ペプチド、改良されたプロセッシング形質、改良された消化性、酵素生産、風味、窒素固定、雑種種子生産、繊維生産、およびバイオ燃料生産でありうる。当技術分野において知られている作物栽培学的関心対象の遺伝子の例には、除草剤耐性（米国特許第6,803,501号；同第6,448,476号；同第6,248,876号；同第6,225,114号；同第6,107,549号；同第5,866,775号；同第5,804,425号；同第5,633,435号；同第5,463,175号）、収量増加（米国再発行特許第38,446号；米国特許第6,716,474号；同第6,663,906号；同第6,476,295号；同第6,441,277号；同第6,423,828号；同第6,399,330号；同第6,372,211号；同第6,235,971号；同第6,222,098号；および同第5,716,837号）、昆虫防除（米国特許第6,809,078号；同第6,713,063号；同第6,686,452号；同第6,657,046号；同第6,645,497号；同第6,642,030号；同第6,639,054号；同第6,620,988号；同第6,593,293号；同第6,555,655号；同第6,538,109号；同第6,537,756号；同第6,521,442号；同第6,501,009号；同第6,468,523号；同第6,326,351号；同第6,313,378号；同第6,284,949号；同第6,281,016号；同第6,248,536号；同第6,242,241号；同第6,221,649号；同第6,177,615号；同第6,156,573号；同第6,153,814号；同第6,110,464号；同第6,093,695号；同第6,063,756号；同第6,063,597号；同第6,023,013号；同第5,959,091号；同第5,942,664号；同第5,942,658号；同第5,880,275号；同第5,763,245号；および同第5,763,241号）、真菌病耐性（米国特許第6,653,280号；同第6,573,361号；同第6,506,962号；同第6,316,407号；同第6,215,048号；同第5,516,671号；同第5,773,696号；同第6,121,436号；同第6,316,407号；および同第6,506,962号）、ウイルス耐性（米国特許第6,617,496号；同第6,608,241号；同第6,015,940号；同第6,013,864号；同第5,850,023号；および同第5,304,730号）、線虫耐性（米国特許第6,228,992号）、細菌病耐性（米国特許第5,516,671号）、植物の成長および発生（米国特許第6,723,897号および同第6,518,488号）、デンプン生産（米国特許第6,538,181号；同第6,538,179号；同第6,538,178号；同第5,750,876号；同第6,476,295号）、改変された油生産（米国特許第6,444,876号；同第6,426,447号；および同第6,380,462号）、高い油生産量（米国特許第6,495,739号；同第5,608,149号；同第6,483,008号；および同第6,476,295号）、改変された脂肪酸含量（米国特許第6,828,475号；同第6,822,141号；同第6,770,465号；同第6,706,950号；同第6,660,849号；同第6,596,538号；同第6,589,767号；同第6,537,750号；同第6,489,461号；および同第6,459,018号）、高いタンパク質生産量（米国特許第6,380,466号）、果実成熟（米国特許第5,512,466号）、強化された動物およびヒト栄養（米国特許第6,723,837号；同第6,653,530号；同第6,5412,59号；同第5,985,605号；および同第6,171,640号）、生体高分子（米国再発行特許第37,543号；米国特許第6,228,623号；ならびに同第5,958,745号および同第6,946,588号）、環境ストレス耐性（米国特許第6,072,103号）、医薬ペプチドおよび分

10

20

30

40

50

泌性ペプチド（米国特許第6,812,379号；同第6,774,283号；同第6,140,075号；および同第6,080,560号）、改良されたプロセシング形質（米国特許第6,476,295号）、改良された消化性（米国特許第6,531,648号）、低ラフィノース（米国特許第6,166,292）、工業用酵素生産（米国特許第5,543,576号）、改良されたフレーバー（米国特許第6,011,199号）、窒素固定（米国特許第5,229,114号）、雑種種子生産（米国特許第5,689,041号）、繊維生産（米国特許第6,576,818号；同第6,271,443号；同第5,981,834号；および同第5,869,720号）ならびにバイオ燃料生産（米国特許第5,998,700号）のためのものがある。

#### 【0063】

あるいは、作物栽培学的関心対象の遺伝子は、内因性遺伝子の遺伝子発現の標的調整（targeted modulation）を、例えばアンチセンス（例えば米国特許第5,107,065号）；阻害RNA（例えば出願公開US 2006/0200878およびUS 2008/0066206、ならびに米国特許出願第11/974,469号に記載されているような、miRNA-、siRNA-、トランス作用性siRNA-、およびフェーズド（phased）sRNA媒介機序による遺伝子発現の調整を含む、「RNAi」）またはコサプレッション媒介機序などを介して引き起こすRNA分子をコードすることによって、上述の植物特徴または表現型に影響を及ぼすこともできる。RNAは、所望の内因性mRNA産物を切断するように工学的に改変された触媒的RNA分子（例えばリボザイムまたはリボスイッチ；例えばUS 2006/0200878参照）であることもできるであろう。したがって、関心対象である作物栽培学的に重要な表現型または形態変化に影響を及ぼす転写されたRNA分子をコードする任意の転写可能ポリヌクレオチド分子は、本発明の実施に有用でありうる。転写可能ポリヌクレオチド分子が遺伝子抑制を引き起こす能力を有する分子に転写されるような形でコンストラクトを構築し、細胞中に導入するための方法は当技術分野において知られている。例えば、植物細胞における遺伝子発現を調節するためのアンチセンス方向の転写可能ポリヌクレオチド分子を持つコンストラクトを使った転写後遺伝子抑制は、米国特許第5,107,065号および同第5,759,829号に開示されており、植物における遺伝子発現を調節するためのセンス方向の転写可能ポリヌクレオチド分子を持つコンストラクトを使った転写後遺伝子抑制は、米国特許第5,283,184号および同第5,231,020号に開示されている。植物細胞における転写可能ポリヌクレオチドの発現は、例えば甲虫類病害虫から単離された組成物（米国特許出願公開US20070124836）および線虫病害虫から単離された組成物（米国特許出願公開US20070250947）など、植物細胞を餌にする植物病害虫を抑制するためにも使用することができる。植物病害虫には、節足動物病害虫、線虫病害虫、および真菌または微生物病害虫などがあるが、これらに限るわけではない。本発明のコンストラクトに組み込むための例示的転写可能ポリヌクレオチド分子には、例えばターゲット種以外の種に由来するDNA分子または遺伝子、または同じ種に端を発するか同じ種内に存在するが、古典的な繁殖または育種技法ではなく遺伝子工学の方法によってレシピエント細胞に組み込まれる遺伝子などがある。ポリヌクレオチド分子のタイプとしては、植物細胞中に既に存在するポリヌクレオチド分子、別の植物に由来するポリヌクレオチド分子、異なる生物に由来するポリヌクレオチド分子、または生体外で生成したポリヌクレオチド分子、例えばある遺伝子のアンチセンスメッセージを含有するポリヌクレオチド分子、もしくは人工型、合成型または他の修飾型の導入遺伝子をコードするポリヌクレオチド分子を挙げることができるが、これらに限るわけではない。

#### 【0064】

##### 選択可能マーカー

本明細書において使用する用語「マーカー」は、その発現またはその欠如を何らかの方法で選別またはスコア化することができる任意の転写可能ポリヌクレオチド分子を指す。本発明の実施に際して使用するためのマーカー遺伝子には、 $\beta$ -グルクロニダーゼ（米国特許第5,599,670号に記載のGUS）、緑色蛍光タンパク質およびその変異体（米国特許第5,491,084号および同第6,146,826号に記載のGFP）、抗生物質耐性を付与するタンパク質または除草剤耐性を付与するタンパク質をコードする転写可能ポリヌクレオチド分子などがあるが、これらに限るわけではない。有用な抗生物質耐性マーカー、例えばカナマイシン（nptII）、ハイグロマイシンB（aph IV）、ストレプトマイシンまたはスペクチノマイシ

ン (aad、spec/strep) およびゲンタマイシン (aac3およびaacC4) に対する耐性を付与するタンパク質をコードするものは、当技術分野において知られている。トランスジェニック植物が耐性を示すことが実証されていて、本発明の方法を応用することができる除草剤には、次に挙げるものがあるが、これらに限るわけではない：アミノ-メチル-ホスホン酸、グリホサート、グルホシネート、スルホニル尿素類、イミダゾリノン類、プロモキシニル、ダラポン、ジカンバ、シクロヘキサジオン、プロトボルフィリノゲンオキシダーゼ阻害剤、およびイソキサフルトール除草剤。除草剤耐性に関与するタンパク質をコードする転写可能ポリヌクレオチド分子は当技術分野において知られており、5-エノールピルビルシキミ酸-3-ホスフェートシンターゼ (EPSPS、米国特許第5,627,061号；同第5,633,435号；同第6,040,497号；および同第5,094,945号に記載のグリホサート耐性用) をコードする転写可能ポリヌクレオチド分子；グリホサートオキシドレタクターゼおよびグリホサート-N-アセチルトランスフェラーゼ (米国特許第5,463,175号に記載のGOX；米国特許出願公開第20030083480号に記載のGAT、および米国特許出願公開第20030135879号のジカンバモノオキシゲナーゼ) をコードする転写可能ポリヌクレオチド分子；プロモキシニルニトリラーゼ (米国特許第4,810,648号に記載のプロモキシニル耐性用のBxn) をコードする転写可能ポリヌクレオチド分子；ノルフルazon耐性のためのMisawa, et al., *Plant Journal* 4:833-840 (1993) およびMisawa, et al., *Plant Journal* 6:481-489 (1994) に記載のフィトエンデサチュラーゼ (crtI) をコードする転写可能ポリヌクレオチド分子；スルホニル尿素除草剤に対する耐性のためのSathasiivan, et al., *Nucl. Acids Res.* 18:2188-2193 (1990) に記載のアセトヒドロキシ酸シンターゼ (AHAS、別名ALS) をコードする転写可能ポリヌクレオチド分子；ならびにグルホシネートおよびビアラホス耐性用のDeBlock, et al., *EMBO Journal* 6:2513-2519 (1987) に記載のbar遺伝子などがあるが、これらに限るわけではない。本発明のプロモーター分子は、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ、グリホサート耐性EPSPS、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ヒドロキシフェニルピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ダラポンデハロゲナーゼ、プロモキシニル耐性ニトリラーゼ、アントラニル酸シンターゼ、アリールオキシアルカノエートジオキシゲナーゼ、アセチルCoAカルボキシラーゼ、グリホサートオキシドレタクターゼ、およびグリホサート-N-アセチルトランスフェラーゼをコードする、連結された転写可能ポリヌクレオチド分子を発現させることができる。

10

20

30

#### 【0065】

「選択可能マーカー」という用語には、その分泌を、形質転換細胞を同定または選択する手段として検出することができる分泌性マーカーをコードする遺伝子も包含される。例として、抗体相互作用によって同定することができる分泌性抗原をコードするマーカー、さらには触媒活性で検出することができる分泌性酵素をコードするマーカーが挙げられる。選択可能な分泌マーカータンパク質は、(例えばELISAによって) 検出することができる小さい拡散性タンパク質、細胞外溶液中に検出することができる小さい活性酵素 (例えば $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -ラクタマーゼ、ホスフィノトリシントランスフェラーゼ)、または細胞壁に挿入もしくは捕捉されるタンパク質 (例えばエクステンシン (extension) またはタバコPR-Sとも呼ばれるタバコ感染特異的タンパク質の発現ユニットに見いだされるリーダー配列を含むタンパク質など) を含む、いくつかのクラスに分類される。他の考えうる選択可能マーカー遺伝子は当業者には明白であるだろうし、それらは本発明に包含される。

40

#### 【0066】

##### 細胞形質転換

本発明は、転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されたプロモーターを含む形質転換細胞および形質転換植物を作製する方法にも向けられる。

#### 【0067】

「形質転換」という用語は、レシピエント宿主への核酸の導入を指す。本明細書において使用する用語「宿主」は、細菌、真菌、または植物を指し、任意の細胞、組織、器官、

50

または細菌、真菌、もしくは植物の子孫を含む。特に興味深い植物の組織および細胞には、プロトプラスト、カルス、根、塊茎、種子、茎、葉、実生、胚、および花粉などがある。

#### 【0068】

本明細書において使用する用語「形質転換された」は、外来ポリヌクレオチド分子、例えばコンストラクトが導入されている、細胞、組織、器官、または生物を指す。導入されたポリヌクレオチド分子は、導入されたポリヌクレオチド分子が以降の子孫に受け継がれるように、レシピエント細胞、組織、器官または生物のゲノムDNA中に組み込まれてもよい。「トランスジェニック」または「形質転換された」細胞または生物には、細胞または生物の子孫、および交配においてそのようなトランスジェニック生物を親として使用する育種プログラムによって作出された、外来ポリペプチド分子の存在に起因する改変された表現型を示す子孫も包含される。「トランスジェニック」という用語は、1つ以上の異種ポリ核酸分子を含有する細菌、真菌、または植物を指す。

#### 【0069】

植物細胞にポリ核酸分子を導入するための方法は数多くある。本方法は一般に、適切な宿主細胞を選択するステップ、宿主細胞を組換えベクターで形質転換するステップ、および形質転換された宿主細胞を取得するステップを含む。適切な方法には、細菌感染（例えば *Agrobacterium*）、バイナリー細菌人工染色体ベクター、DNAの直接送達（例えばPEG媒介形質転換、乾燥/阻害（desiccation/inhibition）媒介DNA取り込み、エレクトロポレーション、炭化ケイ素繊維との攪拌、およびDNA被覆粒子の加速などがある（Potrykus, et al., *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205 (1991)に総説がある）。

#### 【0070】

DNA分子を細胞中に導入するための技術は、当業者にはよく知られている。本発明の実施において植物ゲノムに植物DNAコンストラクトを導入することによって植物細胞を形質転換するための方法および材料には、実証済みの周知の方法をどれでも含めることができる。任意の形質転換法を利用して、1つ以上の本発明のプロモーターおよび/またはコンストラクトで、宿主細胞を形質転換することができる。宿主細胞は、任意の細胞または生物、例えば植物細胞、藻類細胞、藻類、真菌細胞、真菌、細菌細胞、または昆虫細胞であることができる。好ましい宿主および形質転換細胞として、植物、*Aspergillus*、酵母、昆虫、細菌および藻類に由来する細胞が挙げられる。

#### 【0071】

ホモ接合型のトランスジェニック植物を提供するために、再生させたトランスジェニック植物を自家受粉させることができる。あるいは、再生させたトランスジェニック植物から取得した花粉を、非トランスジェニック植物、好ましくは作物栽培学的に重要な種の近交系と交配させてもよい。さまざまな形質および作物によく使用される育種法の説明は、いくつかある参考書、例えばAllard「*Principles of Plant Breeding*」John Wiley & Sons、ニューヨーク、カリフォルニア大学デービス校、カリフォルニア州、50-98（1960）；Simmonds「*Principles of crop improvement*」Longman, Inc.、ニューヨーク、369-399（1979）；Sneep and Hendriksen「*Plant breeding perspectives*」Wageningen編, Center for Agricultural Publishing and Documentation（1979）；Fehr「*Soybeans: Improvement, Production and Uses*」第2版、モノグラフ、16:249（1987）；Fehr「*Principles of variety development, Theory and Technique*」（Vol.1）および「*Crop Species Soybean*」（Vol 2）、アイオワ州立大学、Macmillan Pub. Co.、ニューヨーク、360-376（1987）の一つに見いだすことができる。逆に、非トランスジェニック植物からの花粉を使って、再生させたトランスジェニック植物に受粉してもよい。

#### 【0072】

形質転換された植物を、関心対象の遺伝子の存在ならびに本発明の調節要素によって付与される発現レベルおよび/または発現プロファイルについて解析することができる。当業者は、形質転換された植物の解析に利用することができる方法を数多く知っている。例えば、植物解析の方法には、サザンブロットまたはノーザンブロット、PCRベースのアプ

ローチ、生化学的解析、表現型スクリーニング法、圃場評価、および免疫診断アッセイなどがあるが、これらに限るわけではない。転写可能ポリヌクレオチド分子の発現は、TaqMan（登録商標）（Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ）試薬と製造者が記述している方法とを使って測定することができ、PCRサイクル回数はTaqMan（登録商標）試験マトリックスを使って決定される。あるいは、Invader（登録商標）（Third Wave Technologies、ウィスコンシン州マディソン）試薬と製造者が記述している方法とを、導入遺伝子発現に使用することもできる。

#### 【0073】

本発明の植物の種子は稔性トランスジェニック植物から収穫することができ、本発明のコンストラクトを含み、かつ作物栽培学的関心対象の遺伝子を発現させる雑種植物系統を含む、本発明の形質転換植物の子孫世代を成長させるために使用することができる。

10

#### 【0074】

本発明は、本発明の植物の部分も提供する。植物部分としては、限定するわけではないが、葉、茎、根、塊茎、種子、内乳、胚珠、および花粉が挙げられる。本発明は、本発明の核酸分子を含む形質転換された植物細胞も包含し、提供する。

#### 【0075】

トランスジェニック植物はトランスジェニックポリヌクレオチド分子をその子孫に伝える。子孫には、祖先植物に由来する導入遺伝子を含む任意の再生可能な植物部分または種子が含まれる。トランスジェニック植物は、好ましくは、形質転換されたポリヌクレオチド分子に関してホモ接合であり、有性生殖の結果として全ての子孫にその配列を伝達する。子孫はトランスジェニック植物によって生産された種子から成長させることができる。次に、これらのさらなる植物を自家受粉させて、植物の真の育種系（true breeding line）を生成させることができる。これらの植物からの子孫を、とりわけ遺伝子発現について評価する。遺伝子発現は、ウェスタンブロッティング、ノーザンブロッティング、免疫沈降、およびELISAなど、いくつかの一般的方法によって検出することができる。

20

#### 【0076】

##### 商品生産物

本発明は、本発明のDNA分子を含む商品生産物を提供する。本明細書にいう「商品生産物」は、本発明のDNA分子を含む植物、種子、植物細胞または植物部分に由来する材料から構成される任意の組成物または生産物を指す。商品生産物は消費者に販売することができ、生育可能であっても生育不能であってもよい。生育不能な商品生産物には、生育不能な種子および穀物；加工された種子、種子部分、および植物部分；脱水された植物組織、凍結された植物組織、および加工された植物組織；陸生および/または水生動物が消費するための動物飼料用に加工された、ならびに油、粗挽き粉、穀粉、フレーク、糠、繊維、乳、チーズ、紙、クリーム、ワイン、およびヒトが消費するための他の任意の食品用に加工された、種子および植物部分；ならびにバイオマスおよび燃料生産ブツなどがあるが、これらに限るわけではない。生育可能な商品生産物には種子および植物細胞などがあるが、これらに限るわけではない。このように、本発明のDNA分子を含む植物は、植物またはその部分から典型的に獲得される任意の商品生産物を製造するために使用することができる。

30

40

#### 【0077】

ここに本発明を概説し終えたので、以下の実施例を参照することによって、本発明は、より容易に理解されるであろう。以下の実施例は、例示のために提供するものであって、別段の指定がある場合を除き、本発明の限定を意図していない。以下の実施例において開示する技法が、本発明の実施に際してうまく機能することを本発明者らが見いだした技法に相当することは、当業者には理解されるはずである。しかし当業者は、本開示に照らして、開示されている具体的実施形態には多くの変更を加えることができ、それでもなお、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、ほぼ同じまたは類似する結果が得られることを理解すべきであり、それゆえに、添付の図面において説明しまたは図示することはすべて、限定ではなく例示であると解釈されるべきである。

50

## 【実施例】

## 【0078】

## 実施例1：調節要素の同定とクローニング

単子葉植物種ビッグブルーステム (*Andropogon gerardii*)、ラベンナグラス (*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*))、エノコログサ (*Setaria viridis*)、テオシント (*Zea mays* subsp. *mexicana*)、アワ (*Setaria italica*)、およびハトムギ (*Coix lacryma-jobi*) のゲノムDNAから、新規ユビキチン転写調節要素または転写調節発現要素群 (EXP) 配列を同定し、単離した。

## 【0079】

上記の種のそれぞれからユビキチン1転写産物配列を同定した。ユビキチン1転写産物のそれぞれの5'非翻訳領域 (5'UTR) を使って、作動的に連結されたプロモーター、リーダー (5'UTR) および第1イントロンを含む、同定されたユビキチン遺伝子の対応する転写調節要素を増幅するためのプライマーを設計した。それらのプライマーを、製造者のプロトコールに従って構築したGenomeWalker (商標) (Clontech Laboratories, Inc、カリフォルニア州マウンテンビュー) ライブラリーと共に使用することで、対応するゲノムDNA配列の5'領域をクローニングした。*Zea mays*のユビキチン4、6および7遺伝子のホモログである公表された配列を使って、単子葉植物*Sorghum bicolor*からも、ユビキチン転写調節要素を単離した。

## 【0080】

増幅されたDNA内の調節要素を同定するために、同定された配列を使って、パイオインフォーマティックス解析を行った。この解析の結果を使って、DNA配列内の調節要素を同定し、その調節要素を増幅するためのプライマーを設計した。ユニークな制限酵素部位を含有するプライマーならびに*A. gerardii*、*S. ravennae*、*S. viridis*、*Z. mays* subsp. *mexicana*、*S. italica*、*C. lacryma-jobi*および*S. bicolor*から単離されたゲノムDNAと共に、標準的なポリメラーゼ連鎖反応条件を使って、各調節要素について、対応するDNA分子を増幅した。その結果得られたDNAフラグメントを基本植物発現ベクター中にライゲートし、配列決定した。次に、形質転換された植物プロトプラストを使って、調節要素TSSおよびイントロン/エクソンスプライスジャンクションの解析を行った。簡単に述べると、プロトプラストを、異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されたクローン化DNAフラグメントを含む植物発現ベクターで形質転換し、5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen、92008カリフォルニア州カールズバッド) を使って、調節要素TSSおよびイントロン/エクソンスプライスジャンクションを、それによって生産されるmRNA転写産物の配列を解析することによって確認した。

## 【0081】

同定された転写調節発現要素群 (「EXP」) の配列を、下記表1に列挙するとおり、配列番号1、5、8、10、12、14、16、18、22、25、27、29、31、33、37、39、41、45、49、53、55、59、63、65、69、73、75、77、79、83、85、87、90、93、95、97、98、99、100、102、104、106、108、110、112、114、115、116、117、119、121、123、124、125、126、128、130、132、133、134、136、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、180、181および183として、ここに提供する。プロモーター配列は、配列番号2、6、9、11、13、15、17、19、23、26、28、30、32、34、38、40、42、46、50、56、60、64、66、70、74、76、78、80、84、86、88、91、96および135として、ここに提供する。リーダー配列は、配列番号3、20、35、43、47、51、57、61、67、71および81として、ここに提供する。イントロン配列は、配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182として、ここに提供する。エンハンサー配列は配列番号89として提供する。

[表1] さまざまなイネ科植物種から単離された転写調節発現要素群 (「EXP」)、プロモーター、エンハンサー、リーダーおよびイントロン

【表 1 - 1】

| アノテーション                | 配列番号 | サイズ (bp) | 由来属/種              | 説明および/または連結されているEXPの調節要素<br>5'→3' 方向 (配列番号) :                                                   | EXPを含むプラスミドク<br>ラストラクトおよびア<br>ンプリコン                |
|------------------------|------|----------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| EXP ANDge. Ubq1-1:1:9  | 1    | 3741     | <i>A. gerardii</i> | EXP: P-ANDge. Ubq1-1:1:11 (配列番号2) ; L-ANDge. Ubq1-1:1:2 (配列番号3) ; I-ANDge. Ubq1-1:1:3 (配列番号4).  |                                                    |
| P-ANDge. Ubq1-1:1:11   | 2    | 2603     | <i>A. gerardii</i> | プロモーター                                                                                          |                                                    |
| L-ANDge. Ubq1-1:1:2    | 3    | 99       | <i>A. gerardii</i> | リーダー                                                                                            |                                                    |
| I-ANDge. Ubq1-1:1:3    | 4    | 1039     | <i>A. gerardii</i> | イントロン                                                                                           |                                                    |
| EXP-ANDge. Ubq1-1:1:7  | 5    | 3255     | <i>A. gerardii</i> | EXP: P-ANDge. Ubq1-1:1:9 (配列番号6) ; L-ANDge. Ubq1-1:1:2 (配列番号3) ; I-ANDge. Ubq1-1:1:4 (配列番号7).   | pMON136264,<br>PCR0145892,<br>pMON140896,<br>PCR41 |
| P-ANDge. Ubq1-1:1:9    | 6    | 2114     | <i>A. gerardii</i> | プロモーター                                                                                          |                                                    |
| I-ANDge. Ubq1-1:1:4    | 7    | 1042     | <i>A. gerardii</i> | イントロン                                                                                           |                                                    |
| EXP ANDge. Ubq1-1:1:8  | 8    | 2785     | <i>A. gerardii</i> | EXP: P-ANDge. Ubq1-1:1:10 (配列番号9) ; L-ANDge. Ubq1-1:1:2 (配列番号3) ; I-ANDge. Ubq1-1:1:4 (配列番号7).  | pMON140917,<br>PCR42                               |
| P ANDge. Ubq1 1:1:10   | 9    | 1644     | <i>A. gerardii</i> | プロモーター                                                                                          |                                                    |
| EXP ANDge. Ubq1-1:1:10 | 10   | 2613     | <i>A. gerardii</i> | EXP: P-ANDge. Ubq1-1:1:12 (配列番号11) ; L-ANDge. Ubq1-1:1:2 (配列番号3) ; I-ANDge. Ubq1-1:1:4 (配列番号7). | PCR0145815,<br>PCR43                               |
| P-ANDge. Ubq1-1:1:12   | 11   | 1472     | <i>A. gerardii</i> | プロモーター                                                                                          |                                                    |
| EXP-ANDge. Ubq1-1:1:6  | 12   | 2255     | <i>A. gerardii</i> | EXP: P-ANDge. Ubq1-1:1:8 (配列番号13) ; L-ANDge. Ubq1-1:1:2 (配列番号3) ; I-ANDge. Ubq1 1:1:4 (配列番号7).  | pMON136259,<br>PCR0145893,<br>pMON140898,<br>PCR44 |
| P-ANDge. Ubq1-1:1:8    | 13   | 1114     | <i>A. gerardii</i> | プロモーター                                                                                          |                                                    |
| EXP-ANDge. Ubq1-1:1:11 | 14   | 1912     | <i>A. gerardii</i> | EXP: P ANDge. Ubq1 1:1:13 (配列番号15) ; L-ANDge. Ubq1-1:1:2 (配列番号3) ; I-ANDge. Ubq1-1:1:4 (配列番号7). | PCR0145817,<br>pMON140899,<br>PCR45                |

10

20

30

40

【表 1 - 2】

|                        |    |      |                    |                                                                                                 |                                                                                  |
|------------------------|----|------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| P-ANDge. Ubq1-1:1:13   | 15 | 771  | <i>A. gerardii</i> | ブロモーター                                                                                          | PCR0145819,<br>pMON140900,<br>PCR46                                              |
| EXP-ANDge. Ubq1-1:1:12 | 16 | 1623 | <i>A. gerardii</i> | EXP: P-ANDge. Ubq1-1:1:14 (配列番号17); L-ANDge. Ubq1-1:1:2 (配列番号3); I-ANDge. Ubq1-1:1:4 (配列番号7).   |                                                                                  |
| P-ANDge. Ubq1-1:1:14   | 17 | 482  | <i>A. gerardii</i> | ブロモーター                                                                                          |                                                                                  |
| EXP-ERIRA. Ubq1        | 18 | 3483 | <i>E. ravennae</i> | EXP: P-ERIRA. Ubq1-1:1:10 (配列番号19); L-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号20); I-ERIRA. Ubq1-1:1:1 (配列番号21). |                                                                                  |
| P-ERIRA. Ubq1-1:1:10   | 19 | 2536 | <i>E. ravennae</i> | ブロモーター                                                                                          |                                                                                  |
| L-ERIRA. Ubq1-1:1:2    | 20 | 94   | <i>E. ravennae</i> | リーター                                                                                            |                                                                                  |
| I-ERIRA. Ubq1-1:1:1    | 21 | 1041 | <i>E. ravennae</i> | イントロン                                                                                           |                                                                                  |
| EXP-ERIRA. Ubq1-1:1:9  | 22 | 3152 | <i>E. ravennae</i> | EXP: P-ERIRA. Ubq1-1:1:9 (配列番号23); L-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号20); I-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号24).  | pMON136263,<br>PCR0145896,<br>pMON140904,<br>PCR50                               |
| P-ERIRA. Ubq1-1:1:9    | 23 | 2014 | <i>E. ravennae</i> | ブロモーター                                                                                          |                                                                                  |
| I-ERIRA. Ubq1-1:1:2    | 24 | 1044 | <i>E. ravennae</i> | イントロン                                                                                           |                                                                                  |
| EXP-ERIRA. Ubq1-1:1:10 | 25 | 2663 | <i>E. ravennae</i> | EXP: P-ERIRA. Ubq1-1:1:11 (配列番号26); L-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号20); I-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号24). | PCR0145820,<br>pMON140905,<br>PCR51                                              |
| P-ERIRA. Ubq1-1:1:11   | 26 | 1525 | <i>E. ravennae</i> | ブロモーター                                                                                          |                                                                                  |
| EXP-ERIRA. Ubq1-1:1:8  | 27 | 2182 | <i>E. ravennae</i> | EXP: P-ERIRA. Ubq1-1:1:8 (配列番号28); L-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号20); I-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号24).  | pMON136258,<br>PCR0145897,<br>pMON140906,<br>PCR52,<br>pMON142864,<br>pMON142862 |
| P-ERIRA. Ubq1-1:1:8    | 28 | 1044 | <i>E. ravennae</i> | ブロモーター                                                                                          |                                                                                  |
| EXP-ERIRA. Ubq1-1:1:11 | 29 | 1934 | <i>E. ravennae</i> | EXP: P-ERIRA. Ubq1-1:1:12 (配列番号30); L-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号20); I-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号24). | PCR0145821,<br>pMON140907,<br>PCR53                                              |

10

20

30

40

【表 1 - 3】

|                              |    |      |                                |                                                                                                 |  |                                                         |
|------------------------------|----|------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------|
| P-ERIRA. Ubq1-1:1:12         | 30 | 796  | <i>E. ravennae</i>             | プロモーター                                                                                          |  | PCR0145822,<br>pMON140908,<br>PCR54                     |
| EXP-ERIRA. Ubq1:1:12         | 31 | 1649 | <i>E. ravennae</i>             | EXP: P-ERIRA. Ubq1-1:1:13 (配列番号32); L-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号20); I-ERIRA. Ubq1-1:1:2 (配列番号24). |  |                                                         |
| P-ERIRA. Ubq1 1:1:13         | 32 | 511  | <i>E. ravennae</i>             | プロモーター                                                                                          |  | pMON140878,<br>PCR0145909,<br>pMON129203,<br>pMON131938 |
| EXP-Sv. Ubq1:1:2             | 33 | 2631 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:1 (配列番号34); I-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:1 (配列番号36).           |  |                                                         |
| P-Sv. Ubq1-1:1:1             | 34 | 1493 | <i>S. viridis</i>              | プロモーター                                                                                          |  |                                                         |
| L-Sv. Ubq1-1:1:2             | 35 | 127  | <i>S. viridis</i>              | リーダー                                                                                            |  |                                                         |
| I-Sv. Ubq1-1:1:1             | 36 | 1011 | <i>S. viridis</i>              | イントロン                                                                                           |  |                                                         |
| EXP-Sv. Ubq1:1:3             | 37 | 2173 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:2 (SQ ID NO:38); L-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:1 (配列番号36).      |  | PCR0145929,<br>pMON129204                               |
| P-Sv. Ubq1-1:1:2             | 38 | 1035 | <i>S. viridis</i>              | プロモーター                                                                                          |  |                                                         |
| EXP-Sv. Ubq1:1:5             | 39 | 1819 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:3 (配列番号40); L-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:1 (配列番号36).           |  | pMON129205,<br>pMON131959                               |
| P-Sv. Ubq1-1:1:3             | 40 | 681  | <i>S. viridis</i>              | プロモーター                                                                                          |  |                                                         |
| EXP-Zm. UbqM1:1:1<br>(アレル-1) | 41 | 1922 | <i>Z. mays subsp. mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:1 (配列番号42); L-Zm. UbqM1-1:1:1 (配列番号43); I-Zm. UbqM1-1:1:5 (配列番号44).        |  | pMON140881,<br>PCR0145914,<br>pMON129210,<br>pMON131961 |
| P-Zm. UbqM1-1:1:1<br>(アレル-1) | 42 | 850  | <i>Z. mays subsp. mexicana</i> | プロモーター                                                                                          |  |                                                         |
| L-Zm. UbqM1-1:1:1<br>(アレル-1) | 43 | 78   | <i>Z. mays subsp. mexicana</i> | リーダー                                                                                            |  |                                                         |
| I-Zm. UbqM1-1:1:5<br>(アレル-1) | 44 | 994  | <i>Z. mays subsp. mexicana</i> | イントロン                                                                                           |  |                                                         |
| EXP-Zm. UbqM1:1:4<br>(アレル 2) | 45 | 1971 | <i>Z. mays subsp. mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:4 (配列番号46); L-Zm. UbqM1-1:1:5 (配列番号47); I Zm. UbqM1 1:1:4 (配列番号48).        |  | pMON140882,<br>PCR0145915,<br>pMON129212,<br>pMON131963 |

10

20

30

40

【表 1 - 4】

|                                  |    |      |                                          |                                                                                           |                                                         |
|----------------------------------|----|------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| P-Zm. UbqM1-1:1:4<br>(ア ン ル -2)  | 46 | 887  | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | プロモーター                                                                                    |                                                         |
| L-Zm. UbqM1-1:1:5<br>(ア ン ル -2)  | 47 | 77   | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | リーダー                                                                                      |                                                         |
| I Zm. UbqM1 1:1:4<br>(ア ン ル -2)  | 48 | 1007 | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | イントロン                                                                                     | PCR0145916,<br>pMON129211,<br>pMON131962,<br>pMON132047 |
| EXP-Zm. UbqM1:1:2<br>(ア ン ル -3)  | 49 | 2005 | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:5 (配列番号50); L Zm. UbqM1 1:1:4 (配列番号51); I Zm. UbqM1 1:1:11 (配列番号52). |                                                         |
| P-Zm. UbqM1-1:1:5<br>(ア ン ル -3)  | 50 | 877  | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | プロモーター                                                                                    |                                                         |
| L-Zm. UbqM1-1:1:4<br>(ア ン ル -3)  | 51 | 78   | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | リーダー                                                                                      |                                                         |
| I Zm. UbqM1 1:1:11<br>(ア ン ル -3) | 52 | 1050 | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP-Zm. UbqM1:1:5<br>(ア ン ル -3)  | 53 | 2005 | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:5 (配列番号50); L-Zm. UbqM1-1:1:4 (配列番号51); I-Zm. UbqM1-1:1:12 (配列番号54). |                                                         |
| I-Zm. UbqM1-1:1:12<br>(ア ン ル -3) | 54 | 1050 | <i>Z. mays</i> subsp.<br><i>mexicana</i> | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP-Sb. Ubq4:1:1                 | 55 | 1632 | <i>S. bicolor</i>                        | EXP: P-Sb. Ubq4-1:1:1 (配列番号56); L-Sb. Ubq4-1:1:1 (配列番号57); I-Sb. Ubq4-1:1:1 (配列番号58).     | pMON140886,<br>PCR0145921,<br>pMON129219,<br>pMON132932 |
| P-Sb. Ubq4-1:1:1                 | 56 | 401  | <i>S. bicolor</i>                        | プロモーター                                                                                    |                                                         |
| L-Sb. Ubq4-1:1:1                 | 57 | 154  | <i>S. bicolor</i>                        | リーダー                                                                                      |                                                         |
| I-Sb. Ubq4-1:1:1                 | 58 | 1077 | <i>S. bicolor</i>                        | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP-Sb. Ubq6                     | 59 | 2000 | <i>S. bicolor</i>                        | EXP: P Sb. Ubq6 1:1:2 (配列番号60); L Sb. Ubq6 1:1:1 (配列番号61); I Sb. Ubq6 1:1:1 (配列番号62).     |                                                         |

10

20

30

40

【表 1 - 5】

|                     |    |      |                   |                                                                                                |                                          |
|---------------------|----|------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| P-Sb. Ubq6-1:1:2    | 60 | 791  | <i>S. bicolor</i> | プロモーター                                                                                         |                                          |
| L-Sb. Ubq6-1:1:1    | 61 | 136  | <i>S. bicolor</i> | リーダー                                                                                           |                                          |
| I-Sb. Ubq6-1:1:1    | 62 | 1073 | <i>S. bicolor</i> | イントロン                                                                                          | pMON140887,<br>PCR0145920,<br>pMON129218 |
| EXP-Sb. Ubq6:1:1    | 63 | 2064 | <i>S. bicolor</i> | EXP: P-Sb. Ubq6-1:1:1 (配列番号64); L-Sb. Ubq6-1:1:1 (配列番号61); I-Sb. Ubq6-1:1:1 (配列番号62).          |                                          |
| P-Sb. Ubq6-1:1:1    | 64 | 855  | <i>S. bicolor</i> | プロモーター                                                                                         |                                          |
| EXP-Sb. Ubq7:1:1    | 65 | 2000 | <i>S. bicolor</i> | EXP: P-Sb. Ubq7-1:1:1 (配列番号66); L-Sb. Ubq7-1:1:1 (配列番号67); I-Sb. Ubq7-1:1:1 (配列番号68).          | pMON132974                               |
| P-Sb. Ubq7-1:1:1    | 66 | 565  | <i>S. bicolor</i> | プロモーター                                                                                         |                                          |
| L-Sb. Ubq7-1:1:1    | 67 | 77   | <i>S. bicolor</i> | リーダー                                                                                           |                                          |
| I-Sb. Ubq7-1:1:1    | 68 | 1358 | <i>S. bicolor</i> | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-SETit. Ubq1:1:1 | 69 | 2622 | <i>S. italica</i> | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号70); L-SETit. Ubq1 1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1 1:1:1 (配列番号72). | pMON140877,<br>PCR0145900,<br>pMON129200 |
| P-SETit. Ubq1-1:1:1 | 70 | 1492 | <i>S. italica</i> | プロモーター                                                                                         |                                          |
| L-SETit. Ubq1-1:1:1 | 71 | 127  | <i>S. italica</i> | リーダー                                                                                           |                                          |
| I-SETit. Ubq1-1:1:1 | 72 | 1003 | <i>S. italica</i> | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-SETit. Ubq1:1:4 | 73 | 2622 | <i>S. italica</i> | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:4 (配列番号74); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1 1:1:1 (配列番号72). | pMON132037                               |
| P-SETit. Ubq1-1:1:4 | 74 | 1492 | <i>S. italica</i> | プロモーター                                                                                         |                                          |
| EXP-SETit. Ubq1:1:2 | 75 | 2164 | <i>S. italica</i> | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:2 (配列番号76); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号72). |                                          |
| P-SETit. Ubq1-1:1:2 | 76 | 1034 | <i>S. italica</i> | プロモーター                                                                                         |                                          |
| EXP-SETit. Ubq1:1:3 | 77 | 1810 | <i>S. italica</i> | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:3 (配列番号78); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号72). | PCR0145905,<br>pMON129202,<br>pMON131957 |
| P-SETit. Ubq1-1:1:3 | 78 | 680  | <i>S. italica</i> | プロモーター                                                                                         |                                          |

10

20

30

40

【表 1 - 6】

|                   |    |      |                        |                                                                                       |                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------|----|------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EXP-Cl. Ubq1-1:1  | 79 | 1940 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号80); L-Cl. Ubq1 1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号82). | pMON140889,<br>PCR0145922,<br>pMON140913,<br>PCR19,<br>pMON129221,<br>pMON146795,<br>pMON146796,<br>pMON146797,<br>pMON146798,<br>pMON146799,<br>pMON132047,<br>pMON146800,<br>pMON146801,<br>pMON146802 |
| P-Cl. Ubq1-1:1:1  | 80 | 837  | <i>C. lacryma-jobi</i> | プロモーター                                                                                |                                                                                                                                                                                                          |
| L-Cl. Ubq1-1:1:1  | 81 | 86   | <i>C. lacryma-jobi</i> | リーダー                                                                                  |                                                                                                                                                                                                          |
| I-Cl. Ubq1-1:1:1  | 82 | 1017 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                                 |                                                                                                                                                                                                          |
| EXP-Cl. Ubq1-1:3  | 83 | 1845 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:4 (配列番号84); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号82). | PCR0145945,<br>pMON140914,<br>PCR20                                                                                                                                                                      |
| P-Cl. Ubq1-1:1:4  | 84 | 742  | <i>C. lacryma-jobi</i> | プロモーター                                                                                |                                                                                                                                                                                                          |
| EXP Cl. Ubq1-1:4  | 85 | 1504 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:3 (配列番号86); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号82). | PCR0145946,<br>pMON140915,<br>PCR21                                                                                                                                                                      |
| P-Cl. Ubq1-1:1:3  | 86 | 401  | <i>C. lacryma-jobi</i> | プロモーター                                                                                |                                                                                                                                                                                                          |
| EXP Cl. Ubq1-1:5  | 87 | 1157 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:5 (配列番号88); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号82). | PCR0145947,<br>pMON140916,<br>PCR22                                                                                                                                                                      |
| P-Cl. Ubq1-1:1:5  | 88 | 54   | <i>C. lacryma-jobi</i> | プロモーター                                                                                |                                                                                                                                                                                                          |
| E-Cl. Ubq1-1:1:1  | 89 | 798  | <i>C. lacryma-jobi</i> | エンハンサー                                                                                |                                                                                                                                                                                                          |
| EXP-Cl. Ubq1-1:12 | 90 | 3393 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:9 (配列番号91); L-Cl. Ubq1 1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:7 (配列番号92)  | pMON142729                                                                                                                                                                                               |

10

20

30

40

【表 1 - 7】

|                    |     |      |                        |                                                                                     |                                                                   |
|--------------------|-----|------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| P-CL.Ubq1-1:1:9    | 91  | 2287 | <i>C. lacryma-jobi</i> | プロモーター                                                                              |                                                                   |
| I-CL.Ubq1-1:1:7    | 92  | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                               |                                                                   |
| EXP-CL.Ubq1-1:1:16 | 93  | 3393 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CL.Ubq1-1:1:9 (配列番号91); L-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-CL.Ubq1-1:1:6 (配列番号94)   | pMON146750,<br>pMON142748                                         |
| I-CL.Ubq1-1:1:6    | 94  | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                               |                                                                   |
| EXP-CL.Ubq1-1:1:11 | 95  | 2166 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CL.Ubq1-1:1:10 (配列番号96); L-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-CL.Ubq1-1:1:7 (配列番号92)  | pMON142730                                                        |
| P-CL.Ubq1-1:1:10   | 96  | 1060 | <i>C. lacryma-jobi</i> | プロモーター                                                                              |                                                                   |
| EXP-CL.Ubq1-1:1:17 | 97  | 2166 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CL.Ubq1-1:1:10 (配列番号96); L-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-CL.Ubq1-1:1:6 (配列番号94)  | pMON146751,<br>pMON142749                                         |
| EXP-CL.Ubq1-1:1:10 | 98  | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号80); L-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-CL.Ubq1-1:1:6 (配列番号94)   | pMON140889,<br>PCR0145922,<br>pMON140913,<br>PCR19,<br>pMON129221 |
| EXP-CL.Ubq1-1:1:18 | 99  | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P CL.Ubq1 1:1:1 (配列番号80); L CL.Ubq1 1:1:1 (配列番号81); I CL.Ubq1 1:1:7 (配列番号92)   | pMON146795                                                        |
| EXP-CL.Ubq1-1:1:19 | 100 | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P CL.Ubq1 1:1:1 (配列番号80); L-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I CL.Ubq1 1:1:8 (配列番号101)  | pMON146796                                                        |
| I CL.Ubq1 1:1:8    | 101 | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                               |                                                                   |
| EXP CL.Ubq1-1:1:20 | 102 | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P CL.Ubq1 1:1:1 (配列番号80); L-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-CL.Ubq1-1:1:9 (配列番号103)  | pMON146797                                                        |
| I CL.Ubq1 1:1:9    | 103 | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                               |                                                                   |
| EXP CL.Ubq1-1:1:21 | 104 | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号80); L-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-CL.Ubq1-1:1:10 (配列番号105) | pMON146798                                                        |
| I-CL.Ubq1-1:1:10   | 105 | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                               |                                                                   |
| EXP CL.Ubq1-1:1:22 | 106 | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号80); L-CL.Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-CL.Ubq1-1:1:11 (配列番号107) | pMON146799                                                        |
| I-CL.Ubq1-1:1:11   | 107 | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                               |                                                                   |

10

20

30

40

【表 1 - 8】

|                        |     |      |                        |                                                                                                |                                          |
|------------------------|-----|------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| EXP-Cl. Ubq1-1:1:23    | 108 | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号80); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:12 (配列番号109)         | pMON132047,<br>pMON146800                |
| I Cl. Ubq1 1:1:12      | 109 | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-Cl. Ubq1-1:1:24    | 110 | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号80); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:13 (配列番号111)         | pMON146801                               |
| I-Cl. Ubq1-1:1:13      | 111 | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP Cl. Ubq1-1:1:25    | 112 | 1943 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号80); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:14 (配列番号113)         | pMON146802                               |
| I-Cl. Ubq1-1:1:14      | 113 | 1020 | <i>C. lacryma-jobi</i> | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-Cl. Ubq1-1:1:13    | 114 | 1848 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:4 (配列番号84); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:6 (配列番号94)           | PCR0145945,<br>pMON140914,<br>PCR20      |
| EXP-Cl. Ubq1-1:1:14    | 115 | 1507 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P Cl. Ubq1 1:1:3 (配列番号86); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:6 (配列番号94)           | PCR0145946,<br>pMON140915,<br>PCR21      |
| EXP-Cl. Ubq1-1:1:15    | 116 | 1160 | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-Cl. Ubq1-1:1:5 (配列番号88); L-Cl. Ubq1-1:1:1 (配列番号81); I-Cl. Ubq1-1:1:6 (配列番号94)           | PCR0145947,<br>pMON140916,<br>PCR22      |
| EXP-SETit. Ubq1-1:1:5  | 117 | 2625 | <i>S. italica</i>      | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号70); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:2 (配列番号118) | pMON140877,<br>PCR0145900,<br>pMON129200 |
| I-SETit. Ubq1-1:1:2    | 118 | 1006 | <i>S. italica</i>      | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP SETit. Ubq1-1:1:10 | 119 | 2625 | <i>S. italica</i>      | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:4 (配列番号64); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1 1:1:3 (配列番号120) | pMON132037                               |
| I-SETit. Ubq1-1:1:3    | 120 | 1006 | <i>S. italica</i>      | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-SETit. Ubq1-1:1:12 | 121 | 2625 | <i>S. italica</i>      | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:4 (配列番号64); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:4 (配列番号122) |                                          |
| I SETit. Ubq1 1:1:4    | 122 | 1006 | <i>S. italica</i>      | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-SETit. Ubq1-1:1:7  | 123 | 2167 | <i>S. italica</i>      | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:2 (配列番号71); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:2 (配列番号118) | PCR0145928,<br>pMON129201                |

10

20

30

40

【表 1 - 9】

|                               |     |      |                                |                                                                                                |                                          |
|-------------------------------|-----|------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| EXP-SETit. Ubq1-1:6           | 124 | 1813 | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:3 (配列番号73); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:2 (配列番号118) | PCR0145905,<br>pMON129202                |
| EXP-SETit. Ubq1-1:11          | 125 | 1813 | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:3 (配列番号73); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:3 (配列番号120) | pMON131957                               |
| EXP-SETit. Ubq1-1:13          | 126 | 1813 | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:3 (配列番号73); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:5 (配列番号127) |                                          |
| I-SETit. Ubq1-1:1:5           | 127 | 1006 | <i>S. italica</i>              | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-Sv. Ubq1-1:7              | 128 | 2634 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:1 (配列番号34); L-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号129)          | pMON140878,<br>PCR0145909,<br>pMON129203 |
| I-Sv. Ubq1-1:1:2              | 129 | 1014 | <i>S. viridis</i>              | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-Sv. Ubq1-1:11             | 130 | 2634 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:1 (配列番号34); L-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:3 (配列番号131)          | pMON131958                               |
| I-Sv. Ubq1-1:1:3              | 131 | 1014 | <i>S. viridis</i>              | イントロン                                                                                          |                                          |
| EXP-Sv. Ubq1-1:8              | 132 | 2176 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号38); L-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号129)          | PCR0145929,<br>pMON129204                |
| EXP-Sv. Ubq1-1:9              | 133 | 1822 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:3 (配列番号40); L-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号129)          | pMON129205                               |
| EXP-Sv. Ubq1-1:10             | 134 | 1822 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:4 (配列番号135); L-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号129)         | PCR0145911                               |
| P Sv. Ubq1-1:1:4              | 135 | 681  | <i>S. viridis</i>              | プロモーター                                                                                         |                                          |
| EXP-Sv. Ubq1-1:12             | 136 | 1822 | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv. Ubq1-1:1:3 (配列番号40); L-Sv. Ubq1-1:1:2 (配列番号35); I-Sv. Ubq1-1:1:3 (配列番号131)          | pMON131959                               |
| EXP-Zm. UbqM1-1:6<br>(アレル-1)  | 137 | 1925 | <i>Z. mays subsp. Mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:1 (配列番号42); L-Zm. UbqM1-1:1:1 (配列番号43); I-Zm. UbqM1-1:1:13 (配列番号138)      | pMON140881,<br>PCR0145914,<br>pMON129210 |
| I-Zm. UbqM1-1:1:13<br>(アレル-1) | 138 | 997  | <i>Z. mays subsp. Mexicana</i> | イントロン                                                                                          |                                          |

10

20

30

40

【表 1 - 10】

|                                 |     |      |                                    |                                                                                           |                                                         |
|---------------------------------|-----|------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| EXP Zm. UbqM1-1:10<br>(アレル-1)   | 139 | 1925 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | EXP: P Zm. UbqM1 1:1:1 (配列番号42); L Zm. UbqM1 1:1:1 (配列番号43); I-Zm. UbqM1-1:1:17 (配列番号140) | pMON131961                                              |
| I-Zm. UbqM1-1:1:17<br>(アレル-1)   | 140 | 997  | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP-Zm. UbqM1-1:1:7<br>(アレル-2)  | 141 | 1974 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:4 (配列番号46); L Zm. UbqM1 1:1:5 (配列番号47); I-Zm. UbqM1-1:1:14 (配列番号142) | pMON140882,<br>PCR0145915,<br>pMON129212                |
| I Zm. UbqM1 1:1:14<br>(アレル-2)   | 142 | 1010 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP Zm. UbqM1-1:1:12<br>(アレル-2) | 143 | 1974 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | EXP: P Zm. UbqM1 1:1:4 (配列番号46); L Zm. UbqM1 1:1:5 (配列番号47); I-Zm. UbqM1-1:1:19 (配列番号144) | pMON131963                                              |
| I-Zm. UbqM1-1:1:19<br>(アレル-2)   | 144 | 1010 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP-Zm. UbqM1-1:1:8<br>(アレル-3)  | 145 | 2008 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:5 (配列番号50); L-Zm. UbqM1-1:1:4 (配列番号51); I-Zm. UbqM1-1:1:15 (配列番号146) | PCR0145916,<br>pMON129211                               |
| I-Zm. UbqM1-1:1:15<br>(アレル-3)   | 146 | 1053 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP-Zm. UbqM1-1:1:9<br>(アレル-3)  | 147 | 2008 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:5 (配列番号50); L-Zm. UbqM1-1:1:4 (配列番号51); I Zm. UbqM1 1:1:16 (配列番号148) |                                                         |
| I-Zm. UbqM1-1:1:16<br>(アレル-3)   | 148 | 1053 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP-Zm. UbqM1-1:1:11<br>(アレル-3) | 149 | 2008 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:5 (配列番号50); L-Zm. UbqM1-1:1:4 (配列番号51); I-Zm. UbqM1-1:1:18 (配列番号150) | pMON131962,<br>pMON132047                               |
| I Zm. UbqM1 1:1:18<br>(アレル-3)   | 150 | 1053 | <i>Z. mays subsp.<br/>Mexicana</i> | イントロン                                                                                     |                                                         |
| EXP-Sb. Ubq4-1:2                | 151 | 1635 | <i>S. bicolor</i>                  | EXP: P-Sb. Ubq4-1:1:1 (配列番号56); L-Sb. Ubq4-1:1:1 (配列番号57); I-Sb. Ubq4-1:1:2 (配列番号152)     | pMON140886,<br>PCR0145921,<br>pMON129219,<br>pMON132932 |

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

|                               |     |      |                                |                                                                                                |  |                                                         |
|-------------------------------|-----|------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------|
| I-Sb. Ubq4-1:1:2              | 152 | 1080 | <i>S. bicolor</i>              | イントロン                                                                                          |  | pMON140887,<br>PCR0145920,<br>pMON129218,<br>pMON132931 |
| EXP-Sb. Ubq6:1:2              | 153 | 2067 | <i>S. bicolor</i>              | EXP: P-Sb. Ubq6-1:1:1 (配列番号64); L-Sb. Ubq6-1:1:1 (配列番号57); I-Sb. Ubq6-1:1:2 (配列番号154)          |  |                                                         |
| I-Sb. Ubq6-1:1:2              | 154 | 1076 | <i>S. bicolor</i>              | イントロン                                                                                          |  |                                                         |
| EXP-Sb. Ubq6:1:3              | 155 | 2067 | <i>S. bicolor</i>              | EXP: P-Sb. Ubq6-1:1:1 (配列番号64); L-Sb. Ubq6-1:1:1 (配列番号57); I-Sb. Ubq6-1:1:3 (配列番号1569)         |  | pMON132931                                              |
| I-Sb. Ubq6-1:1:3              | 156 | 1076 | <i>S. bicolor</i>              | イントロン                                                                                          |  |                                                         |
| EXP-Sb. Ubq7:1:2              | 157 | 2003 | <i>S. bicolor</i>              | EXP: P-Sb. Ubq7-1:1:1 (配列番号66); L-Sb. Ubq7-1:1:1 (配列番号67); I-Sb. Ubq7-1:1:A (配列番号158)          |  | pMON132974                                              |
| I-Sb. Ubq7-1:1:2              | 158 | 1361 | <i>S. bicolor</i>              | イントロン                                                                                          |  |                                                         |
| EXP-SETit. Ubq1:1:1:E         | 180 | 2625 | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:4 (配列番号64); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:5 (配列番号127) |  |                                                         |
| EXP-Zm. UbqM1:1:13<br>(アレル-3) | 181 | 2008 | <i>Z. mays subsp. Mexicana</i> | EXP: P-Zm. UbqM1-1:1:5 (配列番号50); L-Zm. UbqM1-1:1:4 (配列番号51); I-Zm. UbqM1-1:1:20 (配列番号182)      |  |                                                         |
| I-Zm. UbqM1-1:1:20<br>(アレル-3) | 182 | 1053 | <i>Z. mays subsp. Mexicana</i> | イントロン                                                                                          |  |                                                         |
| EXP-SETit. Ubq1:1:9           | 183 | 2625 | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit. Ubq1-1:1:4 (配列番号64); L-SETit. Ubq1-1:1:1 (配列番号71); I-SETit. Ubq1-1:1:2 (配列番号118) |  |                                                         |

【0082】

表1に示すように、例えば、EXP-ANDge.Ubq1:1:9 (配列番号1) と呼ばれる転写調節EXP配列は、*A. gerardii* から単離された構成要素と共に、イントロン要素I-ANDge.Ubq1-1:1:3 (配列番号4) の5'側に作動的に連結されたリーダー要素L-ANDge.Ubq1-1:1:2 (配列番号3) の5'側に作動的に連結されたプロモーター要素P-ANDge.Ubq1-1:1:11 (配列番号2) を含む。表1に概説するように他のEXPも同様に連結されている。

【0083】

表1、配列表および図1～7に示すように、種 *A. gerardii*、*E. ravennae*、*Z. mays subsp. mexicana*、*S. bicolor*、*C. lacryma-jobi*、*S. italica*、および *S. viridis* からのプロ

10

20

30

40

50

モーター配列の変異体であって、例えばP-ANDge.Ubq1-1:1:11（配列番号2）、P-ERIRA.Ubq1-1:1:10（配列番号19）または他の種に由来する他の各プロモーターなどの、より短いプロモーターを含むものを工学的に作製することにより、P-ANDge.Ubq1-1:1:9（配列番号6）、P-ERIRA.Ubq1-1:1:9（配列番号23）、P-Cl.Ubq1-1:1:10（配列番号96）、P-SETit.Ubq1-1:1:2（配列番号76）およびP-Sv.Ubq1-1:1:2（配列番号38）、ならびに他のプロモーターフラグメントを得た。P-SETit.Ubq1-1:1:4（配列番号74）は、P-SETit.Ubq1-1:1:1（配列番号70）との比較で、単一のヌクレオチド変化を含む。同様に、P-Sv.Ubq1-1:1:3（配列番号40）は、P-Sv.Ubq1-1:1:4（配列番号135）との比較で、単一のヌクレオチド変化を含む。

#### 【0084】

いくつかの例では、3'イントロンスプライスジャンクションの配列5'-AG-3'に続く各々のイントロンの最後の3'ヌクレオチドを変化させることによって、特定イントロンの変異体を作成した。これらのイントロン変異体を下記表2に示す。

〔表2〕 イントロン変異体の3'端配列

#### 【表2】

| アノテーション                  | 配列番号 | 3' スプライス部位AG<br>直後のイントロン<br>3'端ヌクレオチド |
|--------------------------|------|---------------------------------------|
| I-Cl.Ubq1-1:1:7          | 92   | GTG                                   |
| I-Cl.Ubq1-1:1:6          | 94   | GTC                                   |
| I-Cl.Ubq1-1:1:8          | 101  | GCG                                   |
| I-Cl.Ubq1-1:1:9          | 103  | GAC                                   |
| I-Cl.Ubq1-1:1:10         | 105  | ACC                                   |
| I-Cl.Ubq1-1:1:11         | 107  | GGG                                   |
| I-Cl.Ubq1-1:1:12         | 109  | GGT                                   |
| I-Cl.Ubq1-1:1:13         | 111  | CGT                                   |
| I-Cl.Ubq1-1:1:14         | 113  | TGT                                   |
| I-SETit.Ubq1-1:1:2       | 118  | GTG                                   |
| I-SETit.Ubq1-1:1:3       | 120  | GGT                                   |
| I-SETit.Ubq1-1:1:4       | 122  | ACC                                   |
| I-SETit.Ubq1-1:1:5       | 127  | GGC                                   |
| I-Sv.Ubq1-1:1:2          | 129  | GTG                                   |
| I-Sv.Ubq1-1:1:3          | 131  | GGT                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:13（アレル-1） | 138  | GTC                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:17（アレル-1） | 140  | GGT                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:14（アレル-2） | 142  | GTC                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:19（アレル-2） | 144  | GGT                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:15（アレル-3） | 146  | GTC                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:18（アレル-3） | 148  | GGT                                   |
| I-Sb.Ubq6-1:1:2          | 154  | GTG                                   |
| I-Sb.Ubq6-1:1:3          | 156  | GGT                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:20（アレル-3） | 182  | CGG                                   |

#### 【0085】

*Z. mays* subsp. *mexicana*からのゲノムDNAの増幅用に設計した同じプライマーセットを使って単離された3つのアレル変異体も、表1に列挙する。EXP配列のアレル変異体は、他の配列のさまざまな領域内で、ある程度の同一性を共有する配列から構成されるが、挿入、欠失およびヌクレオチドミスマッチも、EXP配列のそれぞれの各プロモーター、リーダーおよび/またはイントロン内で、明白でありうる。EXP-Zm.UbqM1:1:1（配列番号41）と呼ばれるEXP配列は、*Z. mays* subsp. *mexicana* Ubq1遺伝子転写調節発現要素群の第1アレル（アレル-1）である。EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）およびEXP-Zm.UbqM1:1:10（配

10

20

30

40

50

列番号139)と呼ばれるEXP配列は、第1アレル(アレル-1)であって、これら2つのEXPの間の唯一の相違は、3'イントロンスプライスジャンクションの配列5'-AG-3'に続く各々のイントロンの最後の3'ヌクレオチドに存在する。EXP-Zm.UbqM1:1:4(配列番号45)と呼ばれるEXP配列は、Z. mays subsp. mexicana Ubq1遺伝子転写調節発現要素群の第2アレル(アレル-2)を表す。EXP-Zm.UbqM1:1:7(配列番号141)およびEXP-Zm.UbqM1:1:12(配列番号143)と呼ばれるEXP配列は、第2アレル(アレル-2)であって、これら2つのEXPの間の唯一の相違は、3'イントロンスプライスジャンクションの配列5'-AG-3'に続く各々のイントロンの最後の3'ヌクレオチドに存在する。EXP配列EXP-Zm.UbqM1:1:2(配列番号49)およびEXP-Zm.UbqM1:1:5(配列番号53)は、Z. mays subsp. mexicana Ubq1遺伝子転写調節発現要素群の第3アレル(アレル-3)を表し、それぞれのイントロン内の位置1034に単一のヌクレオチド相違を含む(I-Zm.UbqM1-1:1:11、配列番号52の場合はG、I-Zm.UbqM1-1:1:12、配列番号54の場合はT)。EXP-Zm.UbqM1:1:8(配列番号145)、EXP-Zm.UbqM1:1:9(配列番号147)、EXP-Zm.UbqM1:1:11(配列番号149)およびEXP-Zm.UbqM1:1:13(配列番号181)と呼ばれるEXP配列も、第3アレル(アレル-3)を表す。EXP-Zm.UbqM1:1:9のイントロンI-Zm.UbqM1-1:1:16(配列番号148)は、位置1034にチミン残基を含み、一方、EXP-Zm.UbqM1:1:8、EXP-Zm.UbqM1:1:11およびEXP-Zm.UbqM1:1:13のイントロン(I-Zm.UbqM1-1:1:15、配列番号146; I-Zm.UbqM1-1:1:18、配列番号11および; I-Zm.UbqM1-1:1:20、配列番号182)は、それぞれ位置1034にグアニン残基を含む。また、EXP-Zm.UbqM1:1:8(配列番号145)およびEXP-Zm.UbqM1:1:9(配列番号147)の最後の3つの3'端ヌクレオチドは、EXP-Zm.UbqM1:1:11(配列番号149)およびEXP-Zm.UbqM1:1:13(配列番号181)のものとは異なっている。

10

20

【0086】

#### 実施例2: トウモロコシプロトプラストにおけるGUSを駆動する調節要素の解析

トウモロコシ葉プロトプラストを、β-グルクロニダーゼ(GUS)導入遺伝子の発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクターで形質転換し、GUSの発現が既知の構成的プロモーターによって駆動される葉プロトプラストにおけるGUS発現と比較した。

【0087】

EXP-ANDge.Ubq1:1:7(配列番号5)、EXP-ANDge.Ubq1:1:6(配列番号12)、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9(配列番号22)またはEXP-ERIRA.Ubq1:1:8(配列番号27)によって駆動される導入遺伝子の発現を、既知の構成的プロモーターからの発現と比較した。前述のEXP配列を、下記表3に示すように植物発現ベクター中にクローニングすることで、EXP配列が、ジャガイモ光誘導性組織特異的ST-LS1遺伝子(GenBankアクセッション:X04753)に由来するプロセシング可能なイントロンを含有するβ-グルクロニダーゼ(GUS)レポーター(GUS-2という、配列番号160)または連続的GUSコード配列(GUS-1、配列番号159)の5'側に作動的に連結されており、それが、A. tumefaciensノバリンシンターゼ遺伝子(T-AGRtu.no s-1:1:13、配列番号161)またはコムギHsp17遺伝子(T-Ta.Hsp17-1:1:1、配列番号162)由来の3'UTRの5'側に作動的に連結されているベクターを得た。

30

[表3] トウモロコシ葉プロトプラストの形質転換に使用したGUS植物発現プラスミドコンストラクトおよび対応するEXP配列、GUSコード配列および3'UTR。「配列番号」は与えられたEXP配列を指す。

40

【表 3】

| プラスミド      | EXP配列                                    | 配列<br>番号 | GUS   | 3' UTR             |
|------------|------------------------------------------|----------|-------|--------------------|
| pMON19469  | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1         | 170      | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON65328  | EXP-CaMV.35S<br>enh+Ta.Lhcb1-Os.Act1:1:1 | 163      | GUS-2 | T-Ta.Hsp17-1:1:1   |
| pMON25455  | EXP-Os.Act1:1:9                          | 179      | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON122605 | EXP-Os.TubA-3:1:1                        | 165      | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON136264 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                       | 5        | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON136259 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                       | 12       | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON136263 | EXP-ER1ra.Ubq1:1:9                       | 22       | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON136258 | EXP-ER1ra.Ubq1:1:8                       | 27       | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |

10

## 【0088】

比較のために使用した対照プラスミド（pMON19469、pMON65328、pMON25455およびpMON122605）は上述のように構築したものであり、GUSコード配列および3'UTRの5'側に作動的に連結された既知のEXP配列：EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）、EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）、EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）、またはEXP-Os.TubA-3:1:1（配列番号165）を、それぞれ含有する。バックグラウンドGUSおよびルシフェラーゼ発現を評価するために、さらに3つの対照を用意した：DNAなしの対照、導入遺伝子発現用に設計されていない空ベクター、および緑色蛍光タンパク質（GFP）を

20

## 【0089】

同時形質転換とデータの標準化に使用した2つのプラスミドも、当技術分野において知られている方法を使って構築した。各プラスミドは、構成的EXP配列によって駆動される特異的ルシフェラーゼコード配列を含有していた。植物ベクターpMON19437は、*Agrobacterium tumefaciens*ノパリンシンターゼ遺伝子由来の3'UTR（T-AGRtu.nos-1:1:13、配列番号161）の5'側に作動的に連結されたホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェラーゼコード配列（LUCIFERASE:1:3、配列番号166）の5'側に作動的に連結されたイントロン（EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1、配列番号170）の5'側に作動的に連結された構成的プロモーターを有する導入遺伝子カセットを含む。植物ベクターpMON63934は、*Agrobacterium tumefaciens*ノパリンシンターゼ遺伝子由来の3'UTR（T-AGRtu.nos-1:1:13、配列番号161）の5'側に作動的に連結されたウミシイタケ（*Renilla reniformis*）ルシフェラーゼコード配列（CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1、配列番号167）の5'側に作動的に連結された構成的EXP配列（EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1、配列番号168）を有する導入遺伝子カセットを含む。

30

## 【0090】

トウモロコシ葉プロトプラストは、当技術分野においてよく知られているように、PEGに基づく形質転換方法を使って形質転換した。プロトプラスト細胞を、pMON19437プラスミドDNA、pMON63934プラスミドDNA、および等モル量の、表3に提示するプラスミドの一つで形質転換し、完全遮光下で一晩インキュベートした。上述のように形質転換した細胞の溶解調製物のアリコート、2つの異なる小ウェルトレイに入れることによって、GUSとルシフェラーゼの両方の測定を行った。一方のトレイはGUS測定に使用し、もう一つのトレイは、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム（Promega Corp.、ウィスコンシン州マディソン；例えばPromega Notes Magazine, No:57, 1996, p.02を参照された）を使ってデュアルルシフェラーゼアッセイを行うために使用した。各EXP配列について1回または2回の形質転換を行い、各EXP配列についての平均発現値を、各形質転換実験のいくつかの試料から決定した。試料測定は、各EXP配列コンストラクト形質転換の4つの複製物を使って行うか、あるいは、2回の形質転換実験の1回につき、各EXP配列コンストラクトの3つの複製物を使って行った。平均GUS発現レベルおよびルシフェラーゼ発現レベルを表4に記載する。この表では、ホタルルシフェラーゼ値（例えばpMON19437の発現によるもの）を、「FLuc」と表示した列に記載し、*Renilla*ルシフェラーゼ値を、「RLuc」と

40

50

表示した列に記載する。

〔表4〕形質転換されたトウモロコシ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

【表4】

| プラスミド      | EXP配列                                 | 配列番号 | Gus     | RLuc   | FLuc  |
|------------|---------------------------------------|------|---------|--------|-------|
| pMON19469  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1          | 170  | 789147  | 298899 | 36568 |
| pMON65328  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163  | 508327  | 158227 | 17193 |
| pMON25455  | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179  | 460579  | 183955 | 53813 |
| pMON122605 | EXP-Os.TubA-3:1:1                     | 165  | 25082   | 25821  | 21004 |
| pMON136264 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                    | 5    | 926083  | 101213 | 23704 |
| pMON136259 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                    | 12   | 845274  | 193153 | 51479 |
| pMON136263 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:9                    | 22   | 901985  | 132765 | 41313 |
| pMON136258 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8                    | 27   | 1011447 | 210635 | 66803 |

10

【0091】

各EXP配列の相対的活性を比較するために、GUS値をルシフェラーゼ活性に対するGUSの比として表し、EXP配列EXP-Os.TubA-3:1:1（配列番号165）について観察された発現レベルに対して標準化した。下記表5に、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.TubA-3:1:1発現に対して標準化したGUS/RLuc発現比を示す。

20

【0092】

表5からわかるように、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）またはEXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）によって駆動されるGUS発現は、EXP-Os.TubA-3:1:1（配列番号165）によって駆動されるGUS発現より4.51～9.42倍高かった。また、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）またはEXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）によって駆動されるGUS発現は、EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）、EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）、またはEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）によるものよりも高かった。

〔表5〕トウモロコシ葉プロトプラスト細胞におけるEXP-Os.TubA-3:1:1発現と比較したGUS/RLuc発現倍率

30

【表5】

| プラスミド      | EXP配列                                 | 配列番号 | Gus/RLuc | EXP-Os.TubA-3:1:1<br>に対して標準化<br>したGus/RLuc |
|------------|---------------------------------------|------|----------|--------------------------------------------|
| pMON19469  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1          | 170  | 2.640000 | 2.72                                       |
| pMON65328  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163  | 3.210000 | 3.31                                       |
| pMON25455  | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179  | 2.500000 | 2.57                                       |
| pMON122605 | EXP-Os.TubA-3:1:1                     | 165  | 0.971000 | 1.00                                       |
| pMON136264 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                    | 5    | 9.150000 | 9.42                                       |
| pMON136259 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                    | 12   | 4.380000 | 4.51                                       |
| pMON136263 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:9                    | 22   | 6.790000 | 6.99                                       |
| pMON136258 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8                    | 27   | 4.800000 | 4.94                                       |

40

【0093】

下記表6に、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.TubA-3:1:1発現に対して標準化したGUS/FLuc発現比を示す。

〔表6〕トウモロコシ葉プロトプラスト細胞におけるEXP-Os.TubA-3:1:1発現に対するGUS/FLuc発現倍率

【表 6】

| プラスミド      | EXP配列                                     | 配列<br>番号 | Gus/FLuc  | EXP-Os.TubA-<br>3:1:1に対して<br>標準化 |
|------------|-------------------------------------------|----------|-----------|----------------------------------|
| pMON19469  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1              | 170      | 21.600000 | 18.15                            |
| pMON65328  | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163      | 29.600000 | 24.87                            |
| pMON25455  | EXP-Os.Act1:1:9                           | 179      | 8.560000  | 7.19                             |
| pMON122605 | EXP-Os.TubA 3:1:1                         | 165      | 1.190000  | 1.00                             |
| pMON136264 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                        | 5        | 39.100000 | 32.86                            |
| pMON136259 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                        | 12       | 16.400000 | 13.78                            |
| pMON136263 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:9                        | 22       | 21.800000 | 18.32                            |
| pMON136258 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8                        | 27       | 15.100000 | 12.69                            |

10

## 【0094】

表6からわかるように、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）またはEXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）によって駆動されるGUS発現は、GUS/FLuc比の値として表現し、EXP-Os.TubA-3:1:1（配列番号165）に対して標準化した場合に、同じ一般的傾向を示した。発現は、EXP-Os.TubA-3:1:1（配列番号165）によって駆動されるGUS発現より12.69～32.86倍高かった。また、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）またはEXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）によって駆動されるGUS発現は、一定の比較では、EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）、EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）、またはEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）によるものよりも高かった。

20

## 【0095】

実施例3：GUS導入遺伝子カセットアンプリコンを使ったトウモロコシプロトプラストにおけるGUSを駆動する調節要素の解析

以下に提示する一連の実験では、トウモロコシ葉プロトプラストを、 $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）導入遺伝子の発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクターに由来するDNAアンプリコンで形質転換し、それを、GUSの発現が既知の構成的プロモーターによって駆動される葉プロトプラストと比較した。

30

## 【0096】

1組目の実験では、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）、EXP-SETit.Ubq1:1:7（配列番号123）、EXP-SETit.Ubq1:1:6（配列番号124）、EXP-Sv.Ubq1:1:7（配列番号128）、EXP-Sv.Ubq1:1:8（配列番号132）、EXP-Sv.Ubq1:1:10（配列番号134）、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）、EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）、EXP-Sb.Ubq6:1:2（配列番号153）およびEXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）の一つによって駆動される導入遺伝子（GUS）の発現を既知の構成的プロモーターによるものと比較するために、葉組織由来のトウモロコシプロトプラスト細胞を、上記のように、植物発現ベクターを構成するGUS導入遺伝子カセットの増幅によって生じるアンプリコンで形質転換した。導入遺伝子カセットアンプリコンを生成する元になる増幅テンプレートを構成する各EXP配列は、当技術分野において知られている方法を使って、下記表7の「アンプリコンテンプレート」という見出しの下に示す植物発現ベクター中にクローニングした。その結果得られた植物発現ベクターは、やはり上記のように、3'UTR T-AGRtu.nos-1:1:13またはT-Ta.Hsp17-1:1:1の5'側に作動的に連結されたプロセッシング可能なイントロンを含有する $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）のコード配列（上記実施例2で述べた「GUS-2」）または連続的GUSコード配列（上述の「GUS-1」）の5'側に作動的に

40

50

連結されたEXP配列から構成される導入遺伝子カセットを含む。アンプリコンは、当業者に知られている方法を使用し、下記表7に提示するプラスミドコンストラクトテンプレートをを使って作製した。簡単に述べると、5'オリゴヌクレオチドプライマーはプロモーター配列にアニールするように設計し、各導入遺伝子カセットの増幅には、3'UTRの3'端においてアニールする3'オリゴヌクレオチドプライマーを使用した。各アンプリコンテンプレートを構成するプロモーター配列内の異なる位置においてアニールするように設計された異なるオリゴヌクレオチドプライマーを利用して、導入遺伝子カセットを構成するプロモーター配列に逐次の5'欠失を導入することにより、異なるEXP配列を生じさせた。

〔表7〕 トウモロコシ葉プロトプラストの形質転換に使用したGUS植物発現アンプリコンならびに対応するプラスミドコンストラクトアンプリコンテンプレート、EXP配列、GUSコード配列および3'UTR

【表 7-1】

| アンプリコン ID  | アンプリコン テンプレート | EXP配列                                         | 配列 番号 | GUS コード 配列 | 3' UTR                     |
|------------|---------------|-----------------------------------------------|-------|------------|----------------------------|
| PCR0145942 | pMON25455     | EXP-0s. Act1:1:9                              | 179   | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145941 | pMON33449     | P-CAMV. 35S-ENH-<br>1:1:102/L-CAMV. 35S-1:1:2 | 169   | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145943 | pMON65328     | EXP-CaMV. 35S-<br>enh-Ta. Lhebl+0s. Act1:1:1  | 163   | GUS-2      | T-<br>Ta. Hspi7-<br>1:1:1  |
| PCR0145944 | pMON81552     | EXP-CaMV. 35S-<br>enh-Zm. DnaK:1:1            | 170   | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145892 | pMON136264    | EXP-ANDge. Ubq1:1:7                           | 5     | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos<br>1:1:13  |
| PCR0145815 | pMON136264    | EXP ANDge. Ubq1:1:10                          | 10    | GUS 1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145893 | pMON136259    | EXP-ANDge. Ubq1:1:6                           | 12    | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145817 | pMON136264    | EXP-ANDge. Ubq1:1:11                          | 14    | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145819 | pMON136264    | EXP-ANDge. Ubq1:1:12                          | 16    | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145896 | pMON136263    | EXP-ERIRA. Ubq1:1:9                           | 22    | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145820 | pMON136263    | EXP-ERIRA. Ubq1:1:10                          | 25    | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145897 | pMON136258    | EXP ERIRA. Ubq1:1:8                           | 27    | GUS 1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145821 | pMON136263    | EXP-ERIRA. Ubq1:1:11                          | 29    | GUS-1      | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |

10

20

30

40

【表 7 - 2】

|            |            |                       |     |       |                             |
|------------|------------|-----------------------|-----|-------|-----------------------------|
| PCR0145822 | pMON136263 | EXP-ERITra. Ubq1:1:12 | 31  | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145900 | pMON140877 | EXP-SETit. Ubq1:1:5   | 117 | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145928 | pMON140877 | EXP-SETit. Ubq1:1:7   | 123 | GUS-1 | T<br>AGRtu. nos<br>1:1:13   |
| PCR0145905 | pMON140877 | EXP-SETit. Ubq1:1:6   | 124 | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145909 | pMON140878 | EXP-Sv. Ubq1:1:7      | 128 | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145929 | pMON140878 | EXP-Sv. Ubq1:1:8      | 132 | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145911 | pMON140878 | EXP-Sv. Ubq1:1:10     | 134 | GUS-1 | T<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13  |
| PCR0145914 | pMON140881 | EXP-Zm. UbqM1:1:6     | 137 | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145915 | pMON140882 | EXP-Zm. UbqM1:1:7     | 141 | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145921 | pMON140886 | EXP-Sb. Ubq4:1:2      | 151 | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos<br>1:1:13  |
| PCR0145920 | pMON140887 | EXP-Sb. Ubq6:1:2      | 153 | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos<br>1:1:13  |
| PCR0145922 | pMON140889 | EXP-Cl. Ubq1:1:10     | 98  | GUS-1 | T-<br>AGRtu. nos-<br>1:1:13 |

10

20

30

## 【0097】

表7にアンプリコンテンプレートとして列挙したプラスミドコンストラクトを、表7に列挙したEXP配列を含む導入遺伝子発現カセットを増幅するためのテンプレートとした。比較用のGUS導入遺伝子アンプリコンを生成させるために使用した対照プラスミドは、実施例2で述べた既知の構成的EXP配列を使って、既述のように構築した。GUSおよびルシフェラーゼバックグラウンドを決定するための陰性対照、DNAなしの対照、およびコード配列を発現しないプラスミドと一緒に2つのルシフェラーゼプラスミドを形質転換に使用する対照試料も使用した。実施例2で述べたプラスミドpMON19437およびpMON63934も、同時形質転換とデータの標準化のために使用した。

## 【0098】

上記実施例2で述べたようにPEGに基づく形質転換法を使ってトウモロコシ葉プロトプラストを形質転換した。下記表8に、各導入遺伝子カセットについて決定された平均GUSおよびルシフェラーゼ発現値を示す。

〔表8〕形質転換されたトウモロコシ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

40

【表 8】

| EXP配列                                   | 配列<br>番号 | GUS     | RLuc     | FLuc   |
|-----------------------------------------|----------|---------|----------|--------|
| EXP-Os.Act1:1:9                         | 179      | 1540.3  | 105416.8 | 2671.8 |
| P-CAMV.35S-ENH-1:1:102/L-CAMV.35S-1:1:2 | 169      | 10426.3 | 344088.6 | 8604.1 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1   | 163      | 12530.8 | 137722.6 | 3067.1 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1            | 170      | 61036.1 | 208125.3 | 5787.6 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                      | 5        | 59447.4 | 84667.6  | 2578.4 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                     | 10       | 40123.3 | 76753.8  | 2419.8 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                      | 12       | 42621.0 | 121751.3 | 3974.8 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                     | 14       | 44358.5 | 87105.8  | 2687.1 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                     | 16       | 48219.0 | 107762.1 | 3279.6 |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:9                      | 22       | 31253.0 | 171684.1 | 6476.1 |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:10                     | 25       | 7905.8  | 21235.6  | 462.4  |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:8                      | 27       | 39935.8 | 173766.6 | 5320.3 |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:11                     | 29       | 34141.3 | 111626.8 | 3377.6 |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:12                     | 31       | 11540.3 | 42362.1  | 1045.3 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                      | 117      | 20496.5 | 88695.8  | 2358.8 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                      | 123      | 75728.5 | 185223.8 | 4723.1 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                      | 124      | 44148.3 | 161216.3 | 4962.1 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:7                         | 128      | 15043.8 | 74670.6  | 1888.3 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8                         | 132      | 31997.8 | 113787.1 | 3219.8 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:10                        | 134      | 38952.8 | 220208.6 | 7011.3 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6                        | 137      | 30528.3 | 90113.1  | 2453.6 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7                        | 141      | 34986.3 | 105724.7 | 2553.8 |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2                         | 151      | 9982.3  | 72593.8  | 2171.6 |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2                         | 153      | 33689.0 | 114709.6 | 3879.6 |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10                        | 98       | 50622.3 | 107084.3 | 2621.3 |

【0099】

各EXP配列の相対的活性を比較するために、GUS値をルシフェラーゼ活性に対するGUSの比として表し、EXP-Os.Act1:1:1およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1について観察された発現レベルに対して標準化した。下記表9には、トウモロコシプロトプラストにおいてEXP-Os.Act1:1:1およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1が駆動する発現に対して標準化したGUS/RLuc発現比を示す。下記表10には、トウモロコシプロトプラスト

においてEXP-Os.Act1:1:1およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1が駆動する発現に対して標準化したGUS/FLuc発現比を示す。

〔表9〕トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）に対して標準化したGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比

【表 9】

| EXP配列                                         | 配列<br>番号 | EXP-CaMV. 35S-<br>enh+Ta. Lhcb1+Os. Act1:1:1<br>と比較したGUS/RLuc | EXP-CaMV. 35S-<br>enh+Ta. Lhcb1+Os. Act1:1:1<br>と比較したGUS/FLuc |
|-----------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| EXP-Os. Act1:1:9                              | 179      | 0.16                                                          | 0.14                                                          |
| P-CaMV. 35S-ENH-<br>1:1:102/L-CaMV. 35S-1:1:2 | 169      | 0.33                                                          | 0.30                                                          |
| EXP-CaMV. 35S-<br>enh+Ta. Lhcb1+Os. Act1:1:1  | 163      | 1.00                                                          | 1.00                                                          |
| EXP-CaMV. 35S-<br>enh+Zm. DnaK:1:1            | 170      | 3.22                                                          | 2.58                                                          |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:7                           | 5        | 7.72                                                          | 5.64                                                          |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:10                          | 10       | 5.75                                                          | 4.06                                                          |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:6                           | 12       | 3.85                                                          | 2.62                                                          |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:11                          | 14       | 5.60                                                          | 4.04                                                          |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:12                          | 16       | 4.92                                                          | 3.60                                                          |
| EXP-ERlra. Ubq1:1:9                           | 22       | 2.00                                                          | 1.18                                                          |
| EXP-ERlra. Ubq1:1:10                          | 25       | 4.09                                                          | 4.18                                                          |
| EXP-ERlra. Ubq1:1:8                           | 27       | 2.53                                                          | 1.84                                                          |
| EXP-ERlra. Ubq1:1:11                          | 29       | 3.36                                                          | 2.47                                                          |
| EXP-ERlra. Ubq1:1:12                          | 31       | 2.99                                                          | 2.70                                                          |
| EXP-SETit. Ubq1:1:5                           | 117      | 2.54                                                          | 2.13                                                          |
| EXP-SETit. Ubq1:1:7                           | 123      | 4.49                                                          | 3.92                                                          |
| EXP-SETit. Ubq1:1:6                           | 124      | 3.01                                                          | 2.18                                                          |
| EXP-Sv. Ubq1:1:7                              | 128      | 2.21                                                          | 1.95                                                          |
| EXP-Sv. Ubq1:1:8                              | 132      | 3.09                                                          | 2.43                                                          |
| EXP-Sv. Ubq1:1:10                             | 134      | 1.94                                                          | 1.36                                                          |
| EXP-Zm. UbqM1:1:6                             | 137      | 3.72                                                          | 3.05                                                          |
| EXP-Zm. UbqM1:1:7                             | 141      | 3.64                                                          | 3.35                                                          |
| EXP-Sb. Ubq4:1:2                              | 151      | 1.51                                                          | 1.13                                                          |
| EXP-Sb. Ubq6:1:2                              | 153      | 3.23                                                          | 2.13                                                          |
| EXP Cl. Ubq1:1:10                             | 98       | 5.20                                                          | 4.73                                                          |

〔表10〕 トウモロコシ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）に対し  
て標準化したGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比

10

20

【表 10】

| EXP配列                                       | 配列<br>番号 | EXP-Os.Act1:1:9と<br>比較したGUS/RLuc | EXP-Os.Act1:1:9と<br>比較したGUS/FLuc |
|---------------------------------------------|----------|----------------------------------|----------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9                             | 179      | 1.00                             | 1.00                             |
| P-CaMV.35S-ENH-1:1:102/L-<br>CaMV.35S 1:1:2 | 169      | 2.07                             | 2.10                             |
| EXP-CaMV.35S<br>enh-Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1    | 163      | 6.23                             | 7.09                             |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1                | 170      | 20.07                            | 18.29                            |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                          | 5        | 48.05                            | 39.99                            |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                         | 10       | 35.78                            | 28.76                            |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                          | 12       | 23.96                            | 18.60                            |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                         | 14       | 34.85                            | 28.64                            |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                         | 16       | 30.62                            | 25.50                            |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:9                          | 22       | 12.46                            | 8.37                             |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:10                         | 25       | 25.48                            | 29.66                            |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:8                          | 27       | 15.73                            | 13.02                            |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:11                         | 29       | 20.93                            | 17.53                            |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:12                         | 31       | 18.64                            | 19.15                            |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                          | 117      | 15.82                            | 15.07                            |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                          | 123      | 27.98                            | 27.81                            |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                          | 124      | 18.74                            | 15.43                            |
| EXP-Sv.Ubq1:1:7                             | 128      | 13.79                            | 13.82                            |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8                             | 132      | 19.25                            | 17.24                            |
| EXP-Sv.Ubq1:1:10                            | 134      | 12.11                            | 9.64                             |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6                            | 137      | 23.19                            | 21.58                            |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7                            | 141      | 22.65                            | 23.76                            |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2                             | 151      | 9.41                             | 7.97                             |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2                             | 153      | 20.10                            | 15.06                            |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10                            | 98       | 32.35                            | 33.50                            |

## 【0100】

表9および表10からわかるように、ほぼ全てのEXP配列が、トウモロコシ細胞においてGUS導入遺伝子発現を駆動する能力を有していた。平均GUS発現は、EXP-Os.Act1:1:1またはEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1によって駆動されるGUS発現と比較すると、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）、EXP-SETit.Ubq1:1:7（配列番号123）、EXP-SETit.Ubq1:1:6（配列番号124）、EXP-Sv.Ubq1:1:7（配列番号128）、EXP-Sv.Ubq1:1:8（配列番号132）、EXP-Sv.Ubq1:1:10（配列番号134）、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）、EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）、EXP-Sb.Ubq6:1:2（配列番号153）およびEXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）の方が高かった。

## 【0101】

2組目の実験では、EXP配列EXP-Zm.UbqM1:1:8（配列番号145）を含むGUSカセットアンプリコンを、対照アンプリコンPCR0145942（EXP-Os.Act1:1:9、配列番号179）およびPCR0145944（EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1、配列番号170）と、GUS発現に関して比較した。EXP配列EXP-Zm.UbqM1:1:8によって駆動されるGUS発現の方が、これら2つの対照より高かった。下記表11には、各アンプリコンについて決定された平均GUSおよびルシフェラーゼ値を示す。下記表12には、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1駆動発現に対して標準化したGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比を示す。

〔表11〕 形質転換されたトウモロコシ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

【表 1 1】

| アンプリコン     | EXP配列                        | 配列<br>番号 | GUS     | RLuc   | FLuc    |
|------------|------------------------------|----------|---------|--------|---------|
| PCR0145942 | EXP Os.Act1:1:9              | 179      | 1512.25 | 190461 | 11333.8 |
| PCR0145944 | EXP CaMV.35S enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 41176.5 | 330837 | 13885.8 |
| PCR0145916 | EXP-Zm.UbqM1:1:8             | 145      | 79581.5 | 330756 | 15262.5 |

〔表12〕 トウモロコシ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）に対して標準化したGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比

【表 1 2】

| EXP配列                           | 配列<br>番号 | EXP-Os.Act1:1:9<br>と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-Os.Act1:1:9<br>と比較した<br>GUS/FLuc | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1<br>と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1<br>と比較した<br>GUS/FLuc |
|---------------------------------|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9                 | 179      | 1.00                                 | 1.00                                 | 0.06                                                  | 0.04                                                  |
| EXP CaMV.35S<br>enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 15.68                                | 22.22                                | 1.00                                                  | 1.00                                                  |
| EXP-Zm.UbqM1:1:8                | 145      | 30.30                                | 39.08                                | 1.93                                                  | 1.76                                                  |

【0 1 0 2】

3組目の実験では、アンプリコンGUS導入遺伝子カセットを上述のように作り、EXP配列、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）によって駆動される発現についてアッセイした。アンプリコンは、T-AGRtu.nos-1:1:13 3'UTRに作動的に連結されたGUS-1コード配列に作動的に連結されたEXP配列から構成された。発現を、対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）と比較した。下記表13には、各アンプリコンについて決定された平均GUSおよびルシフェラーゼ値を示す。下記表14には、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1駆動発現に対して標準化したGUS/RLuc発現比を示す。

〔表13〕 形質転換されたトウモロコシ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

【表 1 3】

| アンプリコン<br>ID | EXP配列                        | 配列<br>番号 | GUS       | RLuc   |
|--------------|------------------------------|----------|-----------|--------|
| PCR0145942   | EXP-Os.Act1:1:9              | 179      | 9445.25   | 929755 |
| PCR0145944   | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 78591.25  | 445127 |
| PCR0146628   | EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8        | 192056.75 | 972642 |
| PCR0145922   | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98       | 175295.25 | 395563 |
| PCR0145945   | EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114      | 173674.5  | 402966 |
| PCR0145946   | EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115      | 185987.5  | 390052 |
| PCR0145947   | EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116      | 9435      | 320749 |

〔表14〕 トウモロコシ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）に対して標準化されたGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比

10

20

30

40

【表 1 4】

| EXP配列                        | 配列<br>番号 | EXP-Os.Act1:1:9<br>と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1<br>と比較した<br>GUS/RLuc |
|------------------------------|----------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9              | 179      | 1.00                                 | 0.06                                                  |
| EXP-CaMV.35S-enh-Zm.DnaK:1:1 | 170      | 17.38                                | 1.00                                                  |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8        | 19.44                                | 1.12                                                  |
| EXP-C1.Ubq1:1:10             | 98       | 43.62                                | 2.51                                                  |
| EXP-C1.Ubq1:1:13             | 114      | 42.43                                | 2.44                                                  |
| EXP-C1.Ubq1:1:14             | 115      | 46.94                                | 2.70                                                  |
| EXP-C1.Ubq1:1:15             | 116      | 2.90                                 | 0.17                                                  |

## 【0 1 0 3】

上記表14からわかるように、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-C1.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-C1.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-C1.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-C1.Ubq1:1:15（配列番号116）は、導入遺伝子発現を駆動する能力を有する。EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-C1.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-C1.Ubq1:1:13（配列番号114）およびEXP-C1.Ubq1:1:14（配列番号115）によって駆動される発現は、どちらの対照よりも高かった。EXP-C1.Ubq1:1:15（配列番号116）によって駆動される発現は、EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）よりは低かったが、対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）よりは高かった。

## 【0 1 0 4】

4組目の実験では、アンプリコンGUS導入遺伝子カセットを上述のように作り、EXP配列、EXP-C1.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-C1.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-C1.Ubq1:1:17（配列番号97）が駆動する発現についてアッセイした。発現を、対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）と比較した。下記表15には、各アンプリコンについて決定した平均GUSおよびルシフェラーゼ値を示す。下記表16には、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1駆動発現に対して標準化されたGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比を示す。

〔表15〕形質転換されたトウモロコシ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

【表 1 5】

| アンプリコン<br>ID | EXP配列                            | 配列<br>番号 | GUS       | RLuc      | FLuc     |
|--------------|----------------------------------|----------|-----------|-----------|----------|
| PCR0145942   | EXP-Os.Act1:1:9                  | 179      | 5333.5    | 171941.75 | 77817.88 |
| PCR0145944   | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 88517     | 177260.25 | 54207.38 |
| PCR0145922   | EXP-C1.Ubq1:1:10                 | 98       | 130125.75 | 194216    | 32055    |
| pMON146750   | EXP-C1.Ubq1:1:16                 | 93       | 134101.75 | 182317.5  | 32434.5  |
| pMON146751   | EXP-C1.Ubq1:1:17                 | 97       | 107122.5  | 151783.25 | 51354.38 |

〔表16〕トウモロコシ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）に対して標準化されたGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比

【表 16】

| アンプリコン ID  | EXP配列                          | 配列番号 | EXP-Os. Act1:1:9と比較したGUS/RLuc | EXP-Os. Act1:1:9と比較したGUS/FLuc | EXP-CaMV. 35S-enh+Zm. DnaK:1:1と比較したGUS/RLuc | EXP-CaMV. 35S-enh+Zm. DnaK:1:1と比較したGUS/FLuc |
|------------|--------------------------------|------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| PCR0145942 | EXP-Os. Act1:1:9               | 179  | 1.00                          | 1.00                          | 0.06                                        | 0.04                                        |
| PCR0145944 | EXP-CaMV. 35S-enh+Zm. DnaK:1:1 | 170  | 16.10                         | 23.83                         | 1.00                                        | 1.00                                        |
| PCR0145922 | EXP-Cl. Ubq1:1:10              | 98   | 21.60                         | 59.23                         | 1.34                                        | 2.49                                        |
| pMON146750 | EXP-Cl. Ubq1:1:16              | 93   | 23.71                         | 60.32                         | 1.47                                        | 2.53                                        |
| pMON146751 | EXP-Cl. Ubq1:1:17              | 97   | 22.75                         | 30.43                         | 1.41                                        | 1.28                                        |

## 【0105】

10

表16からわかるように、EXP配列EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）は、導入遺伝子発現を駆動することができた。EXP配列のそれぞれによって駆動される発現は、どちらの対照のものよりも高かった。

## 【0106】

5組目の実験では、EXP配列、EXP-Zm.UbqM1:1:11（配列番号149）およびEXP-Cl.Ubq1:1:23（配列番号108）によって駆動される発現をアッセイするために、アンプリコンGUS導入遺伝子カセットを上述のように作った。発現を、対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）と比較した。下記表17には、各アンプリコンについて決定した平均GUSおよびルシフェラーゼ値を示す。下記表18には、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1駆動発現に対して標準化されたGUS/RLuc発現比を示す。

20

〔表17〕 形質転換されたトウモロコシ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

## 【表 17】

| テンプレート     | アンプリコン     | EXP配列                                    | 配列番号 | GUS      | RLuc     |
|------------|------------|------------------------------------------|------|----------|----------|
| pMON65328  | PCR0145943 | EXP-CaMV. 35S-enh+Ta. Lhcb1+Os. Act1:1:1 | 163  | 70352.00 | 79028.75 |
| pMON25455  | PCR0145942 | EXP-Os. Act1:1:9                         | 179  | 33155.25 | 92337.00 |
| pMON131962 | pMON131962 | EXP-Zm. UbqM1:1:11                       | 149  | 18814.75 | 33663.00 |
| pMON132047 | pMON132047 | EXP-Cl. Ubq1:1:23                        | 108  | 15387.50 | 40995.50 |

30

〔表18〕 トウモロコシ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）に対して標準化されたGUS/RLuc発現比

## 【表 18】

| アンプリコン     | EXP配列                                    | 配列番号 | EXP-Os. Act1:1:9と比較したGUS/RLuc | EXP-CaMV. 35S-enh+Ta. Lhcb1+Os. Act1:1:1と比較したGUS/RLuc |
|------------|------------------------------------------|------|-------------------------------|-------------------------------------------------------|
| PCR0145943 | EXP-CaMV. 35S-enh+Ta. Lhcb1+Os. Act1:1:1 | 163  | 2.48                          | 1.00                                                  |
| PCR0145942 | EXP-Os. Act1:1:9                         | 179  | 1.00                          | 0.40                                                  |
| pMON131962 | EXP-Zm. UbqM1:1:11                       | 149  | 1.56                          | 0.63                                                  |
| pMON132047 | EXP-Cl. Ubq1:1:23                        | 108  | 1.05                          | 0.42                                                  |

40

## 【0107】

上記表18からわかるように、EXP配列、EXP-Zm.UbqM1:1:11（配列番号149）およびEXP-Cl.Ubq1:1:23（配列番号108）は、トウモロコシ葉プロトプラストにおいてGUS発現を駆動することができた。発現は、対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）の発現と似ており、EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）の発現よりは低かった。

## 【0108】

アンプリコンからのGUS発現を駆動する調節要素の効力はサトウキビ葉プロトプラスト

50

でも同様に研究することができる。例えばサトウキビプロトプラストを、 $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）導入遺伝子の発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクターに由来するDNAアンプリコンで形質転換し、GUSの発現が既知の構成的プロモーターによって駆動される葉プロトプラストと比較することができる。また、トウモロコシまたはコムギプロトプラストにおいてアンプリコンからのCP4発現を駆動する調節要素も同様に研究することができる。

#### 【0109】

実施例4：GUS導入遺伝子カセットアンプリコンを使ったコムギプロトプラストにおけるGUSを駆動する調節要素の解析

コムギ葉プロトプラストを、 $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）導入遺伝子の発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクターに由来するDNAアンプリコンで形質転換し、GUSの発現が既知の構成的プロモーターによって駆動される葉プロトプラストと比較した。

#### 【0110】

上記実施例3でトウモロコシにおけるアッセイに使用したのと同じGUSカセットアンプリコンを使って、表10～11に列挙するEXP配列によって駆動される導入遺伝子（GUS）の発現を、先の実施例（実施例3）に記載の方法論で、既知の構成的プロモーターのものと比較するために、葉組織由来のコムギプロトプラスト細胞を、当技術分野において知られている方法を使って、植物発現ベクターを構成するGUS導入遺伝子カセットの増幅によって生じるアンプリコンで形質転換した。コムギプロトプラスト形質転換に使用した対照GUSカセットアンプリコンおよびルシフェラーゼプラスミドも、先の実施例で提示し、実施例3において上記表7に記載したのと同じであった。また、上述のように、GUSおよびルシフェラーゼバックグラウンドを決定するために、陰性対照を使用した。コムギ葉プロトプラストは、上記実施例3で述べたように、PEGに基づく形質転換法を使って形質転換した。表19には形質転換されたコムギ葉プロトプラスト細胞に見られる平均GUSおよびLUC活性を列挙し、表20には、コムギプロトプラストにおける標準化されたGUS/RLuc発現比を示す。

〔表19〕形質転換されたコムギ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

10

20

【表 19】

| EXP配列                                       | 配列<br>番号 | GUS     | RLuc    | GUS/RLuc  |
|---------------------------------------------|----------|---------|---------|-----------|
| EXP-Os.Act1:1:9                             | 179      | 2976.33 | 53334.8 | 0.0558047 |
| P-CAMV.35S-ENH-1:1:102/L-CAMV.35S-<br>1:1:2 | 169      | 1431.33 | 55996.1 | 0.0255612 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1       | 163      | 29299.3 | 50717.4 | 0.5776973 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1                | 170      | 34294.3 | 63307.9 | 0.5417066 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                          | 5        | 68444.3 | 60329.1 | 1.1345158 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                         | 10       | 60606.3 | 60659.4 | 0.9991245 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                          | 12       | 33386.3 | 56712.1 | 0.5886984 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                         | 14       | 43237.3 | 48263.4 | 0.8958609 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                         | 16       | 51712.7 | 64702.8 | 0.7992341 |
| EXP-ER1ra.Ubq1:1:9                          | 22       | 20998.3 | 60273.4 | 0.3483845 |
| EXP-ER1ra.Ubq1:1:10                         | 25       | 17268.3 | 25465.4 | 0.6781084 |
| EXP-ER1ra.Ubq1:1:8                          | 27       | 34635.7 | 59467.1 | 0.5824341 |
| EXP-ER1ra.Ubq1:1:11                         | 29       | 28979   | 56153.8 | 0.516065  |
| EXP-ER1ra.Ubq1:1:12                         | 31       | 41409.7 | 55152.4 | 0.7508221 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                          | 117      | 39427.7 | 57463.1 | 0.6861388 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                          | 123      | 108091  | 49330.4 | 2.191169  |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                          | 124      | 58703   | 46110.1 | 1.2731047 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:7                             | 128      | 29330   | 43367.1 | 0.676319  |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8                             | 132      | 53359   | 40076.4 | 1.3314306 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:10                            | 134      | 49122.7 | 53180.8 | 0.9236922 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6                            | 137      | 37268   | 54088.1 | 0.6890239 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7                            | 141      | 51408   | 47297.4 | 1.0869087 |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2                             | 151      | 35660.3 | 62591.1 | 0.5697347 |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2                             | 153      | 27543   | 57826.4 | 0.4763046 |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10                            | 98       | 54493.3 | 41964.1 | 1.2985699 |

10

20

〔表20〕 コムギ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）に対して標準化されたGUS/RLuc発現比

【表 20】

| EXP配列                                       | 配列<br>番号 | EXP-Os.Act1:1:9<br>と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.A<br>ct1:1:1と比較した<br>GUS/RLuc |
|---------------------------------------------|----------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9                             | 179      | 1.00                                 | 0.10                                                           |
| P-CAMV.35S-ENH-1:1:102/L-<br>CAMV.35S-1:1:2 | 169      | 0.46                                 | 0.04                                                           |
| EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1   | 163      | 10.35                                | 1.00                                                           |
| EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1            | 170      | 9.71                                 | 0.94                                                           |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                          | 5        | 20.33                                | 1.96                                                           |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                         | 10       | 17.90                                | 1.73                                                           |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                          | 12       | 10.55                                | 1.02                                                           |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                         | 14       | 16.05                                | 1.55                                                           |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                         | 16       | 14.32                                | 1.38                                                           |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9                          | 22       | 6.24                                 | 0.60                                                           |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10                         | 25       | 12.15                                | 1.17                                                           |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8                          | 27       | 10.44                                | 1.01                                                           |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11                         | 29       | 9.25                                 | 0.89                                                           |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12                         | 31       | 13.45                                | 1.30                                                           |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                          | 117      | 12.30                                | 1.19                                                           |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                          | 123      | 39.26                                | 3.79                                                           |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                          | 124      | 22.81                                | 2.20                                                           |
| EXP-Sv.Ubq1:1:7                             | 128      | 12.12                                | 1.17                                                           |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8                             | 132      | 23.86                                | 2.30                                                           |
| EXP-Sv.Ubq1:1:10                            | 134      | 16.55                                | 1.60                                                           |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6                            | 137      | 12.35                                | 1.19                                                           |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7                            | 141      | 19.48                                | 1.88                                                           |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2                             | 151      | 10.21                                | 0.99                                                           |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2                             | 153      | 8.54                                 | 0.82                                                           |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10                            | 98       | 23.27                                | 2.25                                                           |

## 【0111】

上記表20からわかるように、ほとんど全てのEXP配列が、コムギ細胞においてGUS導入遺伝子発現を駆動する能力を有した。EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERlra.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERlra.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERlra.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERlra.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERlra.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）、EXP-SETit.Ubq1:1:7（配列番号123）、EXP-SETit.Ubq1:1:6（配列番号124）、EXP-Sv.Ubq1:1:7（配列番号128）、EXP-Sv.Ubq1:1:8（配列番号132）、EXP-Sv.Ubq1:1:10（配列番号134）、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）、EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）、EXP-Sb.Ubq6:1:2（配列番号153）およびEXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）によって駆動されるGUS導入遺伝子発現は、EXP-Os.Act1:1:9によって駆動されるGUS発現よりはるかに高かった。EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1と比較したコムギ葉プロトプラスト細胞におけるアンプリコンのGUS発現は、トウモロコシプロトプラスト細胞において観察された発現とはわずかに異なった。EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERlra.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERlra.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERlra.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）、EXP-SETit.Ubq1:1:7（配列番号123）、EXP-SETit.Ubq1:1:6（配列番号124）、EXP-Sv.Ubq1:1:7（配列番号128）

、EXP-Sv.Ubq1:1:8（配列番号132）、EXP-Sv.Ubq1:1:10（配列番号134）、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）、EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）およびEXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）のそれぞれは、EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1と比較して、より高レベルのGUS発現を示した。EXP配列EXP-ERIRa.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRa.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）およびEXP-Sb.Ubq6:1:2（配列番号153）は、EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1と比較して、より低レベルのGUS発現を示した。

#### 【0112】

2組目の実験では、アンプリコンGUS導入遺伝子カセットを上述のように作り、EXP配列、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）によって駆動される発現についてアッセイした。アンプリコンは、T-AGRtu.nos-1:1:13 3'UTRに作動的に連結されたGUS-1コード配列に作動的に連結されたEXP配列から構成された。発現を、対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）と比較した。下記表21には、各アンプリコンについて決定された平均GUSおよびルシフェラーゼ値を示す。下記表22には、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1駆動発現に対して標準化されたGUS/RLuc発現比を示す。

〔表21〕形質転換されたコムギ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

#### 【表21】

| アンプリコン<br>ID | EXP配列                        | 配列<br>番号 | GUS     | RLuc     |
|--------------|------------------------------|----------|---------|----------|
| PCR0145942   | EXP-Os.Act1:1:9              | 179      | 1234    | 176970.5 |
| PCR0145944   | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 12883.5 | 119439   |
| PCR0146628   | EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8        | 38353.3 | 171535.3 |
| PCR0145922   | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98       | 34938   | 154245.8 |
| PCR0145945   | EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114      | 32121   | 122220.8 |
| PCR0145946   | EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115      | 56814   | 143318.3 |
| PCR0145947   | EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116      | 1890.5  | 167178.5 |

〔表22〕コムギ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）に対して標準化されたGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比

#### 【表22】

| EXP配列                        | 配列<br>番号 | EXP-Os.Act1:1:9<br>と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1と<br>比較したGUS/RLuc |
|------------------------------|----------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9              | 179      | 1.00                                 | 0.06                                              |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 15.47                                | 1.00                                              |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8        | 32.07                                | 2.07                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98       | 32.48                                | 2.10                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114      | 37.69                                | 2.44                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115      | 56.85                                | 3.68                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116      | 1.62                                 | 0.10                                              |

#### 【0113】

上記表22からわかるように、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）は、導入遺伝子発現を駆動する能力を有する。EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）およびEXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）によって駆動される発現は、どちらの対照の発現より高かった。EXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）によって駆動

される発現は、EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）よりは低かったが、対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）よりは高かった。

#### 【0114】

3組目の実験では、EXP配列、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）によって駆動される発現をアッセイするために、アンプリコンGUS導入遺伝子カセットを上述のように作った。発現を対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）と比較した。下記表23には、各アンプリコンについて決定された平均GUSおよびルシフェラーゼ値を示す。下記表24には、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1駆動発現に対して標準化されたGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比を示す。

10

〔表23〕形質転換されたコムギ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

#### 【表23】

| アンプリコン<br>ID | EXP配列                        | 配列<br>番号 | GUS     | RLuc    | FLuc    |
|--------------|------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| PCR0145942   | EXP-Os.Act1:1:9              | 179      | 478     | 46584.5 | 2709.75 |
| PCR0145944   | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 8178.5  | 43490.8 | 2927.25 |
| PCR0145922   | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98       | 22068.3 | 47662.3 | 1289    |
| pMON146750   | EXP-Cl.Ubq1:1:16             | 93       | 34205   | 45064.5 | 1379.63 |
| pMON146751   | EXP-Cl.Ubq1:1:17             | 97       | 31758   | 45739.3 | 2820.75 |

20

〔表24〕コムギ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）に対して標準化されたGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比

#### 【表24】

| アンプリコン<br>ID | EXP配列                        | 配列<br>番号 | EXP-Os.Act1:1:9と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-Os.Act1:1:9と比較した<br>GUS/FLuc | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1と比較した<br>GUS/FLuc |
|--------------|------------------------------|----------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| PCR0145942   | EXP-Os.Act1:1:9              | 179      | 1.00                             | 1.00                             | 0.05                                          | 0.06                                          |
| PCR0145944   | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 18.33                            | 15.84                            | 1.00                                          | 1.00                                          |
| PCR0145922   | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98       | 45.12                            | 97.05                            | 2.46                                          | 6.13                                          |
| pMON146750   | EXP-Cl.Ubq1:1:16             | 93       | 73.97                            | 140.55                           | 4.04                                          | 8.87                                          |
| pMON146751   | EXP-Cl.Ubq1:1:17             | 97       | 67.67                            | 63.82                            | 3.69                                          | 4.03                                          |

30

#### 【0115】

上記表24からわかるように、EXP配列EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）は、導入遺伝子発現を駆動することができた。これらEXP配列のそれぞれによって駆動される発現は、どちらの対照よりも高かった。

40

#### 【0116】

4組目の実験では、EXP配列、EXP-Zm.UbqM1:1:11（配列番号149）およびEXP-Cl.Ubq1:1:23（配列番号108）によって駆動される発現をアッセイするために、上述のようにアンプリコンGUS導入遺伝子カセットを作った。発現を、対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）と比較した。下記表25には、各アンプリコンについて決定された平均GUSおよびルシフェラーゼ値を示す。下記表26には、トウモロコシプロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1駆動発現に対して標準化されたGUS/RLuc発現比を示す。

〔表25〕形質転換されたコムギ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

50

【表 2 5】

| テンプレート     | アンプリコンID   | EXP配列                                     | 配列番号 | GUS      | RLuc     |
|------------|------------|-------------------------------------------|------|----------|----------|
| pMON65328  | PCR0145943 | EXP-CaMV.35S-<br>enh-Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163  | 67459.13 | 11682.00 |
| pMON25455  | PCR0145942 | EXP-Os.Act1:1:9                           | 179  | 56618.33 | 16654.83 |
| pMON131962 | pMON131962 | EXP-Zm.UbqM1:1:11                         | 149  | 53862.13 | 10313.75 |
| pMON132047 | pMON132047 | EXP-Cl.Ubq1:1:23                          | 108  | 38869.38 | 12279.00 |

〔表26〕 コムギ葉プロトプラストにおけるEXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）に対して標準化されたGUS/RLuc発現比 10

【表 2 6】

| アンプリコンID   | EXP配列                                     | 配列番号 | EXP-Os.Act1:1:9<br>と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.Act<br>1:1:1と比較した<br>GUS/RLuc |
|------------|-------------------------------------------|------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| PCR0145943 | EXP-CaMV.35S-<br>enh-Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163  | 1.70                                 | 1.00                                                           |
| PCR0145942 | EXP-Os.Act1:1:9                           | 179  | 1.00                                 | 0.59                                                           |
| pMON131962 | EXP-Zm.UbqM1:1:11                         | 149  | 1.54                                 | 0.90                                                           |
| pMON132047 | EXP-Cl.Ubq1:1:23                          | 108  | 0.93                                 | 0.55                                                           |

20

## 【0 1 1 7】

上記表26からわかるように、EXP配列、EXP-Zm.UbqM1:1:11（配列番号149）およびEXP-Cl.Ubq1:1:23（配列番号108）は、コムギ葉プロトプラストにおけるGUS発現を駆動することができた。発現は対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）の発現とは類似しており、EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）の発現より低かった。

## 【0 1 1 8】

実施例5：GUS導入遺伝子カセットアンプリコンを使ったサトウキビプロトプラストにおけるGUSを駆動する調節要素の解析

サトウキビ葉プロトプラストを、 $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）導入遺伝子の発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクター由来のDNAアンプリコンで形質転換し、GUSの発現が既知の構成的プロモーターによって駆動される葉プロトプラストと比較した。

30

## 【0 1 1 9】

EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）ならびに下記の表27に提示するものの一つによって駆動される導入遺伝子（GUS）の発現を、既知の構成的プロモーターのものと比較するために、上記実施例3で述べたように、PEGベースの形質転換法を使って、葉組織由来のサトウキビプロトプラスト細胞を、植物発現ベクターを構成するGUS導入遺伝子カセットの増幅によって生じるアンプリコンで形質転換した。

40

〔表27〕 GUS植物発現アンプリコンならびに対応するプラスミドコンストラクトアンプリコンテンプレートおよびEXP配列

【表 27】

| アンプリコン<br>ID | アンプリコン<br>テンプレート | EXP配列                          | 配列<br>番号 |
|--------------|------------------|--------------------------------|----------|
| PCR0145942   | pMON25455        | EXP-Os. Act1:1:9               | 179      |
| PCR0145944   | pMON81552        | EXP-CaMV. 35S-enh+Zm. DnaK:1:1 | 170      |
| PCR0145892   | pMON136264       | EXP-ANDge. Ubq1:1:7            | 5        |
| PCR0145815   | pMON136264       | EXP-ANDge. Ubq1:1:10           | 10       |
| PCR0145893   | pMON136259       | EXP-ANDge. Ubq1:1:6            | 12       |
| PCR0145817   | pMON136264       | EXP-ANDge. Ubq1:1:11           | 14       |
| PCR0145819   | pMON136264       | EXP-ANDge. Ubq1:1:12           | 16       |
| PCR0145896   | pMON136263       | EXP-ERIRA. Ubq1:1:9            | 22       |
| PCR0145820   | pMON136263       | EXP-ERIRA. Ubq1:1:10           | 25       |
| PCR0145897   | pMON136258       | EXP-ERIRA. Ubq1:1:8            | 27       |
| PCR0145821   | pMON136263       | EXP-ERIRA. Ubq1:1:11           | 29       |
| PCR0145822   | pMON136263       | EXP-ERIRA. Ubq1:1:12           | 31       |
| PCR0145922   | pMON140889       | EXP-Cl. Ubq1:1:10              | 98       |
| PCR0145945   | pMON140889       | EXP-Cl. Ubq1:1:13              | 114      |
| PCR0145946   | pMON140889       | EXP-Cl. Ubq1:1:14              | 115      |
| PCR0145947   | pMON140889       | EXP-Cl. Ubq1:1:15              | 116      |

## 【0120】

サトウキビプロトプラスト形質転換に使用した対照GUSカセットアンプリコンおよびルシフェラーゼプラスミドも、実施例2～4において提示し、上記表7および実施例3に記載したものと同一であった。また、上述のように、GUSおよびルシフェラーゼバックグラウンドを決定するために、陰性対照を使用した。表28には、形質転換されたサトウキビ葉プロトプラスト細胞に見られる平均GUSおよびLuc活性を列挙し、表29には、サトウキビ葉プロトプラストにおける標準化されたGUS/RLuc発現比を示す。

〔表28〕形質転換されたコムギ葉プロトプラスト細胞における平均GUSおよびルシフェラーゼ活性

【表 28】

| EXP配列                          | 配列<br>番号 | GUS     | RLuc    | FLuc    |
|--------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| EXP-Os. Act1:1:9               | 179      | 6667.5  | 3024.5  | 1129.25 |
| EXP-CaMV. 35S-enh+Zm. DnaK:1:1 | 170      | 14872.8 | 5171    | 2019.5  |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:7            | 5        | 15225   | 4618.25 | 1775.75 |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:10           | 10       | 17275.3 | 4333    | 1678    |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:6            | 12       | 17236   | 5633.25 | 2240    |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:11           | 14       | 22487.8 | 6898.25 | 2878    |
| EXP-ANDge. Ubq1:1:12           | 16       | 22145.3 | 6240.25 | 2676.5  |
| EXP-ERIRA. Ubq1:1:9            | 22       | 16796.5 | 7759.75 | 3179    |
| EXP-ERIRA. Ubq1:1:10           | 25       | 16267.5 | 5632.75 | 2436.75 |
| EXP-ERIRA. Ubq1:1:8            | 27       | 25351   | 9019.5  | 4313.5  |
| EXP-ERIRA. Ubq1:1:11           | 29       | 16652.3 | 3672.25 | 1534    |
| EXP-ERIRA. Ubq1:1:12           | 31       | 12654.5 | 3256.75 | 1261.5  |
| EXP-Cl. Ubq1:1:10              | 98       | 22383.8 | 7097.5  | 3109.25 |
| EXP-Cl. Ubq1:1:13              | 114      | 14532.3 | 2786.5  | 1198.25 |
| EXP-Cl. Ubq1:1:14              | 115      | 19244.5 | 3455.25 | 1475    |
| EXP-Cl. Ubq1:1:15              | 116      | 6676.5  | 3870.25 | 1497.75 |

〔表29〕サトウキビ葉プロトプラストにおけるEXP-Os. Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV. 35S-enh+Zm. DnaK:1:1（配列番号170）に対して標準化されたGUS/RLucおよびGUS/FLuc発現比

【表 29】

| EXP配列                              | 配列番号 | EXP-Os. Act1:1:9<br>と比較した<br>GUS/RLuc | EXP-Os. Act1:1:9<br>と比較した<br>GUS/FLuc | EXP-CaMV. 35S-<br>enh+Zm. DnaK:<br>1:1と比較し<br>たGUS/RLuc | EXP-CaMV. 35S-<br>enh+Zm. DnaK:<br>1:1と比較し<br>たGUS/FLuc |
|------------------------------------|------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| EXP-Os. Act1:1:9                   | 179  | 1.00                                  | 1.00                                  | 0.77                                                    | 0.80                                                    |
| EXP-CaMV. 35S-<br>enh+Zm. DnaK:1:1 | 170  | 1.30                                  | 1.25                                  | 1.00                                                    | 1.00                                                    |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                 | 5    | 1.50                                  | 1.45                                  | 1.15                                                    | 1.16                                                    |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                | 10   | 1.81                                  | 1.74                                  | 1.39                                                    | 1.40                                                    |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                 | 12   | 1.39                                  | 1.30                                  | 1.06                                                    | 1.04                                                    |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                | 14   | 1.48                                  | 1.32                                  | 1.13                                                    | 1.06                                                    |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                | 16   | 1.61                                  | 1.40                                  | 1.23                                                    | 1.12                                                    |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9                 | 22   | 0.98                                  | 0.89                                  | 0.75                                                    | 0.72                                                    |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10                | 25   | 1.31                                  | 1.13                                  | 1.00                                                    | 0.91                                                    |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8                 | 27   | 1.27                                  | 1.00                                  | 0.98                                                    | 0.80                                                    |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11                | 29   | 2.06                                  | 1.84                                  | 1.58                                                    | 1.47                                                    |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12                | 31   | 1.76                                  | 1.70                                  | 1.35                                                    | 1.36                                                    |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10                   | 98   | 1.43                                  | 1.22                                  | 1.10                                                    | 0.98                                                    |
| EXP-Cl.Ubq1:1:13                   | 114  | 2.37                                  | 2.05                                  | 1.81                                                    | 1.65                                                    |
| EXP-Cl.Ubq1:1:14                   | 115  | 2.53                                  | 2.21                                  | 1.94                                                    | 1.77                                                    |
| EXP-Cl.Ubq1:1:15                   | 116  | 0.78                                  | 0.75                                  | 0.60                                                    | 0.61                                                    |

10

## 【0121】

20

上記表29からわかるように、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERlra.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERlra.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERlra.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERlra.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERlra.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）はいずれも、サトウキビプロトプラストにおいて導入遺伝子発現を駆動する能力を有した。EXP配列、EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERlra.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERlra.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERlra.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）およびEXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）は、この実験では、EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）より多くのGUSを発現させた。

30

## 【0122】

## 実施例6：トウモロコシプロトプラストにおけるCP4を駆動する調節要素の解析

この実施例では、トウモロコシプロトプラストにおけるグリホサート耐性遺伝子CP4の発現を駆動するEXP-Sv.Ubq1:1:7（配列番号128）、EXP-Sv.Ubq1:1:8（配列番号132）、EXP-Sv.Ubq1:1:9（配列番号133）、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）、EXP-Zm.UbqM1:1:8（配列番号145）、EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）、EXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）、EXP-SETit.Ubq1:1:7（配列番号123）、EXP-SETit.Ubq1:1:6（配列番号124）、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）およびEXP-Sb.Ubq6:1:2（配列番号153）の能力を例証する。当技術分野において知られている方法を使って、これらのEXP配列を、植物バイナリー形質転換プラスミドコンストラクトにクローニングした。その結果得られた植物発現ベクターは、*A. tumefaciens*由来の右境界領域、T-AGRtu.nos-1:1:13 3'UTRの5'側に作動的に連結されたプラスミド標的グリホサート耐性EPSPSコード配列（CP4、US RE39247）の5'側に作動的に連結されたユビキチンEXP配列、および*A. tumefaciens*由来の左境界領域（B-AGRtu.left border）を含有した。得られたプラスミドコンストラクトを使用し、当技術分野において知られている方法を使って、トウモロコシ葉プロトプラスト細胞を形質転換した。

40

50

## 【0123】

表1に定義したEXP配列を持つ表30に列挙したプラスミドコンストラクトを利用した。CP4またはGFPのどちらか一方を駆動する既知の構成的調節要素を持つ3つの対照プラスミド（pMON30098、pMON42410、およびpMON30167）を構築し、これらのEXP配列によって駆動される相対的CP4発現レベルを既知の構成的発現要素によって駆動されるCP4発現と比較するために使用した。他の2つのプラスミド（pMON19437およびpMON63934）も、形質転換効率と生存可能性を評価するために、上述のように使用した。各プラスミドは、構成的EXP配列によって駆動される特定のルシフェラーゼコード配列を含有する。

## 【0124】

上記実施例2で述べたように、PEGベースの形質転換法を使って、トウモロコシ葉プロトプラストを形質転換した。CP4とルシフェラーゼの両方の測定を、上記実施例2と同様に行った。百万分率（ppm）として表したCP4タンパク質発現の平均レベルを下記表30に示す。

〔表30〕 トウモロコシ葉プロトプラストにおける平均CP4タンパク質発現

## 【表30】

| プラスミド      | EXP配列                                    | 配列番号 | CP4<br>平均<br>ppm | CP4<br>STDEV<br>ppm |
|------------|------------------------------------------|------|------------------|---------------------|
| DNAなし      | DNAなし                                    |      | 0                | 0                   |
| pMON30098  | GFP                                      |      | 0                | 0                   |
| pMON42410  | EXP-CaMV. 35S-enh+Ta. Lhcb1+Os. Act1:1:1 | 163  | 34.1             | 15.6                |
| pMON30167  | EXP-Os. Act1:1:1                         | 164  | 40.4             | 11.6                |
| pMON129203 | EXP-Sv. Ubq1:1:7                         | 128  | 45.2             | 6.2                 |
| pMON129204 | EXP-Sv. Ubq1:1:8                         | 132  | 101.9            | 13.8                |
| pMON129205 | EXP-Sv. Ubq1:1:9                         | 133  | 71.1             | 8.7                 |
| pMON129210 | EXP-Zm. UbqM1:1:6                        | 137  | 137.1            | 14.8                |
| pMON129211 | EXP-Zm. UbqM1:1:8                        | 145  | 136.5            | 12.3                |
| pMON129212 | EXP-Zm. UbqM1:1:7                        | 141  | 170.2            | 18.1                |
| pMON129200 | EXP-SETit. Ubq1:1:5                      | 117  | 44.3             | 9.5                 |
| pMON129201 | EXP-SETit. Ubq1:1:7                      | 123  | 105.1            | 8.4                 |
| pMON129202 | EXP-SETit. Ubq1:1:6                      | 124  | 124.9            | 33.7                |
| pMON129219 | EXP-Sb. Ubq4:1:2                         | 151  | 14.3             | 1                   |
| pMON129218 | EXP-Sb. Ubq6:1:2                         | 153  | 75.7             | 8.9                 |

## 【0125】

表30からわかるように、EXP-Sv.Ubq1:1:7（配列番号128）、EXP-Sv.Ubq1:1:8（配列番号132）、EXP-Sv.Ubq1:1:9（配列番号133）、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）、EXP-Zm.UbqM1:1:8（配列番号145）、EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）、EXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）、EXP-SETit.Ubq1:1:7（配列番号123）、EXP-SETit.Ubq1:1:6（配列番号124）およびEXP-Sb.Ubq6:1:2（配列番号153）は、EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1およびEXP-Os.Act1:1:1によって駆動されるCP4発現レベルに近いかそれより高いレベルで、CP4導入遺伝子の発現を駆動した。EXP配列、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）は、CP4の発現を駆動する能力を示したが、その発現レベルは構成的対照のものより低かった。

## 【0126】

上記のデータと類似するデータは、上述のプラスミドコンストラクトで安定に形質転換された植物、例えば子孫世代R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub>もしくはF<sub>1</sub>またはそれ以降の植物でも得ることができる。また、他のプラスミドコンストラクトからの発現も研究することができる。例えばpMON141619はEXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:8を含み、一方、pMON142862はEXP配列EXP-ERIRA.Ubq1:1:8から構成される。これらのコンストラクトおよび他のコンストラクトを、この方法で分析することができる。

## 【0127】

実施例7：CP4導入遺伝子カセットアンプリコンを使ったトウモロコシプロトプラストにおけるCP4を駆動する調節要素の解析

10

20

30

40

50

この実施例では、トウモロコシプロトプラストにおけるグリホサート耐性遺伝子CP4の発現を駆動するEXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）、EXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）の能力を例証する。これらのEXP配列を植物バイナリー形質転換プラスミドコンストラクトにクローニングした。その結果得られた植物発現ベクターを、T-AGRTu.nos-1:1:13 3'UTRの5'側に作動的に連結されたプラスミド標的グリホサート耐性EPSPSコード配列（CP4、US RE39247）の5'側に作動的に連結されたユビキチンEXP配列とA. tumefaciens由来の左境界領域とから構成される導入遺伝子カセットアンプリコンを作製するための増幅テンプレートとして使用した。得られたアンプリコンを使ってトウモロコシ葉プロトプラスト細胞を形質転換した。

10

#### 【0128】

上記実施例2で述べたように、PEGベースの形質転換法を使って、トウモロコシ葉プロトプラストを形質転換した。両CP4の測定は、ELISAベースのアッセイを使って行った。百万分率（ppm）で表したCP4タンパク質発現の平均レベルを下記表31および表32に示す。

#### 【0129】

20

1つ目の一連の実験では、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）から構成されるアンプリコンによって駆動されるCP4の発現を、形質転換されたトウモロコシ葉プロトプラストにおいてアッセイし、構成的対照EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）およびEXP-Os.Act1:1:1（配列番号164）によって駆動されるCP4発現レベルと比較した。百万分率（ppm）として表したCP4タンパク質発現の平均レベルを、下記表31に示す。

30

〔表31〕 トウモロコシ葉プロトプラストにおける平均CP4タンパク質発現

【表 3 1】

| アンプリコン<br>テンプレート | アンプ<br>リコン<br>ID | EXP配列                            | 配列<br>番号 | CP4<br>ng/mg総タンパク質<br>平均 | CP4<br>ng/mg総タンパク質<br>STDEV |
|------------------|------------------|----------------------------------|----------|--------------------------|-----------------------------|
|                  |                  | DNAなし                            |          | 0.0                      | 0.0                         |
| pMON30098        |                  | GFP (陰性対照)                       |          | 0.0                      | 0.0                         |
| pMON19469        | PCR24            | EXP-CaMV.35S-<br>enh-Zm.DnaK:1:1 | 170      | 605.5                    | 27.6                        |
| pMON30167        | PCR25            | EXP-Os.Act1:1:1                  | 164      | 50.6                     | 14.2                        |
| pMON140896       | PCR41            | EXP-ANDge.Ubq1:1:7               | 5        | 459.0                    | 60.9                        |
| pMON140917       | PCR42            | EXP-ANDge.Ubq1:1:8               | 8        | 258.2                    | 38.4                        |
| pMON140897       | PCR43            | EXP-ANDge.Ubq1:1:10              | 10       | 324.8                    | 21.6                        |
| pMON140898       | PCR44            | EXP-ANDge.Ubq1:1:6               | 12       | 394.9                    | 66.4                        |
| pMON140899       | PCR45            | EXP-ANDge.Ubq1:1:11              | 14       | 508.7                    | 89.6                        |
| pMON140900       | PCR46            | EXP-ANDge.Ubq1:1:12              | 16       | 329.3                    | 14.5                        |
| pMON140904       | PCR50            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:9               | 22       | 148.6                    | 24.4                        |
| pMON140905       | PCR51            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:10              | 25       | 215.8                    | 22.6                        |
| pMON140906       | PCR52            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8               | 27       | 376.6                    | 44.1                        |
| pMON140907       | PCR53            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:11              | 29       | 459.9                    | 104.7                       |
| pMON140908       | PCR54            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:12              | 31       | 221.6                    | 15.9                        |
| pMON140913       | PCR19            | EXP-Cl.Ubq1:1:10                 | 98       | 287.8                    | 50.9                        |
| pMON140914       | PCR20            | EXP-Cl.Ubq1:1:13                 | 114      | 585.8                    | 47.9                        |
| pMON140915       | PCR21            | EXP-Cl.Ubq1:1:14                 | 115      | 557.5                    | 76.6                        |
| pMON140916       | PCR22            | EXP-Cl.Ubq1:1:15                 | 116      | 33.2                     | 9.5                         |

## 【0130】

上記表31からわかるように、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）は、CP4発現を駆動することができた。一つの例外EXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）を除く全てのEXP配列が、構成的対照EXP-Os.Act1:1:1（配列番号164）よりはるかに高いレベルのCP4発現レベルを駆動した。発現レベルは、EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）のレベルより低かった。

## 【0131】

2つ目の一連の実験では、EXP配列EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）から構成されるアンプリコンによって駆動されるCP4の発現を、形質転換されたトウモロコシ葉プロトプラストにおいてアッセイし、構成的対照EXP-Os.Act1:1:1（配列番号164）によって駆動されるCP4発現レベルと比較した。百万分率（ppm）として表したCP4タンパク質発現の平均レベルを、下記表32に示す。

〔表32〕 トウモロコシ葉プロトプラストにおける平均CP4タンパク質発現

【表 3 2】

| アンプリコン<br>テンプレート | アンプリコン<br>ID | EXP配列            | 配列<br>番号 | トウモロコシ<br>葉CP4 mg/<br>総タンパク質<br>Avg | トウモロコシ<br>葉CP4 mg/<br>総タンパク質<br>StdDev |
|------------------|--------------|------------------|----------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| pMON30167        | PCR25        | EXP-Os.Act1:1:1  | 164      | 12.2                                | 1.69                                   |
| pMON140913       | PCR19        | EXP-Cl.Ubq1:1:10 | 98       | 307.5                               | 24.21                                  |
| pMON142748       | pMON142748   | EXP-Cl.Ubq1:1:16 | 93       | 245.95                              | 30.14                                  |
| pMON142749       | pMON142749   | EXP-Cl.Ubq1:1:17 | 97       | 302.85                              | 25.32                                  |

## 【0132】

上記表32からわかるように、EXP配列EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）は、CP4発現を駆動することができた。3つのEXP配列によって駆動される発現レベルはいずれも、構成的対照EXP-Os.Act1:1:1（配列番号164）のものより高かった。

## 【0133】

## 実施例8：コムギプロトプラストにおけるCP4を駆動する調節要素の解析

この実施例では、コムギ葉プロトプラストにおけるCP4発現を駆動するEXP-Sv.Ubq1:1:7（配列番号128）、EXP-Sv.Ubq1:1:8（配列番号132）、EXP-Sv.Ubq1:1:9（配列番号133）、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）、EXP-Zm.UbqM1:1:8（配列番号145）、EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）、EXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）、EXP-SETit.Ubq1:1:7（配列番号123）、EXP-SETit.Ubq1:1:6（配列番号124）、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）およびEXP-Sb.Ubq6:1:2（配列番号153）の能力を例証する。当技術分野において知られている方法を使って、また上記実施例2および実施例5で述べたように、これらのEXP配列を、植物バイナリー形質転換プラスミドコンストラクトにクローニングした。

## 【0134】

CP4またはGFPのどちらか一方を駆動する既知の構成的調節要素を持つ3つの対照プラスミド（既述のpMON30098、pMON42410、ならびにAgrobacterium tumefaciens由来の右境界領域を、T-AGRtu.nos-1:1:13の5'側に作動的に連結されたプラスチド標的グリホサート耐性コード配列（CP4、US RE39247）の5'側に作動的に連結されたEXP-Os.Act1+CaMV.35S.2xA1-B3+Os.Act1:1:1（配列番号138）および左境界領域（B-AGRtu.left border）と共に含むpMON43647）を、実施例5で概説したように構築した。

## 【0135】

1アッセイあたり $1.5 \times 10^5$ 個のプロトプラスト細胞を使用した点以外は上記の実施例で述べたようにして、PEGベースの形質転換法を使って、コムギ葉プロトプラストを形質転換した。ルシフェラーゼおよびCP4導入遺伝子発現のアッセイは、上記実施例6で述べたように行った。CP4 ELISAによって決定された平均CP4発現レベルを下記表34に提示する。

[表34] コムギ葉プロトプラスト細胞における平均CP4タンパク質発現

## 【表33】

| プラスミド      | EXP配列                                    | 配列番号 | CP4平均<br>ppm | CP4 STDEV<br>ppm |
|------------|------------------------------------------|------|--------------|------------------|
| DNAなし      | DNAなし                                    |      | 0            | 0                |
| pMON30098  | GFP                                      |      | 0            | 0                |
| pMON43647  | EXP-Os.Act1+CaMV.35S.2xA1-B3+Os.Act1:1:1 | 172  | 656.2        | 124.5            |
| pMON42410  | EXP CaMV.35S enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1    | 163  | 438.3        | 78.9             |
| pMON30167  | EXP-Os.Act1:1:1                          | 164  | 583          | 107.4            |
| pMON129203 | EXP-Sv.Ubq1:1:7                          | 128  | 156.9        | 25.1             |
| pMON129204 | EXP-Sv.Ubq1:1:8                          | 132  | 39.5         | 7                |
| pMON129205 | EXP-Sv.Ubq1:1:9                          | 133  | 154.5        | 56.5             |
| pMON129210 | EXP-Zm.UbqM1:1:6                         | 137  | 1500         | 0                |
| pMON129211 | EXP-Zm.UbqM1:1:8                         | 145  | 199.7        | 64.9             |
| pMON129212 | EXP-Zm.UbqM1:1:7                         | 141  | 234.6        | 66.9             |
| pMON129200 | EXP-SETit.Ubq1:1:5                       | 117  | 725.7        | 149.7            |
| pMON129201 | EXP-SETit.Ubq1:1:7                       | 123  | 64.9         | 14.5             |
| pMON129202 | EXP-SETit.Ubq1:1:6                       | 124  | 122.9        | 48.7             |
| pMON129219 | EXP-Sb.Ubq4:1:2                          | 151  | 113.1        | 32.8             |

## 【0136】

上記EXP配列および既知の構成的EXP配列EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1によって駆動されるコムギプロトプラストにおけるCP4発現の総量は、トウモロコシプロトプラストと比較して、コムギプロトプラストでは、異なるレベルのCP4発現を示した。

## 【0137】

いくつかのEXP配列は、コムギプロトプラストにおいて、既知の構成的EXP配列EXP-Os.Act1+CaMV.35S.2xA1-B3+Os.Act1:1:1およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1より低レベルのCP4発現を駆動した。2つのEXP配列、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）およびEXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）は、このアッセイでは、コムギプロトプラストにおいて、既知の構成的EXP配列より高レベルのCP4発現を与える。EXP-Zm.UbqM1:1:2は、最も高レベルなCP4の発現を駆動し、発現レベルは、EXP-Os.Act1+CaMV.35S.2xA1-B3+Os.Act1:1:1およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1より、それぞれ2.2倍～3.4倍高かった。アッセイした全てのEXP配列が、コムギ細胞においてCP4の発現を駆動する能力を示した。

### 【0138】

10

実施例9：CP4導入遺伝子カセットアンプリコンを使ったコムギプロトプラストにおけるCP4を駆動する調節要素の解析

この実施例では、コムギプロトプラストにおけるグリホサート耐性遺伝子CP4の発現を駆動するEXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）、EXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）の能力を例証する。これらのEXP配列を植物バイナリー形質転換プラスミドコンストラクトにクローニングした。結果として得られた植物発現ベクターを、T-AGRTu.nos-1:1:13 3'UTRの5'側に作動的に連結されたプラスチド標的グリホサート耐性EPSPSコード配列（CP4、US RE39247）の5'側に作動的に連結されたユビキチンEXP配列、およびA. tumefaciens由来の左境界領域から構成される導入遺伝子カセットアンプリコンを作製するための増幅テンプレートとして使用した。その結果得られたアンプリコンを使って、トウモロコシ葉プロトプラスト細胞を形質転換した。

20

### 【0139】

上記実施例2で述べたように、PEGベースの形質転換法を使ってコムギ葉プロトプラストを形質転換した。両CP4の測定は、ELISAベースのアッセイを使って行った。百万分率（ppm）で表したCP4タンパク質発現の平均レベルを下記表35および表36に示す。

30

### 【0140】

1つ目の一連の実験では、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）から構成されるアンプリコンによって駆動されるCP4の発現を、形質転換されたコムギ葉プロトプラストにおいてアッセイし、構成的対照EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）およびEXP-Os.Act1:1:1（配列番号164）によって駆動されるCP4発現レベルと比較した。百万分率（ppm）で表したCP4タンパク質発現の平均レベルを下記表35に示す。

40

[表35] コムギ葉プロトプラストにおける平均CP4タンパク質発現

【表 3 4】

| アンブリコン<br>テンプレート | アンブリコン<br>ID | EXP配列                            | 配列<br>番号 | CP4 ng/mg<br>総タンパク質<br>平均 | CP4 ng/mg<br>総タンパク質<br>STDEV |
|------------------|--------------|----------------------------------|----------|---------------------------|------------------------------|
|                  |              | DNAなし                            |          | 0.00                      | 0.00                         |
| pMON30098        |              | GFP (陰性対照)                       |          | 0.00                      | 0.00                         |
| pMON19469        | PCR24        | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 76.11                     | 18.65                        |
| pMON30167        | PCR25        | EXP-0s.Act1:1:1                  | 164      | 3.83                      | 0.73                         |
| pMON140896       | PCR41        | EXP-ANDge.Ubq1:1:7               | 5        | 103.46                    | 16.31                        |
| pMON140917       | PCR42        | EXP-ANDge.Ubq1:1:8               | 8        | 61.48                     | 1.99                         |
| pMON140897       | PCR43        | EXP-ANDge.Ubq1:1:10              | 10       | 62.65                     | 4.58                         |
| pMON140898       | PCR44        | EXP-ANDge.Ubq1:1:6               | 12       | 48.74                     | 3.09                         |
| pMON140899       | PCR45        | EXP-ANDge.Ubq1:1:11              | 14       | 54.91                     | 3.50                         |
| pMON140900       | PCR46        | EXP-ANDge.Ubq1:1:12              | 16       | 42.81                     | 5.97                         |
| pMON140904       | PCR50        | EXP-ERIRA.Ubq1:1:9               | 22       | 31.26                     | 1.69                         |
| pMON140905       | PCR51        | EXP-ERIRA.Ubq1:1:10              | 25       | 49.82                     | 5.96                         |
| pMON140906       | PCR52        | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8               | 27       | 37.43                     | 4.52                         |
| pMON140907       | PCR53        | EXP-ERIRA.Ubq1:1:11              | 29       | 27.17                     | 0.96                         |
| pMON140908       | PCR54        | EXP-ERIRA.Ubq1:1:12              | 31       | 17.41                     | 4.13                         |
| pMON140913       | PCR19        | EXP-Cl.Ubq1:1:10                 | 98       | 66.66                     | 13.45                        |
| pMON140914       | PCR20        | EXP-Cl.Ubq1:1:13                 | 114      | 79.42                     | 10.74                        |
| pMON140915       | PCR21        | EXP-Cl.Ubq1:1:14                 | 115      | 75.53                     | 9.32                         |
| pMON140916       | PCR22        | EXP-Cl.Ubq1:1:15                 | 116      | 0.00                      | 0.00                         |

## 【0 1 4 1】

上記表31からわかるように、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）は、CP4発現を駆動することができた。一つの例外EXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）を除く全てのEXP配列が、構成的対照EXP-0s.Act1:1:1（配列番号164）よりはるかに高レベルのCP4発現を駆動した。大半のEXP配列では、発現レベルが、EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）の発現レベルと同じ程度のレベルか、それより低かった。

## 【0 1 4 2】

2つ目の一連の実験では、EXP配列EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）から構成されるアンブリコンによって駆動されるCP4の発現を、形質転換されたコムギ葉プロトプラストにおいてアッセイし、構成的対照EXP-0s.Act1:1:1（配列番号164）によって駆動されるCP4発現レベルと比較した。百万分率（ppm）で表したCP4タンパク質発現の平均レベルを下記表32に示す。

〔表36〕コムギ葉プロトプラストにおける平均CP4タンパク質発現

【表 3 5】

| アンブリコン<br>テンプレート | アンブリコン<br>ID | EXP配列            | 配列<br>番号 | トウモロコシ<br>葉CP4 mg/<br>総タンパク質<br>Avg | トウモロコシ<br>葉CP4 mg/<br>総タンパク質<br>StdDev |
|------------------|--------------|------------------|----------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| pMON30167        | PCR25        | EXP-0s.Act1:1:1  | 164      | 15.84                               | 2.12                                   |
| pMON140913       | PCR19        | EXP-Cl.Ubq1:1:10 | 98       | 736.32                              | 79.56                                  |
| pMON142748       | pMON142748   | EXP-Cl.Ubq1:1:16 | 93       | 593.72                              | 80.22                                  |
| pMON142749       | pMON142749   | EXP-Cl.Ubq1:1:17 | 97       | 763.95                              | 86.94                                  |

## 【0 1 4 3】

上記表36からわかるように、EXP配列EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:16（配列番号93）およびEXP-Cl.Ubq1:1:17（配列番号97）は、CP4発現を駆動することができた。3つのEXP配列によって駆動される発現レベルはいずれも、構成的対照EXP-0s.Act

1:1:1（配列番号164）より高かった。

#### 【0144】

#### 実施例10：サトウキビプロトプラストにおけるCP4を駆動する調節要素の解析

この実施例では、サトウキビ葉プロトプラストにおけるCP4の発現を駆動するEXP-Sv.Ubq1:1:7（配列番号128）、EXP-Sv.Ubq1:1:8（配列番号132）、EXP-Sv.Ubq1:1:9（配列番号133）、EXP-Zm.UbqM1:1:6（配列番号137）、EXP-Zm.UbqM1:1:8（配列番号145）、EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）、EXP-SETit.Ubq1:1:5（配列番号117）、EXP-SETit.Ubq1:1:7（配列番号123）、EXP-SETit.Ubq1:1:6（配列番号124）、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）、EXP-Sb.Ubq6:1:2（配列番号153）およびEXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）の能力を例証する。EXP配列を植物バイナリー形質転換プラスミドコンストラクトにクローニングした。その結果得られたベクターは、Agrobacterium tumefaciens由来の右境界領域、T-AGRtu.nos-1:1:13（配列番号127）またはT-CaMV.35S-1:1:1（配列番号140）3'UTRの5'側に作動的に連結されたプラスチド標的グリホサート耐性EPSPSコード配列（CP4、US RE39247）の5'側に作動的に連結されたユビキチンEXP配列、およびA. tumefaciens由来の左境界領域（B-AGRtu.left border）を含有した。得られたプラスミドコンストラクトを使用し、PEG形質転換法を使って、サトウキビ葉プロトプラスト細胞を形質転換した。

#### 【0145】

プラスミドコンストラクトpMON129203、pMON12904、pMON12905、pMON129210、pMON129211、pMON129212、pMON129200、pMON129201、pMON129202、pMON129219、およびpMON129218は、上記表12に記載したとおりである。

#### 【0146】

CP4を駆動する既知の構成的調節要素を持つ3つの対照プラスミド（上述のpMON30167；同様にEXP-Os.Act1:1:1（配列番号164）を含むpMON130803；およびEXP-P-CaMV.35S-enh-1:1:13/L-CaMV.35S-1:1:2/I-Os.Act1-1:1:19（配列番号139）を含むpMON132804）を構築し、それを使って、下記表37に列挙するユビキチンEXP配列によって駆動される相対的CP4発現レベルを比較した。

#### 【0147】

PEGベースの形質転換法を使ってサトウキビ葉プロトプラストを形質転換した。CP4 ELISAによって決定された平均CP4発現レベルを下記表37に提示する。

[表37] サトウキビ葉プロトプラスト細胞における平均CP4タンパク質発現

#### 【表36】

| プラスミドコンストラクト | EXP配列                                                       | 配列番号 | 実験1              |                     | 実験2              |                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------|------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|
|              |                                                             |      | CP4<br>平均<br>ppm | CP4<br>STDEV<br>ppm | CP4<br>平均<br>ppm | CP4<br>STDEV<br>ppm |
| pMON132804   | EXP-P-CaMV.35S-enh-1:1:13/L-CaMV.35S-1:1:2/I-Os.Act1-1:1:19 | 173  | 557.97           | 194.05              | 283.63           | 95.8                |
| pMON30167    | EXP-Os.Act1:1:1                                             | 164  | 57.15            | 20.99               | 18.36            | 5.41                |
| pMON130803   | EXP-Os.Act1:1:1                                             | 164  | 34.26            | 1.61                | 16.57            | 3.71                |
| pMON129203   | EXP-Sv.Ubq1:1:7                                             | 128  | 89.2             | 32.46               | 56.86            | 9.55                |
| pMON129204   | EXP-Sv.Ubq1:1:8                                             | 132  | 87.2             | 45.87               | 98.46            | 12.93               |
| pMON129205   | EXP-Sv.Ubq1:1:9                                             | 133  | 263.57           | 70.14               | 72.53            | 9.25                |
| pMON129210   | EXP-Zm.UbqM1:1:6                                            | 137  | 353.08           | 29.16               | 199.31           | 41.7                |
| pMON129211   | EXP-Zm.UbqM1:1:8                                            | 145  | 748.18           | 15.1                | 411.24           | 17.12               |
| pMON129212   | EXP-Zm.UbqM1:1:7                                            | 141  | 454.88           | 75.77               | 215.06           | 23.22               |
| pMON129200   | EXP-SETit.Ubq1:1:5                                          | 117  | 150.74           | 63.21               | 91.71            | 41.35               |
| pMON129201   | EXP-SETit.Ubq1:1:7                                          | 123  | 119.57           | 58.1                | 102.72           | 31.12               |
| pMON129202   | EXP-SETit.Ubq1:1:6                                          | 124  | 43.79            | 25.77               | 97.63            | 46.07               |
| pMON129219   | EXP-Sb.Ubq4:1:2                                             | 151  | 95.63            | 38.69               |                  |                     |
| pMON129218   | EXP-Sb.Ubq6:1:2                                             | 153  | 343.34           | 119.2               | 179.75           | 51.16               |
| pMON129221   | EXP-Cl.Ubq1:1:10                                            | 98   | 374.8            | 205.28              | 258.93           | 38.03               |

#### 【0148】

上記表37からわかるように、EXP配列は、サトウキビプロトプラストにおいてCP4発現を駆動する能力を示した。発現のレベルは、EXP-Os.Act1:1:1（配列番号164）によって駆動されるCP4発現のレベルと類似しているか、またはそれより高かった。一つのEXP配列、EXP-Zm.UbqM1:1:8（配列番号145）は、サトウキビプロトプラストにおいて、EXP-P-CaMV.35S-enh-1:1:13/L-CaMV.35S-1:1:2/I-Os.Act1-1:1:19（配列番号139）と比較して、より高い発現レベルを示した。

#### 【0149】

実施例11：CP4導入遺伝子カセットアンプリコンを使ったサトウキビプロトプラストにおけるCP4を駆動する調節要素の解析

この実施例では、サトウキビプロトプラストにおけるグリホサート耐性遺伝子CP4の発現を駆動するEXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）の能力を例証する。これらのEXP配列を植物バイナリー形質転換プラスミドコンストラクトにクローニングした。その結果得られた植物発現ベクターを、T-AGRtu.nos-1:1:13 3'UTRの5'側に作動的に連結されたプラスチド標的グリホサート耐性EPSPSコード配列（CP4、US RE39247）の5'側に作動的に連結されたユビキチンEXP配列、およびA. tumefaciens由来の左境界領域から構成される導入遺伝子カセットアンプリコンを作製するための増幅テンプレートとして使用した。得られたアンプリコンを使ってサトウキビ葉プロトプラスト細胞を形質転換した。

#### 【0150】

上記実施例2で述べたように、PEGベースの形質転換法を使って、サトウキビ葉プロトプラストを形質転換した。両CP4の測定は、ELISAベースのアッセイを使って行った。

#### 【0151】

EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）、EXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）およびEXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）から構成されるアンプリコンによって駆動されるCP4の発現を、形質転換されたコムギ葉プロトプラストにおいてアッセイし、構成的対照EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1（配列番号170）およびEXP-Os.Act1:1:1（配列番号164）によって駆動されるCP4発現レベルと比較した。百万分率（ppm）で表したCP4タンパク質発現の平均レベルを下記表38に示す。

[表38] サトウキビ葉プロトプラストにおける平均CP4タンパク質発現

【表 37】

| アンブリコン<br>テンプレート | アンブリ<br>コン<br>ID | EXP配列                            | 配列<br>番号 | CP4 ng/mg<br>総タンパク質<br>平均 | CP4 ng/mg<br>総タンパク質<br>STDEV |
|------------------|------------------|----------------------------------|----------|---------------------------|------------------------------|
| pMON19469        | PCR24            | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1 | 170      | 99.6                      | 7.2                          |
| pMON30167        | PCR25            | EXP Os.Act1:1:1                  | 164      | 0.0                       | 0.0                          |
| pMON140896       | PCR41            | EXP-ANDge.Ubq1:1:7               | 5        | 21.9                      | 3.3                          |
| pMON140917       | PCR42            | EXP-ANDge.Ubq1:1:8               | 8        | 15.4                      | 1.9                          |
| pMON140897       | PCR43            | EXP-ANDge.Ubq1:1:10              | 10       | 20.7                      | 2.2                          |
| pMON140898       | PCR44            | EXP-ANDge.Ubq1:1:6               | 12       | 21.8                      | 2.8                          |
| pMON140899       | PCR45            | EXP-ANDge.Ubq1:1:11              | 14       | 36.9                      | 7.2                          |
| pMON140900       | PCR46            | EXP-ANDge.Ubq1:1:12              | 16       | 51.7                      | 5.6                          |
| pMON140904       | PCR50            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:9               | 22       | 10.3                      | 1.1                          |
| pMON140905       | PCR51            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:10              | 25       | 25.3                      | 4.7                          |
| pMON140906       | PCR52            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8               | 27       | 29.9                      | 4.6                          |
| pMON140907       | PCR53            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:11              | 29       | 44.0                      | 7.1                          |
| pMON140908       | PCR54            | EXP-ERIRA.Ubq1:1:12              | 31       | 37.0                      | 5.4                          |
| pMON140913       | PCR19            | EXP-Cl.Ubq1:1:10                 | 98       | 19.2                      | 1.3                          |
| pMON140914       | PCR20            | EXP-Cl.Ubq1:1:13                 | 114      | 20.5                      | 2.1                          |
| pMON140915       | PCR21            | EXP Cl.Ubq1:1:14                 | 115      | 23.2                      | 1.6                          |
| pMON140916       | PCR22            | EXP-Cl.Ubq1:1:15                 | 116      | 0.0                       | 0.0                          |

10

## 【0152】

上記表38からわかるように、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:7（配列番号5）、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ANDge.Ubq1:1:10（配列番号10）、EXP-ANDge.Ubq1:1:6（配列番号12）、EXP-ANDge.Ubq1:1:11（配列番号14）、EXP-ANDge.Ubq1:1:12（配列番号16）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:9（配列番号22）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:10（配列番号25）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:11（配列番号29）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:12（配列番号31）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Cl.Ubq1:1:13（配列番号114）およびEXP-Cl.Ubq1:1:14（配列番号115）は、CP4発現を駆動することができた。EXP-Cl.Ubq1:1:15（配列番号116）は、このアッセイではCP4を発現させないようだった。

20

## 【0153】

## 実施例12：トランスジェニックトウモロコシにおけるGUSを駆動する調節要素の解析

トウモロコシ植物を、 $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）導入遺伝子の発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクターで形質転換し、その結果生じた植物をGUSタンパク質発現について解析した。当技術分野において知られている方法を使ってユビキチンEXP配列を植物バイナリー形質転換プラスミドコンストラクトにクローニングした。

30

## 【0154】

その結果得られた植物発現ベクターは、*A. tumefaciens*由来の右境界領域、イネ脂質輸送タンパク質遺伝子由来の3'UTR（T-Os.LTP-1:1:1、配列番号141）の5'側に作動的に連結された、上述のプロセッシング可能なイントロンを有する $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）のコード配列GUS-2に作動的に連結されたEXP配列をアッセイするための第1導入遺伝子カセット；除草剤グリホサートに対する耐性を付与する、形質転換された植物細胞の選択に使用される第2導入遺伝子選択カセット（イネアクチン1プロモーターによって駆動される）、および*A. tumefaciens*由来の左境界領域を含有する。得られたプラスミドを使って、トウモロコシ植物を形質転換した。表39に、表1にも記載したプラスミドの名称、EXP配列および配列番号を列挙する。

40

[表39] バイナリー植物形質転換プラスミドおよび関連EXP配列

【表 3 8】

| プラスミド<br>コンストラクト | EXP配列                | 配列<br>番号 | データ                              |
|------------------|----------------------|----------|----------------------------------|
| pMON142865       | EXP-ANDge. Ubq1:1:8  | 8        | R <sub>0</sub> およびR <sub>1</sub> |
| pMON142864       | EXP-ERIRA. Ubq1:1:8  | 27       | R <sub>0</sub> およびR <sub>1</sub> |
| pMON142729       | EXP-C1. Ubq1:1:12    | 90       | R <sub>0</sub>                   |
| pMON142730       | EXP-C1. Ubq1:1:11    | 95       | R <sub>0</sub>                   |
| pMON132047       | EXP-C1. Ubq1:1:23    | 108      | R <sub>0</sub>                   |
| pMON132037       | EXP-SETit. Ubq1:1:10 | 119      | R <sub>0</sub> およびF <sub>1</sub> |
| pMON131957       | EXP-SETit. Ubq1:1:11 | 125      | F1                               |
| pMON131958       | EXP-Sv. Ubq1:1:11    | 130      | R <sub>0</sub> およびF <sub>1</sub> |
| pMON131959       | EXP-Sv. Ubq1:1:12    | 136      | R <sub>0</sub>                   |
| pMON131961       | EXP-Zm. UbqM1:1:10   | 139      | R <sub>0</sub>                   |
| pMON131963       | EXP-Zm. UbqM1:1:12   | 143      | R <sub>0</sub>                   |
| pMON131962       | EXP-Zm. UbqM1:1:11   | 149      | R <sub>0</sub>                   |
| pMON132932       | EXP-Sb. Ubq4:1:2     | 151      | R <sub>0</sub>                   |
| pMON132931       | EXP-Sb. Ubq6:1:3     | 155      | R <sub>0</sub>                   |
| pMON132974       | EXP-Sb. Ubq7:1:2     | 157      | R <sub>0</sub> およびF <sub>1</sub> |

10

## 【0 1 5 5】

20

例えば米国特許出願公開第20090138985号に記載されているように、Agrobacteriumによる形質転換を使って、植物を形質転換した。

## 【0 1 5 6】

形質転換された植物の定性的発現解析には、組織化学的GUS解析を使用した。全組織切片をGUS染色溶液X-Gluc（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-b-グルクロニド）（1ミリグラム/ミリリットル）と共に適当な時間にわたってインキュベートし、すすぎ、青い着色について目視検査した。選ばれた植物器官および組織を使って、直接的な目視検査または顕微鏡下の検査により、GUS活性を定性的に決定した。R<sub>0</sub>植物は、根および葉、ならびに受粉後21日（21DAP）の葯、絹糸および登熟中の種子と胚における発現について検査する。

30

## 【0 1 5 7】

定量的解析のために、形質転換されたトウモロコシ植物の選ばれた組織から総タンパク質を抽出した。1マイクログラムの総タンパク質を、蛍光原性基質4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド（MUG）と共に、50マイクロリットルの総反応体積中で使用した。反応生成物4-メチルウンベリフェロン（4-MU）は、ヒドロキシル基がイオン化している高pHにおいて、蛍光性が最も大きくなる。炭酸ナトリウムの塩基性溶液の添加は、アッセイを停止させると同時に、pHを蛍光生成物の定量用に調節する。蛍光は、励起波長365nm、蛍光波長445nmで、Fluoromax-3（堀場；日本国京都）とMicromax Readerとを使って、スリット幅を励起2nmおよび蛍光3nmに設定して測定した。

## 【0 1 5 8】

40

各形質転換について観察された平均R<sub>0</sub> GUS発現を下記表40および表41に提示する。pMON131957（EXP-SETit. Ubq1:1:11、配列番号125）で形質転換された形質転換体で行ったR<sub>0</sub> GUSアッセイは、品質基準を満たさなかった。これらの形質転換体はF1世代でアッセイし、この実施例ではさらに下に提示する。

〔表40〕 根および葉組織における平均R<sub>0</sub> GUS発現

【表 3 9】

| EXP配列                | 配列<br>番号 | V3<br>根 | V4<br>根 | V7<br>根 | VT<br>根 | V3<br>葉 | V4<br>葉 | V7<br>葉 | VT<br>葉 |
|----------------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| EXP-ANDge. Ubq1:1:8  | 8        | nd      | 255     | 199     | 70      | nd      | 638     | 168     | 130     |
| EXP-ERIRA. Ubq1:1:8  | 27       | nd      | 477     | 246     | 62      | nd      | 888     | 305     | 242     |
| EXP-Cl. Ubq1:1:12    | 90       | nd      | 27      | 147     | 52      | nd      | 75      | 189     | 199     |
| EXP-Cl. Ubq1:1:11    | 95       | nd      | 28      | 77      | 50      | nd      | 101     | 177     | 223     |
| EXP-Cl. Ubq1:1:23    | 108      | 0       | nd      | 75      | 34      | 201     | nd      | 194     | 200     |
| EXP-SETit. Ubq1:1:10 | 119      | 0       | nd      | 29      | 57      | 58      | nd      | 37      | 46      |
| EXP-Sv. Ubq1:1:11    | 130      | nd      | nd      | nd      | 9       | 20      | nd      | 55      | 29      |
| EXP-Sv. Ubq1:1:12    | 136      | 63      | nd      | 0       | 28      | 184     | nd      | 27      | 16      |
| EXP-Zm. UbqM1:1:10   | 139      | 0       | nd      | 237     | 18      | 221     | nd      | 272     | 272     |
| EXP-Zm. UbqM1:1:12   | 143      | 0       | nd      | 21      | 43      | 234     | nd      | 231     | 196     |
| EXP-Zm. UbqM1:1:11   | 149      | 124     | nd      | 103     | 112     | 311     | nd      | 369     | 297     |
| EXP-Sb. Ubq4:1:2     | 151      | 125     | nd      | 0       | 95      | 233     | nd      | 150     | 88      |
| EXP-Sb. Ubq6:1:3     | 155      | 154     | nd      | 13      | 128     | 53      | nd      | 39      | 55      |
| EXP-Sb. Ubq7:1:2     | 157      | 37      | nd      | 22      | 18      | 165     | nd      | 89      | 177     |

【表41】 トウモロコシ生殖器官（葯、絹糸）ならびに登熟種子（胚および内乳）における平均 $R_0$  GUS発現

【表 4 0】

| EXP配列                | 配列<br>番号 | VT<br>葯 | VT/R1<br>絹糸 | 21DAP<br>胚 | 21DAP<br>内乳 |
|----------------------|----------|---------|-------------|------------|-------------|
| EXP-ANDge. Ubq1:1:8  | 8        | 247     | 256         | 24         | 54          |
| EXP-ERIRA. Ubq1:1:8  | 27       | 246     | 237         | 36         | 61          |
| EXP-Cl. Ubq1:1:12    | 90       | 420     | 121         | 26         | 220         |
| EXP-Cl. Ubq1:1:11    | 95       | 326     | 227         | 41         | 221         |
| EXP-Cl. Ubq1:1:23    | 108      | 598     | 416         | 212        | 234         |
| EXP-SETit. Ubq1:1:10 | 119      | 132     | 85          | 50         | 63          |
| EXP-Sv. Ubq1:1:11    | 130      | 217     | 3           | 45         | 92          |
| EXP-Sv. Ubq1:1:12    | 136      | 120     | 21          | 49         | 112         |
| EXP-Zm. UbqM1:1:10   | 139      | 261     | 506         | 403        | 376         |
| EXP-Zm. UbqM1:1:12   | 143      | 775     | 362         | 253        | 247         |
| EXP-Zm. UbqM1:1:11   | 149      | 551     | 452         | 234        | 302         |
| EXP-Sb. Ubq4:1:2     | 151      | 213     | 0           | 25         | 79          |
| EXP-Sb. Ubq6:1:3     | 155      | 295     | 87          | 51         | 61          |
| EXP-Sb. Ubq7:1:2     | 157      | 423     | 229         | 274        | 90          |

【0159】

$R_0$  トウモロコシ植物では、葉および根におけるGUS発現レベルは、ユビキチンEXP配列間で異なった。EXP配列はいずれも、安定に形質転換された植物におけるGUS導入遺伝子発現を駆動する能力を示したが、各EXP配列は、互いにユニークな発現パターンを示した。例えば、EXP-ANDge. Ubq1:1:8（配列番号8）およびEXP-ERIRA. Ubq1:1:8（配列番号27）については、高レベルのGUS発現が、根発生の初期（V4およびV7）において観察され、VT期までに減退した。EXP-Zm. UbqM1:1:10（配列番号139）によって駆動される根発現は、V3では発現を示さなかったが、V7では高く、VT期までに低下した。EXP-Zm. UbqM1:1:11（配列番号149）によって駆動される根発現は、V3期、V7期からVT期に至る発生の間ずっと類似するレベルに維持された。EXP-Cl. Ubq1:1:12（配列番号90）、EXP-Cl. Ubq1:1:11（配列番号95）およびEXP-Cl. Ubq1:1:23（配列番号108）で形質転換された植物では、根発現は、発生初期（V3/V4）からV7期まで増加した後、V7期からV8期にかけて低下することが観察された。GUS発現レベルは、葉組織でも同様に劇的な相違を示した。最も高レベルの葉発現

は、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）およびEXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）により、発生初期（V3/V4）に付与され、V7期からVT期にかけては、それが減退する。EXP-Zm.UbqM1:1:10（配列番号139）、EXP-Zm.UbqM1:1:11（配列番号149）、EXP-Zm.UbqM1:1:12（配列番号143）およびEXP-Cl.Ubq1:1:23（配列番号108）を使用すると、GUS発現はV3期からVT期まで保たれ；EXP-SETit.Ubq1:1:10（配列番号119）およびEXP-Sb.Ubq6:1:3（配列番号155）を使用した場合も、程度は低いものの、保たれる。EXP-Cl.Ubq1:1:12（配列番号90）、EXP-Cl.Ubq1:1:11（配列番号95）およびEXP-Cl.Ubq1:1:23（配列番号108）を使用すると、葉における発現は、V3期からV7～VT期まで増加したが、EXP-Sv.Ubq1:1:12（配列番号136）およびEXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）を使用した場合は、V3からVT期まで発現は減退した。

10

#### 【0160】

同様に、生殖組織（葯および絹糸）ならびに登熟種子（21DAPの胚および内乳）についても、各EXP配列にユニークな異なる発現パターンが観察された。例えば、葯および絹糸ならびに登熟種子には、EXP-Zm.UbqM1:1:10（配列番号139）、EXP-Zm.UbqM1:1:11（配列番号149）、EXP-Zm.UbqM1:1:12（配列番号143）およびEXP-Cl.Ubq1:1:23（配列番号108）を使用した場合に、高レベルの発現が観察された。EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）およびEXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）を使用した場合、発現は、葯および絹糸では高かったが、登熟種子では低かった。EXP-Sb.Ubq7:1:2（配列番号157）によって駆動される発現は、生殖組織では高く、登熟胚でも高かったが、登熟内乳では低かった。EXP配列、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）は、葯だけで発現を示し、絹糸では発現を示さず、登熟種子では、はるかに弱い発現だった。EXP-Sv.Ubq1:1:11（配列番号130）は、生殖組織および登熟種子については、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）と類似するパターンを示したが、EXP-Sb.Ubq4:1:2（配列番号151）が根および葉組織における発現を示したのに対して、EXP-Sv.Ubq1:1:11（配列番号130）では、これらと同じ組織における発現が、はるかに低かった。

20

#### 【0161】

種子のF<sub>1</sub>またはR<sub>1</sub>集団を作出するために、単コピー挿入について選択したR<sub>0</sub>世代の形質転換体を、非トランスジェニックLH244系統と交配するか（F<sub>1</sub>をもたらす）、または自家受粉させた（R<sub>1</sub>をもたらす）。どちらの場合も、ヘテロ接合型F<sub>1</sub>またはR<sub>1</sub>植物を研究用に選択した。先に述べたように発生の過程を通して、GUS発現レベルを、選択した組織で測定した。この研究に使用したF<sub>1</sub>またはR<sub>1</sub>組織には、発芽後4日（4DAG）の吸水種子胚、吸水種子内乳、根および子葉鞘（coleoptide）；V3期の葉および根；V8期の根および成熟葉；根、成熟葉、VT期（タッセリング時、生殖前）の葯、花粉、葉 および老化葉；R1穂軸、絹糸、根および節間；受粉後12日（12DAP）の穀粒ならびに；21DAPおよび38DAPの胚および内乳を含めた。pMON132037（EXP-SETit.Ubq1:1:10、配列番号119）、pMON131957（EXP-SETit.Ubq1:1:11、配列番号125）、pMON131958（EXP-Sv.Ubq1:1:11、配列番号130）およびpMON132974（EXP-Sb.Ubq7:1:2、配列番号157）を含む形質転換体については、渇水および寒冷ストレスの条件に曝したF<sub>1</sub>植物でも、選ばれた組織試料を解析した。V3根および葉組織を、寒冷および渇水曝露後にサンプリングした。

30

#### 【0162】

pMON132037（EXP-SETit.Ubq1:1:10、配列番号119）、pMON131957（EXP-SETit.Ubq1:1:11、配列番号125）、pMON131958（EXP-Sv.Ubq1:1:11、配列番号130）およびpMON132974（EXP-Sb.Ubq7:1:2、配列番号157）で形質転換されたF<sub>1</sub>V3植物において、灌水を4日間差し控えて、含水量を、十分に灌水された植物の元の含水量の少なくとも50%は減少させることによって、渇水ストレスを誘導した。渇水プロトコールは、基本的に次のステップから構成された。V3期植物の水を枯渇させた。トウモロコシ植物が渇水を感じると、葉の形状は、通常の健全な開いた外観から、中肋維管束での折りたたみを示して葉頂から茎に向かって見た場合にV字状の外観を呈する葉へと変化するであろう。この形態上の変化は通常、灌水の停止から約2日後までに始まり、灌水停止前の鉢の重量と無灌水植物において巻葉形態が観察された時の鉢の重量とによって測定すると、50%前後の水分喪失を伴うことが

40

50

、初期の実験において示された。植物は、葉が、葉の内向きの弯曲（V字状）からわかるようにしおれを示した場合に、渇水条件下にあるとみなした。このレベルのストレスは重致死性ストレスの一形態であると考えられる。ひとたび各植物が上に定義した渇水誘導を示したら、その植物を破壊して、根試料と葉試料の両方を獲得した。

#### 【0163】

調節要素がGUSの寒冷誘導性発現を示すかどうかを決定するために、渇水に加えて、pMON132037（EXP-SETit.Ubq1:1:10、配列番号119）、pMON131957（EXP-SETit.Ubq1:1:11、配列番号125）、pMON131958（EXP-Sv.Ubq1:1:11、配列番号130）およびpMON132974（EXP-Sb.Ubq7:1:2、配列番号157）で形質転換されたF<sub>1</sub>V3期植物を、寒冷条件にもさらした。植物全体をV3期における寒冷ストレス下でのGUS発現の誘導についてアッセイした。V3期トウモロコシ植物をグロースチャンバーにおいて24時間、12℃の温度にさらした。グロースチャンバー中の植物は、800マイクロモル/平方メートル/秒の白色光フルエンス下、白色光10時間および暗所14時間の光サイクルで成長させた。寒冷曝露後に、GUS発現定量用に葉および根組織をサンプリングした。

#### 【0164】

GUS発現を上述のように測定した。各組織試料について決定された平均F<sub>1</sub> GUS発現を下記表42および表43に提示する。

[表42] pMON142864およびpMON142865で形質転換された植物における平均F<sub>1</sub>GUS発現

#### 【表41】

| 器官            | pMON142864 | pMON142865 |
|---------------|------------|------------|
| V3葉           | 86         | 74         |
| V3根           | 41         | 52         |
| V8葉           | 109        | 123        |
| V8根           | 241        | 252        |
| VT花、葯         | 168        | 208        |
| VT葉           | 158        | 104        |
| R1穂軸          | 171        | 224        |
| R1絹糸          | 314        | 274        |
| R1根           | 721        | 308        |
| R1節間          | 428        | 364        |
| R2種子-12DAP    | 109        | 72         |
| R3種子-21DAP-胚  | 45         | 32         |
| R3種子-21DAP-内乳 | 175        | 196        |
| R5種子-38DAP-胚  | 163        | 58         |
| R5種子-38DAP-内乳 | 90         | 69         |

[表43] pMON132037、pMON131957、pMON131958およびpMON132974で形質転換された植物における平均F<sub>1</sub>GUS発現

【表 4 2】

| 器官            | pMON132037 | pMON131957 | pMON131958 | pMON132974 |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| 吸水種子胚         | 536        | 285        | 288        | 1190       |
| 吸水種子内乳        | 95         | 71         | 73         | 316        |
| 子葉鞘-4DAG      | 218        | 60         | 143        | 136        |
| 根-4DAG        | 74         | 33         | 101        | 48         |
| V3葉           | 104        | 120        | 66         | 52         |
| V3根           | 74         | 71         | 81         | 194        |
| V3葉-寒冷        | 73         | 15         | 72         | N/A        |
| V3根-寒冷        | 113        | 44         | 89         | 49         |
| V3葉-干ばつ       | 97         | 344        | 103        | 157        |
| V3根-干ばつ       | 205        | 153        | 129        | 236        |
| V8葉           | 185        | 142        | 77         | 282        |
| V8根           | 33         | 16         | 61         | 28         |
| VT花-葯         | 968        | 625        | 619        | 888        |
| VT葉           | 138        | 89         | 132        | 268        |
| VT葉-老化        | 121        | 100        | 156        | 345        |
| VT花粉          | 610        | 1119       | 332        | 4249       |
| R1穂軸          | 291        | 70         | 168        | 127        |
| R1絹糸          | 164        | 124        | 167        | 101        |
| R1根           | 36         | 39         | 39         | 21         |
| R1節間          | 255        | 89         | 232        | 141        |
| R2種子-12DAP    | 138        | 170        | 165        | 169        |
| R3種子-21DAP-胚  | 94         | 97         | 489        | 389        |
| R3種子-21DAP-内乳 | 57         | 118        | 52         | 217        |
| R5種子-38DAP-胚  | 600        | 147        | 377        | 527        |
| R5種子-38DAP-内乳 | 58         | 36         | 57         | 106        |

## 【0165】

F<sub>1</sub>トウモロコシ植物では、サンプリングしたさまざまな組織におけるGUS発現レベルが、ユビキチンEXP配列間で異なった。全てのEXP配列が、安定に形質転換されたF<sub>1</sub>トウモロコシ植物においてGUS導入遺伝子発現を駆動する能力を示したが、各EXP配列は互いにユニークな発現パターンを示した。例えばR1根発現は、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）では、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）の約2倍だった。38DAPの登熟種子胚におけるGUS発現は、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）ではEXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）より、ほとんど3倍高い。対照的に、V3およびV8期における葉および根発現は、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）でもEXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）でもほぼ同じである。

## 【0166】

吸水種子（胚および内乳組織）におけるF<sub>1</sub> GUS発現は、EXP-Sb.Ubq7:1:2（配列番号157）で形質転換された植物の方が、EXP-SETit.Ubq1:1:10（配列番号119）、EXP-SETit.Ubq1:1:11（配列番号125）およびEXP-Sv.Ubq1:1:11（配列番号130）で形質転換されたものより、はるかに高かった。渇水は、EXP-SETit.Ubq1:1:10（配列番号119）、EXP-SETit.Ubq1:1:11（配列番号125）、EXP-Sv.Ubq1:1:11（配列番号130）およびEXP-Sb.Ubq7:1:2（配列番号157）で形質転換された植物においてV3根発現の増加を引き起こしたが、葉発現の増加は、EXP-SETit.Ubq1:1:11（配列番号125）、EXP-Sv.Ubq1:1:11（配列番号130）およびEXP-Sb.Ubq7:1:2（配列番号157）で形質転換された植物だけで起こった。渇水が強化するV3発現は、EXP-SETit.Ubq1:1:11（配列番号125）を使った場合に最大だった。花粉発現も、EXP-Sb.Ubq7:1:2（配列番号157）で形質転換された植物の方が、EXP-SETit.Ubq1:1:10（配列番号119）、EXP-SETit.Ubq1:1:11（配列番号125）およびEXP-Sv.Ubq1:1:11（配列番号130）で形質転換されたものよりはるかに高かった。R1節間における発現は、EXP-SETit.Ubq1:1:10（配列番号119）およびEXP-Sv.Ubq1:1:11（配列番号130）で最大であり、EXP-SETit.Ubq1:1:11（配列番号125）で形質転換された植物では最低だった。

## 【0167】

10

20

30

40

50

各EXP配列は、安定に形質転換されたトウモロコシ植物において導入遺伝子発現を駆動する能力を示した。しかし各EXP配列は組織ごとにユニークな発現パターンを有し、所望の結果を達成するために必要な組織発現戦略に応じて特定導入遺伝子の発現を最もよくもたらすであろうEXP発現を選択する機会を与える。この実施例は、相同遺伝子から単離されたEXP配列が形質転換植物において必ずしも等価に挙動しないこと、および発現は、各EXP配列に関する性質の実験的調査によって決定するしかなく、それが由来するプロモーターの遺伝子相同性に基づいて予測することはできないことを実証している。

#### 【0168】

#### 実施例13：トランスジェニックトウモロコシにおけるCP4を駆動する調節要素の解析

CP4導入遺伝子の発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクターでトウモロコシ植物を形質転換し、その結果得られた植物をCP4タンパク質発現について解析した。

#### 【0169】

EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Sv.Ubq1:1:9（配列番号133）およびEXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）を植物バイナリー形質転換プラスミドコンストラクトにクローニングした。その結果得られたベクターは、*Agrobacterium tumefaciens*由来の右境界領域、T-AGRTU.nos-1:1:13（配列番号127）3'UTRの5'側に作動的に連結されたプラスチド標的グリホサート耐性EPSPSコード配列（CP4、US RE39247）の5'側に作動的に連結されたユビキチンEXP配列、および*A. tumefaciens*由来の左境界領域を含有した。下記表44に、トウモロコシを形質転換するために使用したプラスミドコンストラクトと、対応するEXP配列を示す。

〔表44〕 トウモロコシを形質転換するために使用したCP4プラスミドコンストラクトおよび対応するEXP配列

#### 【表43】

| プラスミドコンストラクト | EXP配列              | 配列番号 | データ                              |
|--------------|--------------------|------|----------------------------------|
| pMON141619   | EXP-ANDge.Ubq1:1:8 | 8    | R <sub>0</sub> およびF <sub>1</sub> |
| pMON142862   | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8 | 27   | R <sub>0</sub> およびF <sub>1</sub> |
| pMON129221   | EXP-Cl.Ubq1:1:10   | 98   | R <sub>0</sub> およびF <sub>1</sub> |
| pMON129205   | EXP-Sv.Ubq1:1:9    | 133  | R <sub>0</sub> およびF <sub>1</sub> |
| pMON129212   | EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141  | R <sub>0</sub>                   |

#### 【0170】

得られたプラスミドを使ってトウモロコシ植物を形質転換した。形質転換された植物を、1コピーまたは2コピーの挿入T-DNAについて選択し、温室で成長させた。選ばれた組織を特定の発生段階においてR<sub>0</sub>形質転換植物からサンプリングし、CP4 ELISAアッセイを使って、それらの組織におけるCP4タンパク質レベルを測定した。各形質転換について観察された平均CP4発現を、下記表45および表46に提示し、図7に図示する。

〔表45〕 R<sub>0</sub>形質転換トウモロコシ植物における平均葉および根CP4発現

#### 【表44】

| EXP配列              | 配列番号 | V4葉   | V7葉   | VT葉   | V4根   | V7根   | VT根   |
|--------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| EXP ANDge.Ubq1:1:8 | 8    | 20.90 | 18.53 | 25.49 | 11.50 | 26.54 | 17.20 |
| EXP-ERIRA.Ubq1:1:8 | 27   | 19.92 | 16.60 | 25.58 | 9.92  | 26.31 | 13.33 |
| EXP Cl.Ubq1:1:10   | 98   | 10.70 | 12.49 | 17.42 | 7.56  | 13.95 | 6.68  |
| EXP-Sv.Ubq1:1:9    | 133  | 3.72  | 4.34  | 4.48  | 2.90  | 6.99  | 2.78  |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141  | 13.42 | 21.89 | 38.78 | 9.56  | 16.69 | 11.15 |

〔表46〕 R<sub>0</sub>形質転換トウモロコシ植物の生殖組織および登熟種子における平均CP4発現

【表 4 5】

| EXP配列              | 配列<br>番号 | VT<br>雄穂 | R1<br>絹糸 | R3<br>胚 | R3<br>内乳 |
|--------------------|----------|----------|----------|---------|----------|
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8 | 8        | 24.14    | 5.55     | 7.29    | 4.91     |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8 | 27       | 19.20    | 10.27    | 12.60   | 4.70     |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10   | 98       | 18.70    | 16.21    | 8.26    | 8.82     |
| EXP-Sv.Ubq1:1:9    | 133      | 7.10     | 4.72     | 3.13    | 1.74     |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141      | 67.25    | 11.21    | 7.85    | 10.69    |

10

## 【0 1 7 1】

表45および表46からわかるように、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ERlra.Ubq1:1:8（配列番号27）、EXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）、EXP-Sv.Ubq1:1:9（配列番号133）およびEXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）は、それぞれ、R<sub>0</sub>形質転換植物からサンプリングされた全ての組織においてCP4発現を駆動することができた。CP4を駆動するEXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）およびEXP-ERlra.Ubq1:1:8（配列番号27）を含む形質転換体の根および葉におけるCP4の発現が、CP4を駆動するEXP-Cl.Ubq1:1:10（配列番号98）より高いことは、これらの形質転換体の集団で観察されるグリホサート施用に対する栄養耐性（vegetative tolerance）のレベルに関係づけることができる（下記実施例14参照）。

20

## 【0 1 7 2】

各EXP配列は、サンプリングした各組織ごとに、発現のレベルに関してユニークな発現パターンを示した。例えば、葉、根および雄穂におけるCP4発現は、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）およびEXP-ERlra.Ubq1:1:8（配列番号27）については類似しており、EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）を使った絹糸における発現は、ERlra.Ubq1:1:8（配列番号21）によって駆動される発現の半分だった。これは、構成的発現が望まれるが絹糸組織での発現は少ないことが好ましい導入遺伝子の発現にとっては、有利であるかもしれない。EXP配列は、R<sub>0</sub>形質転換トウモロコシ植物において、ユニークなCP4構成的発現パターンを示す。

## 【0 1 7 3】

30

F<sub>1</sub>種子を作るために、R<sub>0</sub>形質転換トウモロコシ植物を非トランスジェニックLH244品種と交配した。その結果得られたF<sub>1</sub>世代種子を、導入遺伝子カセットの分離について解析し、CP4カセットについてヘテロ接合の植物をCP4発現の分析のために選択した。種子を温室で成長させ、植物の群を2つ作り、一方の群にはグリホサートを散布し、他方には散布しなかった。選ばれた組織におけるCP4の発現を、ELISAに基づく標準的アッセイを使って解析した。平均CP4発現を下記表47および表48に示す。

〔表47〕 F<sub>1</sub>形質転換トウモロコシ植物における平均CP4発現

【表 4 6】

| 器官            | pMON141619 | pMON14286<br>2 | pMON12922<br>1 |
|---------------|------------|----------------|----------------|
| V4葉           | 11.50      | 13.51          | 7.68           |
| V4根           | 12.48      | 12.60          | 10.29          |
| V7葉           | 16.59      | 20.21          | 12.01          |
| V7根           | 11.00      | 13.62          | 8.15           |
| VT葉           | 39.88      | 44.85          | 29.42          |
| VT根           | 17.43      | 21.83          | 13.43          |
| VT花, 葯        | 52.74      | 55.72          | 53.62          |
| R1絹糸          | 16.01      | 23.81          | 14.42          |
| R3種子-21DAP-胚  | 33.29      | 57.96          | 51.64          |
| R3種子-21DAP-内乳 | 2.99       | 3.20           | 6.44           |

10

## 【0 1 7 4】

上記表47からわかるように、葉および根におけるCP4発現は、pMON141619 (EXP-ANDge.Ubq1:1:8、配列番号5) およびpMON142862 (EXP-ERIRA.Ubq1:1:8、配列番号27) で形質転換されたF<sub>1</sub>形質転換体の方が、pMON129221 (EXP-Cl.Ubq1:1:10、配列番号98) で形質転換されたものより高かった。葯組織における発現は3つのEXP配列の全てで類似していたが、絹糸における発現はEXP-ERIRA.Ubq1:1:8 (配列番号27) を使った場合が最も高かった。登熟胚 (21DAP) における発現は、CP4を駆動するEXP-ERIRA.Ubq1:1:8 (配列番号27) およびEXP-Cl.Ubq1:1:10 (配列番号98) を含む形質転換体が最も高かった。登熟内乳における発現は、CP4を駆動するEXP-Cl.Ubq1:1:10 (配列番号98) を含む形質転換体の方が高かった

20

[表48] F<sub>1</sub>形質転換トウモロコシ植物における平均CP4発現

【表 4 7】

| 器官            | pMON12920<br>5 |
|---------------|----------------|
| V4葉           | 1.73           |
| V4根           | 2.44           |
| V7葉           | 2.84           |
| V7根           | 1.51           |
| VT葉           | 3.29           |
| VT根           | 2.63           |
| VT花, 葯        | 7.52           |
| R1絹糸          | 1.99           |
| R3種子-21DAP-胚  | 3.40           |
| R3種子-21DAP-内乳 | 1.79           |

30

## 【0 1 7 5】

上記表47~48からわかるように、CP4発現は、pMON129205 (EXP-Sv.Ubq1:1:9、配列番号133) で形質転換されたF<sub>1</sub>形質転換体の全ての組織において、pMON141619 (EXP-ANDge.Ubq1:1:8、配列番号8)、pMON142862 (EXP-ERIRA.Ubq1:1:8、配列番号27) およびpMON129221 (EXP-Cl.Ubq1:1:10、配列番号98) で形質転換されたものより低かった。

## 【0 1 7 6】

アッセイしたEXP配列のそれぞれによって付与されるユニークな発現パターンは、最適な成績または有効性が得られるように導入遺伝子発現をわずかに調節する目的で発現を微調整することが可能なトランスジェニック植物を作出する機会を与える。また、異なる導

50

入遺伝子発現を駆動するこれらのEXP配列の実験的試験は、一つの特定制EXP配列が、ある特別な導入遺伝子またはある特別な導入遺伝子クラスが発現にとっては最も適切であり、同時に、異なる導入遺伝子または導入遺伝子クラスにとっては別のEXP配列が最適であることが見いだされるという結果をもたらさう。

【0177】

実施例14：R<sub>0</sub>トランスジェニックトウモロコシ植物における発育グリホサート耐性の解析

CP4導入遺伝子の発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクターでトウモロコシ植物を形質転換し、その結果得られた植物を、グリホサート施用に対する栄養耐性および生殖耐性 (reproductive tolerance) について評価した。

【0178】

pMON141619、pMON142862、pMON129221、pMON129205およびpMON129212で形質転換されていて、CP4を駆動するEXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (配列番号8)、EXP-ER1ra.Ubq1:1:8 (配列番号27)、EXP-Cl.Ubq1:1:10 (配列番号98)、EXP-Sv.Ubq1:1:9 (配列番号133) およびEXP-Zm.UbqM1:1:7 (配列番号141) をそれぞれ含む、上記実施例13で述べたF<sub>1</sub>形質転換トウモロコシ植物を、グリホサートを散布した時の栄養耐性と生殖耐性の両方について評価した。各事象につき10個のF<sub>1</sub>植物を2つの群、すなわち発生のV4期およびV8期においてグリホサート散布を受ける5つの植物からなる一群と、散布を受けない5つの植物からなるもう一つの群 (すなわち対照) とに分割した。グリホサートは、Roundup WeatherMax (登録商標) を用いる散播葉面散布施用により、1.5a.e./エーカー (a.e.; 酸当量) の施用量で施用した。7~10日後に各植物の葉を損傷について評価した。栄養耐性 (表49のVeg Tol) は、各事象について非散布植物と散布植物とを比較することで評価し、栄養耐性 (T=耐性、NT=非耐性) に関する最終的な評価が得られるように、損傷評価尺度を使用した。加えて、各事象における全ての植物について、結実をアッセイした。対照植物と散布植物の間で結実測定結果を比較し、対照と比較した散布植物の結実率に基づいて、各事象について、生殖耐性 (表49のRepro Tol) の割り当てを行った (T=耐性、NT=非耐性)。下記表49に、V4期およびV8期において散布した各事象に関して、栄養耐性評価および生殖耐性評価を示す。文字「T」は耐性を意味し、「NT」は非耐性を意味する。

[表49] V4期およびV8期における個々の形質転換トウモロコシ事象の葉損傷評価

10

20

【表 4 8】

| プラスミドコ<br>ンストラクト | EXP配列              | 配列<br>番号 | 事象   | Veg Tol<br>V4 | Veg Tol<br>V8 | Repro<br>Tol |
|------------------|--------------------|----------|------|---------------|---------------|--------------|
| pMON141619       | EXP-ANDge.Ubq1:1:8 | 8        | 事象1  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象2  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象3  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象4  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象5  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象6  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象7  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象8  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象9  | T             | T             | NT           |
| pMON142862       | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8 | 27       | 事象1  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象2  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象3  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象4  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象5  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象6  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象7  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象8  | T             | T             | T            |
|                  |                    |          | 事象9  | T             | T             | T            |
| pMON129221       | EXP-C1.Ubq1:1:10   | 98       | 事象1  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象2  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象3  | NT            | NT            | T            |
|                  |                    |          | 事象4  | NT            | NT            | T            |
|                  |                    |          | 事象5  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象6  | NT            | NT            | T            |
|                  |                    |          | 事象7  | T             | T             | T            |
| pMON129205       | EXP-Sv.Ubq1:1:9    | 133      | 事象1  | NT            | NT            |              |
|                  |                    |          | 事象2  | NT            | NT            | NT           |
|                  |                    |          | 事象3  | T             | T             | NT           |
|                  |                    |          | 事象4  | NT            | NT            |              |
|                  |                    |          | 事象5  | NT            | NT            | NT           |
|                  |                    |          | 事象6  | NT            | NT            | NT           |
|                  |                    |          | 事象7  | NT            | NT            | NT           |
| pMON129212       | EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141      | 事象1  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象2  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象3  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象4  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象5  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象6  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象7  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象8  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象9  | T             | T             |              |
|                  |                    |          | 事象10 | T             | T             |              |

【0179】

上記表49によれば、EXP配列EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）、EXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）およびEXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）を含むCP4導入遺伝子カセットを含む、アッセイした形質転換事象は全て、損傷評価がスコア10を越えることがないことから、完全な栄養耐性を示した。EXP-ANDge.Ubq1:1:8（配列番号8）を含む9つの事象のうちの4つおよびEXP-ERIRA.Ubq1:1:8（配列番号27）を含む9つの事象のうちの6つが、グリホサート施用に対して栄養的にも生殖的にも耐性であった。対照的に、EXP-C1.Ubq1:1:10（配列番号98）を含むイベントは、栄養的に耐性であるか、生殖的に耐性であるかのどちらか一方であり、両方ではなかった。EXP-Sv.Ubq1:1:9（配列番号133）を含む事象は1つだけが栄養耐性を示し、試験した事象に生殖耐性であるものはなかった。EXP-Zm.UbqM1:1:7（配列番号141）を含む事象は全てが栄養耐性を示したが、生殖耐性の評価はまだ進行中で

ある。

# 【0180】

実施例15：異なる3'端イントロン/エクソンスプライスジャンクション配列を用いた発現の解析

発現が配列のわずかな変化による影響をうけるかどうかを見るために、同じプロモーターおよびリーダーを含むが、イントロン/エクソンスプライスジャンクション配列5'-AG-3'後の3'端ヌクレオチドが異なっているGUS発現を駆動するEXP配列を含む植物発現コンストラクトで、トウモロコシおよびコムギの葉プロトプラスト細胞を形質転換した。発現を2つの構成的対照プラスミドの発現とも比較した。

# 【0181】

GUS発現カセットを含む植物発現コンストラクトを構築する。その結果得られるベクターは、T-AGRtu.nos-1:1:13（配列番号127）3'UTRの5'側に作動的に連結されているGUSコード配列の5'側に作動的に連結されたイントロン/エクソンスプライスジャンクション5'-AG-3'配列の直後の最も3'端にそれぞれ異なるヌクレオチドを含む下記表50に示すイントロン要素の5'側に作動的に連結されたリーダー配列L-Cl.Ubq1-1:1:1（配列番号81）の5'側に作動的に連結されたCoix lacryma-jobiユビキチンプロモーターP-Cl.Ubq1-1:1:1（配列番号80）から構成される。下記表50に、植物発現コンストラクトおよび対応する3'端配列を示す。

〔表50〕植物発現コンストラクト、イントロンおよびイントロン/エクソンスプライスジャンクション配列5'-AG-3'後の3'端配列

# 【表49】

| プラスミド<br>コンストラクト | EXP配列                                     | 配列<br>番号 | イントロン変異体                      | 3' スプライス部位AG<br>直後のイントロン3' 端<br>ヌクレオチド |
|------------------|-------------------------------------------|----------|-------------------------------|----------------------------------------|
| pMON140889       | EXP-Cl.Ubq1:1:10                          | 98       | I-Cl.Ubq1-1:1:6<br>(配列番号94)   | GTC                                    |
| pMON146795       | EXP-Cl.Ubq1:1:18                          | 99       | I-Cl.Ubq1-1:1:7<br>(配列番号92)   | GTG                                    |
| pMON146796       | EXP-Cl.Ubq1:1:19                          | 100      | I-Cl.Ubq1-1:1:8<br>(配列番号101)  | GCG                                    |
| pMON146797       | EXP-Cl.Ubq1:1:20                          | 102      | I-Cl.Ubq1-1:1:9<br>(配列番号103)  | GAC                                    |
| pMON146798       | EXP-Cl.Ubq1:1:21                          | 104      | I-Cl.Ubq1-1:1:10<br>(配列番号105) | ACC                                    |
| pMON146799       | EXP-Cl.Ubq1:1:22                          | 106      | I-Cl.Ubq1-1:1:11<br>(配列番号107) | GGG                                    |
| pMON146800       | EXP-Cl.Ubq1:1:23                          | 108      | I-Cl.Ubq1-1:1:12<br>(配列番号109) | GGT                                    |
| pMON146801       | EXP-Cl.Ubq1:1:24                          | 110      | I-Cl.Ubq1-1:1:13<br>(配列番号111) | CGT                                    |
| pMON146802       | EXP-Cl.Ubq1:1:25                          | 112      | I-Cl.Ubq1-1:1:14<br>(配列番号113) | TGT                                    |
| pMON25455        | EXP-Os.Act1:1:9                           | 179      |                               | 構成的対照                                  |
| pMON65328        | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163      |                               | 構成的対照                                  |

# 【0182】

トウモロコシとコムギのプロトプラストを上述のように形質転換し、GUSおよびルシフェラーゼ発現についてアッセイした。下記表51に、トウモロコシプロトプラスト発現とコムギプロトプラスト発現の両方について、平均GUSおよびRLuc値を示す。

〔表51〕トウモロコシプロトプラスト細胞およびコムギプロトプラスト細胞に関する平均GUSおよびRLuc値

【表 5 0】

| EXP配列                                         | 3' スプライ<br>ス部位AG直<br>後のイント<br>ロン3' 端ヌ<br>クレオチド | トウモロコシ    |           |              | コムギ      |          |              |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|-----------|--------------|----------|----------|--------------|
|                                               |                                                | 平均GUS     | 平均RLuc    | GUS/<br>RLuc | 平均GUS    | 平均RLuc   | GUS/<br>RLuc |
| EXP-C1.Ubq1:1:10                              | GTC                                            | 140343.0  | 93870.75  | 1.50         | 40906.25 | 17381.75 | 2.35         |
| EXP-C1.Ubq1:1:18                              | GTG                                            | 143106.25 | 60565.25  | 2.36         | 56709.00 | 17898.75 | 3.17         |
| EXP-C1.Ubq1:1:19                              | GCG                                            | 136326.83 | 88589.75  | 1.54         | 43211.00 | 17352.50 | 2.49         |
| EXP-C1.Ubq1:1:20                              | GAC                                            | 138110.83 | 104751.42 | 1.32         | 31711.50 | 17953.75 | 1.77         |
| EXP-C1.Ubq1:1:21                              | ACC                                            | 137906.75 | 72519.50  | 1.90         | 54164.17 | 17772.83 | 3.05         |
| EXP-C1.Ubq1:1:22                              | GGG                                            | 137306.83 | 92643.42  | 1.48         | 55198.25 | 14476.75 | 3.81         |
| EXP-C1.Ubq1:1:23                              | GGT                                            | 144085.50 | 64351.25  | 2.24         | 43008.83 | 13911.50 | 3.09         |
| EXP-C1.Ubq1:1:24                              | CGT                                            | 142061.50 | 65884.00  | 2.16         | 51210.50 | 15041.00 | 3.40         |
| EXP-C1.Ubq1:1:25                              | TGT                                            | 140353.00 | 61249.50  | 2.29         | 49577.75 | 15348.25 | 3.23         |
| EXP-Os.Act1:1:9                               | 構成的制御                                          | 37665.25  | 65835.50  | 0.57         | 10830.25 | 17716.50 | 0.61         |
| EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.<br>Act1:1:1 | 構成的制御                                          | 49833.75  | 41268.75  | 1.21         | 15598.83 | 14877.50 | 1.05         |

10

## 【0183】

上記表46からの各Coix lacryma-jobiユビキチンEXP配列に関するGUS/RLuc値を使って、2つの構成的対照EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）に対して発現を標準化し、下記表52に提示する。

20

〔表52〕EXP-Os.Act1:1:9（配列番号179）およびEXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1（配列番号163）に対して標準化されたCoix lacryma-jobiユビキチンEXP配列の発現値

【表 5 1】

| EXP配列                                         | 3' スプライ<br>ス部位AG直<br>後のイント<br>ロン3' 端ヌ<br>クレオチド | トウモロコシ                                   |                                                                        | コムギ                                      |                                                                        |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|                                               |                                                | EXP-Os.Act1:1:9<br>に対して標準化<br>したGUS/RLuc | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+<br>Os.Act1:1:1に<br>対して標準化<br>したGUS/RLuc | EXP-Os.Act1:1:9<br>に対して標準化<br>したGUS/RLuc | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+<br>Os.Act1:1:1に<br>対して標準化<br>したGUS/RLuc |
| EXP-C1.Ubq1:1:10                              | GTC                                            | 2.61                                     | 1.24                                                                   | 3.85                                     | 2.24                                                                   |
| EXP-C1.Ubq1:1:18                              | GTG                                            | 4.13                                     | 1.96                                                                   | 5.18                                     | 3.02                                                                   |
| EXP-C1.Ubq1:1:19                              | GCG                                            | 2.69                                     | 1.27                                                                   | 4.07                                     | 2.38                                                                   |
| EXP-C1.Ubq1:1:20                              | GAC                                            | 2.30                                     | 1.09                                                                   | 2.89                                     | 1.68                                                                   |
| EXP-C1.Ubq1:1:21                              | ACC                                            | 3.32                                     | 1.57                                                                   | 4.99                                     | 2.91                                                                   |
| EXP-C1.Ubq1:1:22                              | GGG                                            | 2.59                                     | 1.23                                                                   | 6.24                                     | 3.64                                                                   |
| EXP-C1.Ubq1:1:23                              | GGT                                            | 3.91                                     | 1.85                                                                   | 5.06                                     | 2.95                                                                   |
| EXP-C1.Ubq1:1:24                              | CGT                                            | 3.77                                     | 1.79                                                                   | 5.57                                     | 3.25                                                                   |
| EXP-C1.Ubq1:1:25                              | TGT                                            | 4.01                                     | 1.90                                                                   | 5.28                                     | 3.08                                                                   |
| EXP-Os.Act1:1:9                               | 構成的対照                                          | 1.00                                     | 0.47                                                                   | 1.00                                     | 0.58                                                                   |
| EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.<br>Act1:1:1 | 構成的対照                                          | 2.11                                     | 1.00                                                                   | 1.72                                     | 1.00                                                                   |

30

40

## 【0184】

上記表52に示すように、Coix lacryma-jobiユビキチンEXP配列のそれぞれは、トウモロコシでもコムギでも、どちらの構成的対照よりも高い発現を与えた。トウモロコシプロトプラストにおける発現は、ハトムギユビキチンEXP配列の全てについて、比較的類似していた。コムギにおける発現は、もう少し多様だった。イントロン/エクソンスプライスジャンクション配列5'-AG-3'後に異なる3'端ヌクレオチドを使用しても、EXP-C1.Ubq1:1:20（配列番号102）によって駆動されるGUSの発現を除けば、GUSの発現に劇的な影響はないようだった。EXP-C1.Ubq1:1:20は、イントロン/エクソンスプライスジャンクション5'-AG

50

-3'配列に続けて3'端ヌクレオチド配列5'-GAC-3'を含み、他のハトムギユビキチンEXP配列と比較すると、発現をわずかに低下させた。結果として生じるスプライシングされたメッセンジャーRNAの評価により、GUS発現を駆動するためにEXP-Cl.Ubq1:1:20（配列番号102）を使って発現させたmRNAの約10%は、不適正にスプライシングされることが示された。他のハトムギユビキチンEXP配列を使ったGUS発現に起因するmRNAは、適切にプロセシングされるようだった。この実験は、表2に提示したイントロン変異体のいずれについても、イントロン要素I-Cl.Ubq1-1:1:9（配列番号103）だけに付随して見いだされる3'端配列5'-GAC-3'を除けば、どの3'端ヌクレオチドでも、導入遺伝子発現カセットにおける使用に適しており、活性およびプロセシングの有意な喪失を伴わないはずであることの証拠になる。

10

#### 【0185】

##### 実施例16：調節要素由来のエンハンサー

エンハンサーは、ここに提供されるプロモーター要素、例えば配列番号2、6、9、11、13、15、17、19、23、26、28、30、32、34、38、40、42、46、50、56、60、64、66、70、74、76、78、80、84、86、88、91、96および135として提示されるものに由来する。エンハンサー要素は、プロモーター要素の5'または3'側に作動的に連結されるか、またはプロモーターに作動的に連結されている追加のエンハンサー要素の5'または3'側に作動的に連結された場合に、導入遺伝子の発現を強化または調整するか、特異的細胞タイプまたは植物器官における導入遺伝子の発現、または発生中および概日リズム中の特定の時点における導入遺伝子の発現をもたらすことができる、1つ以上のシス調節要素から構成されうる。転写がここで提供される上述のプロモーター（そのフラグメントを含む）から開始されることを可能にするTATAボックスまたは機能的に類似する要素およびあらゆる下流配列を、プロモーターから除去することにより、TATAボックスまたは機能的に類似する要素およびTATAボックスの下流にある配列が除去されているエンハンサーが作られる。プロモーター要素に由来するエンハンサーを実証するために、プロモーター要素P-Cl.Ubq1-1:1:1に由来するエンハンサー要素E-Cl.Ubq1-1:1:1（配列番号89）をここに提供する。

20

#### 【0186】

エンハンサー要素を、ここに提供されるプロモーター要素から引き出して、当技術分野において知られている方法を使って、プロモーター要素の5'または3'側に作動的に連結されるか、プロモーターに作動的に連結されている追加のエンハンサー要素の5'または3'側に作動的に連結されるように、クローニングすることができる。あるいは、当技術分野において知られている方法を使って、プロモーター要素の5'または3'側に作動的に連結されているかプロモーターに作動的に連結されている追加のエンハンサー要素の5'または3'側に作動的に連結されている1コピー以上のエンハンサー要素に作動的に連結されるように、エンハンサー要素をクローニングする。エンハンサー要素は、異なる属の生物に由来するプロモーター要素の5'または3'側に作動的に連結されるか、同じまたは異なる属の生物に由来するプロモーターに作動的に連結されている他の属の生物または同じ属の生物に由来する追加エンハンサー要素の5'または3'側に作動的に連結されるように、クローニングすることで、キメラ調節要素を得ることもできる。GUS発現植物形質転換ベクターは、先の実施例で述べたコンストラクトと同様に、当技術分野において知られている方法を使って構築され、結果として生じる植物発現ベクターは、*A. tumefaciens*由来の右境界領域、*A. tumefaciens*由来のノパリンシンターゼ3'UTR（T-AGRtu.nos-1:1:13、配列番号161）またはイネ脂質輸送タンパク質遺伝子由来の3'UTR（T-Os.LTP-1:1:1、配列番号175）に作動的に連結された、プロセシング可能なイントロンを有するか（GUS-2、配列番号160）またはイントロンを有さない（GUS-1、配列番号159）β-グルクロニダーゼ（GUS）のコード配列に作動的に連結された、*Z. mays*のHSP70熱ショックタンパク質に由来するイントロン（I-Zm.DnaK-1:1:1、配列番号144）または本明細書に提示する任意のイントロンもしくは他の任意のイントロンに作動的に連結された、調節要素またはキメラ調節要素から構成される調節要素またはキメラ調節要素を試験するための第1導入遺伝子カセット；除草剤グリホサートに対する耐性を付与するか（イネアクチン1プロモーターによって駆動されるもの

30

40

50

）、あるいは抗生物質カナマイシンに対する耐性を付与する（イネアクチン1プロモーターによって駆動されるもの）、形質転換植物細胞の選択に使用される第2導入遺伝子選択カセット、ならびにA. tumefaciens由来の左境界領域を含有する。結果として得られるプラスミドを使用して、上述の方法によって、または当技術分野において知られている他のAgrobacteriumによる方法もしくはパーティクルボンバードメント法によって、トウモロコシ植物または他の属の植物を形質転換する。あるいは、一過性アッセイを行うために、トウモロコシまたは他の属の植物に由来するプロトプラスト細胞を、当技術分野において知られている方法を使って形質転換する。

#### 【0187】

導入遺伝子の発現に対するエンハンサー要素の効果を決定するために、1つ以上のエンハンサーを含む調節要素によって駆動されるGUS発現を、安定または一過性植物アッセイにおいて評価する。1つ以上のエンハンサー要素への修飾または1つ以上のエンハンサー要素の重複を経験的実験と、その結果得られる、各調節要素組成を使って観察される遺伝子発現調節とに基づいて行う。結果として得られる調節要素またはキメラ調節要素における1つ以上のエンハンサーの相対的位置の改変は、調節要素またはキメラ調節要素の転写活性または特異性に影響を及ぼす可能性があり、トウモロコシ植物または他の属の植物内の望ましい導入遺伝子発現プロファイルにとって最善のエンハンサーを同定するために、実験的に決定される。

#### 【0188】

実施例17：植物由来のプロトプラストを使ったGUS活性のイントロン強化の解析

導入遺伝子の最適な発現のためのイントロンとベクターT-DNA要素配置内での構成とを実験的に選択するために、実験と、イントロンなしの発現ベクター対照との比較とに基づいて、イントロンを選択する。例えば、グリホサートへの耐性を付与するCP4などの除草剤耐性遺伝子の発現では、除草剤を散布した場合の収量の喪失を防ぐために、栄養組織だけでなく生殖組織内でも導入遺伝子発現が起こることが望ましい。その場合、イントロンは、構成的プロモーターに作動的に連結された時に、除草剤耐性付与導入遺伝子の発現、特にトランスジェニック植物の生殖細胞および生殖組織内での発現を強化することで、除草剤を散布した場合にトランスジェニック植物に栄養耐性と生殖耐性をどちらも与えるその能力によって選択されるであろう。大半のユビキチン遺伝子では、5'UTRが、そこにイントロン配列が埋め込まれているリーダーから構成される。それゆえに、そのような遺伝子に由来する発現要素は、プロモーター、リーダー、およびイントロンを含む5'UTR全体を使ってアッセイされる。異なる発現プロファイルを達成するために、または導入遺伝子発現レベルを調整するために、そのような発現要素からイントロンを除去し、または異種イントロンで置換することができる。

#### 【0189】

本明細書において配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182として提示されるイントロンは、ゲノムDNA内のエクソンおよびイントロン配列を同定するために、ゲノムDNAコンテイングを使用し、発現配列タグクラスターまたはcDNAコンテイングとの比較において同定される。加えて、遺伝子配列が1つ以上のイントロンによって中断されているリーダー配列をコードする条件下では、5'UTRまたはリーダー配列も、1つ以上のイントロンのイントロン/エクソンスプライスジャンクションを明確にするために使用される。イントロンは、当技術分野において知られている方法を使って、例えば図1に提示する2つの導入遺伝子カセットに図示するように、転写調節要素およびリーダーフラグメントの3'側に作動的に連結され、かつ第2のリーダーフラグメントまたはコード配列の5'側に作動的に連結されるように、植物形質転換ベクター中にクローニングされる。

#### 【0190】

したがって、例えば第1の考えうる導入遺伝子カセット（図8の導入遺伝子カセット構成1）は、3'UTR要素[E]に作動的に連結されているコード領域[D]に作動的に連結された

試験イントロン要素 [C] の5'側に作動的に連結されたリーダー要素 [B] の5'側に作動的に連結されたプロモーターまたはキメラプロモーター要素 [A] から構成される。あるいは、第2の考えうる導入遺伝子カセット（図8の導入遺伝子カセット構成2）は、3'UTR要素 [K] に作動的に連結されているコード領域 [J] に作動的に連結された第2リーダー要素または第1リーダー要素第2フラグメント [I] の5'側に作動的に連結された試験イントロン要素 [H] の5'側に作動的に連結された第1リーダー要素または第1リーダー要素フラグメント [G] の5'側に作動的に連結されたプロモーターまたはキメラプロモーター要素 [F] から構成される。さらに、第3の考えうる導入遺伝子カセット（図8の導入遺伝子カセット構成3）は、3'UTR要素 [Q] に作動的に連結されているコード配列要素の第2フラグメント [P] の5'側に作動的に連結されたイントロン要素 [O] の5'側に作動的に連結されたコード配列要素の第1フラグメント [N] の5'側に作動的に連結されたリーダー要素 [M] の5'側に作動的に連結されたプロモーターまたはキメラプロモーター要素 [L] から構成される。導入遺伝子カセット構成3は、コード配列の第1フラグメントと第2フラグメントの間にフレームシフトが起こることなく完全なオープンリーディングフレームが生成するような形でイントロンのスプライシングが可能になるように設計されている。

#### 【0191】

配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182として提示されるイントロンの5'端の最初の6ヌクレオチドおよび3'端の最後の6ヌクレオチドは、それぞれ、イントロン/エクソンスプライスジャンクションの前および後のヌクレオチドに相当する。配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182の5'端の第1および第2ヌクレオチド（GT）および3'端の第4および第5ヌクレオチド（AG）が保存されていることで、イントロンのイントロン/エクソンスプライスジャンクションが保存されている限り、これらの短い6ヌクレオチド配列は、例えば、植物形質転換ベクターへのイントロンのクローニングを容易にするために追加の配列（すなわち天然または人工の配列）を付加することによって修飾することができる。上述したとおり、最終転写産物へのメッセンジャーRNAのプロセシング中に望まれない開始コドンが形成される潜在的可能性を排除するために、スプライス部位の5'端（GT）の直前にヌクレオチド配列ATまたはヌクレオチドAを使用することと、スプライス部位の3'端（AG）の直後にヌクレオチドGまたはヌクレオチド配列TGを使用することとは、それぞれ避けることが好ましいだろう。こうして、イントロンの5'または3'端のスプライスジャンクション部位付近の配列は、修飾することができる。

#### 【0192】

イントロンは、一過性アッセイまたは安定植物アッセイにおいて、発現を強化する能力によって、強化効果についてアッセイされる。イントロン強化の一過性アッセイの場合は、当技術分野において知られている方法を使って、基本植物ベクターを構築する。A. tumefaciens由来のノパリンシンターゼ3'UTR (T-AGRtu.nos-1:1:13、配列番号161) に作動的に連結された、プロセシング可能なイントロンを有する (GUS-2、配列番号160) またはイントロンを有さない (GUS-1、配列番号159)  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) のコード配列に作動的に連結された試験イントロン要素（例えば配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182の一つ）の5'側に作動的に連結されたリーダー要素L-CaMV.35S-1:1:15（配列番号177）の5'側に作動的に連結されたカリフラワーモザイクウイルスプロモーターP-CaMV.35S-enh-1:1:9（配列番号176）などの構成的プロモーターから構成される発現カセットを含む基本植物ベクター中に、イントロンをクローニングする。基本植物ベクターおよび先に上記実施例2で述べたルシフェラーゼ対照ベクターで、トウモロコシ組織または他の属の植物組織に由来するプロトプラスト細胞を形質転換し、活性をアッセイする。発現を強化する

イントロンの相対的能力を比較するために、GUS値をルシフェラーゼ活性に対するGUSの比として表し、これらのレベルを、例えばZea maysのHSP70熱ショックタンパク質に由来するイントロンI-Zm.DnaK-1:1:1（配列番号178）などの既知のイントロン標準に作動的に連結された構成的プロモーターを含むコンストラクトならびに構成的プロモーターを含むがプロモーターに作動的に連結されたイントロンを含まないコンストラクトによって付与されるレベルと比較する。

#### 【0193】

配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182として提示されるイントロンの安定植物アクセシの場合、先の実施例で述べたコンストラクトと同様に、GUS発現植物形質転換ベクターが構築され、その結果得られる植物発現ベクターは、A. tumefaciens由来の右境界領域、A. tumefaciens由来のノパリンシンターゼ3'UTR（T-AGRtu.nos-1:1:13、配列番号161）に作動的に連結されたプロセシング可能なイントロンを有する（GUS-2、配列番号160）またはイントロンを有さない（GUS-1、配列番号158）β-グルクロニダーゼ（GUS）のコード配列に作動的に連結された、ここに提供される試験イントロン要素の5'側に作動的に連結されたリーダー要素L-CaMV.35S-1:1:15（配列番号177）の5'側に作動的に連結されたカリフラワーモザイクウイルスプロモーターP-CaMV.35S-enh-1:1:9（配列番号176）などの構成的プロモーターから構成されるイントロンを試験するための第1導入遺伝子カセット；グリホサートに対する耐性を付与するか（イネアクチン1プロモーターによって駆動されるもの）、あるいは抗生物質カナマイシンに対する耐性を付与する（イネアクチン1プロモーターによって駆動されるもの）、形質転換植物細胞の選択に使用される第2導入遺伝子選択カセット、およびA. tumefaciens由来の左境界領域を含有する。結果として得られるプラスミドを使用して、上述の方法によって、または当技術分野において知られているAgrobacteriumによる方法によって、トウモロコシ植物または他の属の植物を形質転換する。単一コピーまたは低コピー数形質転換体を、試験ベクターと同一であるが試験イントロンを含まない植物形質転換ベクターで形質転換された単一コピーまたは低コピー数形質転換植物との比較のために選択して、試験イントロンがイントロンを介した強化効果をもたらすかどうかを決定する。

#### 【0194】

配列番号4、7、21、24、36、44、48、52、54、58、62、68、72、82、92、94、101、103、105、107、109、111、113、118、120、122、127、129、131、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158および182として提示されるイントロンはいずれも、例えば発現を低下させるイントロン配列内のフラグメントの欠失や、発現を強化しうるイントロン内のフラグメントの重複など、いくつかの方法で修飾することができる。また、導入遺伝子の発現および発現パターンに影響を及ぼすために、特定の細胞タイプまたは組織および器官に対する発現の特異性に影響を及ぼしうるイントロン内の配列を、重複または変化または欠失させることもできる。また、意図せぬ転写産物が、不適正にスプライシングされたイントロンから、より長いまたは切断された異なるタンパク質として発現される原因になりうる、潜在的開始コドン（ATG）がすべて除去されるように、ここに提供されるイントロンを修飾することもできる。イントロンを実験的に試験し終えたら、または実験に基づいて改変し終えたら、安定に形質転換された植物（これは、イントロンが導入遺伝子の強化をもたらす限り、任意の属の単子葉植物または双子葉植物であることができる）における導入遺伝子の発現を強化するために、そのイントロンを使用する。イントロンは、イントロンが、それが作動的に連結されている導入遺伝子の発現の強化または減弱または特異性をもたらす限り、藻類、真菌または動物細胞など、他の生物における発現を強化するためにも使用することができる。

#### 【0195】

本発明の原理を例証し説明したので、そのような原理から逸脱することなく本発明の構成および詳細を変更できることは、当業者には明らかなはずである。本発明者らは、クレ

ームの趣旨および範囲に含まれる全ての変更実施形態をクレームする。本明細書において言及した刊行物および公開特許文書は、あたかも個々の刊行物または特許出願が引用により組み込まれることを具体的にかつ個別に示されているかのように、引用により本明細書に組み込まれる。

【図 1 a】

```
-----
P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
AGCAGACTCGCATTATCGATGGAGGGGTGGGTTTAGAACCTGAAACCTGGTACTGTTTC
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
GAACGAAAAACACTGTAGCACTTTCGTTTGGTTGGTAAATATTATCTACATGCT
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
CTAAGTGGCTCAAAAGAATCGTCTCGCAATGTACATCTAAATTTGCAATTAGTTATT
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
TGTTTACCTGCATTTTCATCTCGAGCATGCTCTTTGGTACATTTAATGCTTCGATGT
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
GATGGGAATTTAAAAATTTGGAGAAAGTTGGTTCTTAACACCCCGAGGACGAAAT
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
TGATTCGGTCTTTGACCGGATGACCACTGCAGTGGCAGGATACCATCTTAGCGGT
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----
```

FIG. 1a

【図 1 b】

```
-----
P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
TGCCTCGAAGTTTCGCTTTGCTAACGTTTGGAGAAATTAACAGCTTTGACCAAGTGA
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
GACGAGCGCTTACGTGGCAGTGAATGGAACGGGACGGCAAGTTTACGCTGTAGTG
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
TTAGCGGGTCTCGTTAGGTTTGGCACAAGTTAGTTGAATCGGGCTTCGGCAAACTATAT
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
GGCAAGTTAGACCCAGTGTGAGCCGGCCACCGCAAGTTATGGGACATTATAGTAGGA
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
AGCAAGTGTATAATAAGAATATGAGATAATGTAAGCAGCTATATGAATCATCAGTCATA
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----

P-ANDge.Ubql-1:1:9
P-ANDge.Ubql-1:1:8
P-ANDge.Ubql-1:1:11
TTATGTTAAGATGAAGAGATAGAATAACGGTATGTAAATTTATAGCGAGTGATAGC
P-ANDge.Ubql-1:1:12
P-ANDge.Ubql-1:1:13
P-ANDge.Ubql-1:1:14
P-ANDge.Ubql-1:1:10
-----
```

FIG. 1b

【図 1 d】

TCTCAAGTITTTTTTCTTCGAAAAATCATTTCTTTTTTTAAAAAAAGTATAATTGGA  
 TCTCAAGTITTTTTTCTTCGAAAAATCATTTCTTTTTTTAAAAAAAGTATAATTGGA  
 -----  
 TCTCAAGTITTTTTTCTTCGAAAAATCATTTCTTTTTTTAAAAAAAGTATAATTGGA

**FIG. 1d**

【図 1 f】

[illegible]

FIG. 1f

AAGGTCGTCATATGTTTATTATAAGAGTAAAGCGTCATTCTCTCGTCCGAACATATATA  
 -----  
 AAGGTCGTCATATGTTTATTATAAGAGTAAAGCGTCATTCTCTCGTCCGAACATATATA  
 AAGGTCGTCATATGTTTATTATAAGAGTAAAGCGTCATTCTCTCGTCCGAACATATATA  
 -----  
 AAGGTCGTCATATGTTTATTATAAGAGTAAAGCGTCATTCTCTCGTCCGAACATATATA

**FIG. 2b**

【図 2 d】

P-ERiRa. Ubg1-1:1,9  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,10  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,8  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,11  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,12  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,13

-----  
GATATATTGCTTGAGGCACCTTTATGCAACACCATAGTCAACTGTAATGCCGCTTGAGTG  
GATATATTGCTTGAGGCACCTTTATGCAACACCATAGTCAACTGTAATGCCGCTTGAGTG  
-----  
-----

P-ERiRa. Ubg1-1:1,9  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,10  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,8  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,11  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,12  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,13

-----  
CGTCTCAAGTITTTTTTCTTGCAAATTACGCTTTTTTAAAGAAGTAAATTTGGATCG  
CGTCTCAAGTITTTTTTCTTGCAAATTACGCTTTTTTAAAGAAGTAAATTTGGATCGT  
-----  
-----

P-ERiRa. Ubg1-1:1,9  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,10  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,8  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,11  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,12  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,13

-----  
GCGATTTTTTCTCTAGGTGCGGTGACTGTGTGAGTACCAATTTGGATCTCAGAAG  
GCGATTTTTTCTCTAGGTGCGGTGACTGTGTGAGTACCAATTTGGATCTCAGAAG  
-----  
-----

P-ERiRa. Ubg1-1:1,9  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,10  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,8  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,11  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,12  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,13

-----  
GTATAAAGAATAACTGCTGCCACTTTGAGGATACAAATCTTCTCTCAAAGTGT  
GTATAAAGAATAACTGCTGCCACTTTGAGGATACAAATCTTCTCTCAAAGTGT  
-----  
-----

-----CTGCTGCCACTTTGAGGATACAAATCTTCTCTCAAAGTGT

P-ERiRa. Ubg1-1:1,9  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,10  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,8  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,11  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,12  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,13

-----  
TTTGTTTGTTATTTAAACGCTCTTAAAGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACATGTA  
TTTGTTTGTTATTTAAACGCTCTTAAAGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACATGTA  
-----  
-----

TTTGTTTGTTATTTAAACGCTCTTAAAGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACATGTA

P-ERiRa. Ubg1-1:1,9  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,10  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,8  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,11  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,12  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,13

-----  
AAGCTCTCACATGATTAATCATATAAGTGTGCAAGGCTTGTTTGACAAGGTTTTTTT  
AAGCTCTCACATGATTAATCATATAAGTGTGCAAGGCTTGTTTGACAAGGTTTTTTT  
-----  
-----

P-ERiRa. Ubg1-1:1,9  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,10  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,8  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,11  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,12  
P-ERiRa. Ubg1-1:1,13

-----  
AAGCTCTCACATGATTAATCATATAAGTGTGCAAGGCTTGTTTGACAAGGTTTTTTT  
AAGCTCTCACATGATTAATCATATAAGTGTGCAAGGCTTGTTTGACAAGGTTTTTTT  
-----  
-----

FIG. 2c

[illegible]

**FIG. 2d**

【図 2 f】

P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-10  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-10  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-8  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-11  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-12  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-13

-----  
TTCTCGGTTTGGCGGTTGTGTCGGCGCAATTACACGTTTTCGGTGTCCTCGACAAA  
TTCGCGTTTGGCGGTTGTGTCGGCGCAATTACACGTTTTCGGTGTCCTCGACAAA  
TTCGCGTTTGGCGGTTGTGTCGGCGCAATTACACGTTTTCGGTGTCCTCGACAAA  
TTCGCGTTTGGCGGTTGTGTCGGCGCAATTACACGTTTTCGGTGTCCTCGACAAA  
-----

P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-9  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-10  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-8  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-11  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-12  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-13

-----  
TTTGCCTTTAAAAACAATTTATAAGAAGAGTCCTGGAGATAAAGGCGCGTCAATGT  
TTTGCCTTTAAAAACAATTTATAAGAAGAGTCCTGGAGATAAAGGCGCGTCAATGT  
TTTGCCTTTAAAAACAATTTATAAGAAGAGTCCTGGAGATAAAGGCGCGTCAATGT  
TTTGCCTTTAAAAACAATTTATAAGAAGAGTCCTGGAGATAAAGGCGCGTCAATGT  
-----

P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-9  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-10  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-8  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-11  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-12  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-13

-----  
CAAGAGTGAAGTGCTACTCCCTCCATCCCAAAAAGTGAATCTAAGTATGAAGTTGT  
CAAGAGTGAAGTGCTACTCCCTCCATCCCAAAAAGTGAATCTAAGTATGAAGTTGT  
CAAGAGTGAAGTGCTACTCCCTCCATCCCAAAAAGTGAATCTAAGTATGAAGTTGT  
CAAGAGTGAAGTGCTACTCCCTCCATCCCAAAAAGTGAATCTAAGTATGAAGTTGT  
CAAGAGTGAAGTGCTACTCCCTCCATCCCAAAAAGTGAATCTAAGTATGAAGTTGT  
-----

P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-9  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-10  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-8  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-11  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-12  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-13

-----  
TTATATTTTGGACAAGAAGGATATACACAAGAATGATATCATGTCATGCTAGAT  
TTATATTTTGGACAAGAAGGATATACACAAGAATGATATCATGTCATGCTAGAT  
TTATATTTTGGACAAGAAGGATATACACAAGAATGATATCATGTCATGCTAGAT  
TTATATTTTGGACAAGAAGGATATACACAAGAATGATATCATGTCATGCTAGAT  
-----  
-----ACCAAGAAGTATGATATCATGTCATGCTAGAT  
-----

P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-9  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-10  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-8  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-11  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-12  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-13

-----  
CITTTTAGTAAGCTTGAGCTTCTCTAAAGTAGAGAAATAGAAAAAAATCAGGTTT  
CITTTTAGTAAGCTTGAGCTTCTCTAAAGTAGAGAAATAGAAAAAAATCAGGTTT  
CITTTTAGTAAGCTTGAGCTTCTCTAAAGTAGAGAAATAGAAAAAAATCAGGTTT  
CITTTTAGTAAGCTTGAGCTTCTCTAAAGTAGAGAAATAGAAAAAAATCAGGTTT  
CITTTTAGTAAGCTTGAGCTTCTCTAAAGTAGAGAAATAGAAAAAAATCAGGTTT  
-----

P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-9  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-10  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-8  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-11  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-12  
P-*E-Ric1a*. Ubql-1:1-13

-----  
GTGGCTTGATTTAGCTACCCACAAAATCTTGGTTTACATTTTGGTTTGATTTGTG  
GTGGCTTGATTTAGCTACCCACAAAATCTTGGTTTACATTTTGGTTTGATTTGTG  
GTGGCTTGATTTAGCTACCCACAAAATCTTGGTTTACATTTTGGTTTGATTTGTG  
GTGGCTTGATTTAGCTACCCACAAAATCTTGGTTTACATTTTGGTTTGATTTGTG  
GTGGCTTGATTTAGCTACCCACAAAATCTTGGTTTACATTTTGGTTTGATTTGTG  
-----

**FIG. 2e**

[illegible]

FIG. 2f

## 【図 2 g】

```
P-ER1ra.Ubql-1:1:9      GGCCACCAACACGCGAACCAACAGGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGAGCGCGGAGACG
P-ER1ra.Ubql-1:1:10     GGCCACCAACACGCGAACCAACAGGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGAGCGCGGAGACG
P-ER1ra.Ubql-1:1:8      GGCCACCAACACGCGAACCAACAGGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGAGCGCGGAGACG
P-ER1ra.Ubql-1:1:11     GGCCACCAACACGCGAACCAACAGGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGAGCGCGGAGACG
P-ER1ra.Ubql-1:1:12     GGCCACCAACACGCGAACCAACAGGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGAGCGCGGAGACG
P-ER1ra.Ubql-1:1:13     GGCCACCAACACGCGAACCAACAGGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGAGCGCGGAGACG
*****

P-ER1ra.Ubql-1:1:9      TTGACACCTTGGCGCGGCGATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ER1ra.Ubql-1:1:10     TTGACACCTTGGCGCGGCGATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ER1ra.Ubql-1:1:8      TTGACACCTTGGCGCGGCGATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ER1ra.Ubql-1:1:11     TTGACACCTTGGCGCGGCGATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ER1ra.Ubql-1:1:12     TTGACACCTTGGCGCGGCGATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ER1ra.Ubql-1:1:13     TTGACACCTTGGCGCGGCGATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
*****

P-ER1ra.Ubql-1:1:9      TGGTGGCGGTTTCCAAGTCGGTTCCGCTTCTGCTCTCTCTCACAGGCGAAGAACGGTC
P-ER1ra.Ubql-1:1:10     TGGTGGCGGTTTCCAAGTCGGTTCCGCTTCTGCTCTCTCTCTCACAGGCGAAGAACGGTC
P-ER1ra.Ubql-1:1:8      TGGTGGCGGTTTCCAAGTCGGTTCCGCTTCTGCTCTCTCTCTCACAGGCGAAGAACGGTC
P-ER1ra.Ubql-1:1:11     TGGTGGCGGTTTCCAAGTCGGTTCCGCTTCTGCTCTCTCTCTCACAGGCGAAGAACGGTC
P-ER1ra.Ubql-1:1:12     TGGTGGCGGTTTCCAAGTCGGTTCCGCTTCTGCTCTCTCTCTCACAGGCGAAGAACGGTC
P-ER1ra.Ubql-1:1:13     TGGTGGCGGTTTCCAAGTCGGTTCCGCTTCTGCTCTCTCTCTCACAGGCGAAGAACGGTC
*****

P-ER1ra.Ubql-1:1:9      ACGGACCGGCGACGACGCGGCGATTCTTTCCACCGCTCTCTCCCTTTCCCTCTCTCGCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:10     ACGGACCGGCGACGACGCGGCGATTCTTTCCACCGCTCTCTCCCTTTCCCTCTCTCGCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:8      ACGGACCGGCGACGACGCGGCGATTCTTTCCACCGCTCTCTCCCTTTCCCTCTCTCGCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:11     ACGGACCGGCGACGACGCGGCGATTCTTTCCACCGCTCTCTCCCTTTCCCTCTCTCGCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:12     ACGGACCGGCGACGACGCGGCGATTCTTTCCACCGCTCTCTCCCTTTCCCTCTCTCGCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:13     ACGGACCGGCGACGACGCGGCGATTCTTTCCACCGCTCTCTCCCTTTCCCTCTCTCGCG
*****

P-ER1ra.Ubql-1:1:9      CGCGGTTTTAAATAGCGAGCGCATCCCGAGCTTCTCTCCCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:10     CGCGGTTTTAAATAGCGAGCGCATCCCGAGCTTCTCTCCCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:8      CGCGGTTTTAAATAGCGAGCGCATCCCGAGCTTCTCTCCCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:11     CGCGGTTTTAAATAGCGAGCGCATCCCGAGCTTCTCTCCCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:12     CGCGGTTTTAAATAGCGAGCGCATCCCGAGCTTCTCTCCCG
P-ER1ra.Ubql-1:1:13     CGCGGTTTTAAATAGCGAGCGCATCCCGAGCTTCTCTCCCG
*****
```

FIG. 2g

## 【図 3 a】

```
P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      ACTGCGGACACGCTCAGTCGGGGAGGGCTCCGAGGCTCTCTGCCCGGCGCGCG
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      GGAGCAGCATCTGGATTGGAGAGATAGAGGAAAGAGAGGAAAGAGAGAGATAGG
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      CAAGAGCTGAAAGATAAGGTTGTGGGGCTGTGGTATTAGAGACCACTAATCCCTC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      CATCTCTAATGACGCGGTGCCAAGACCAAGTGGCGGCGACACCAGCGTCTAAGTGAAC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      TTCCGCTAACCTTCGGTCAATGGCGCTGAAAGATGTCATGTGGGAGGCCCGCTCTCA
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      GTAGATTGCCAATGCTACCGTGGCACTCTCCATGCAATGATGCTCCGCTATCCCG
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      TTTCTCACACAGATAGACACAGTAAGCATCACTAAAGCAAGCATGTAGAACCTTAA
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      AAAAAAGCTTATACACAGTATATCTCAACAGCATGCGCTTTTGAAGTATCCAGGA
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTATATTATAGCTGTGGACCTGTGGTAACCTTCTCTT
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      TGGCCTTCTCTAATCTCGCGCTGTGGTCTATCTTAGCACTAGCGAGAGATAGGC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      CGGGGGTGAATGGGGTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGCGCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      CGGGGGTGAATGGGGTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGCGCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      CTACAGCTGTGCCAGCTGCGGCCGCGCAAGCGAAGCAGCTGAGCGGTGTGACAG
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----
CTACAGCTGTGCCAGCTGCGGCCGCGCAAGCGAAGCAGCTGAGCGGTGTGACAG
```

FIG. 3a

## 【図 3 b】

```
P-Sv.Ubql-1:1:2      CTTGCTAATGCTTACGTGATACAGTAACGGCCCTGTAACACTGCTGTCGCGC
P-Sv.Ubql-1:1:1      CTTGCTAATGCTTACGTGATACAGTAACGGCCCTGTAACACTGCTGTCGCGC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      ATCATCAACAGCAGCTCCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCGCCACCCAGGC
P-Sv.Ubql-1:1:1      ATCATCAACAGCAGCTCCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCGCCACCCAGGC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      GCGCGCTAGCGGAGCAGGTCAGGTGACACGGGCTGTCGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-Sv.Ubql-1:1:1      GCGCGCTAGCGGAGCAGGTCAGGTGACACGGGCTGTCGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      GGTAAAGCGCAGAAACAGTGTGTTGGCCAGGATGACATACCAAAAAATATTCACACGA
P-Sv.Ubql-1:1:1      GGTAAAGCGCAGAAACAGTGTGTTGGCCAGGATGACATACCAAAAAATATTCACACGA
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      AAGAATGGAAGTATGAGCTGCTACTGTGTAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-Sv.Ubql-1:1:1      AAGAATGGAAGTATGAGCTGCTACTGTGTAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      ACATCCAAGCGCCACACAGCTGACGTGCGCGTCAAGCAGACATCGGAACACTGGTGATT
P-Sv.Ubql-1:1:1      ACATCCAAGCGCCACACAGCTGACGTGCGCGTCAAGCAGACATCGGAACACTGGTGATT
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      GGTGGAGCGCGCAGTATGCGGCCAGCAGCGCGAGGTGGTGGTGGCCGTGGCCCTGCT
P-Sv.Ubql-1:1:1      GGTGGAGCGCGCAGTATGCGGCCAGCAGCGCGAGGTGGTGGTGGCCGTGGCCCTGCT
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      GTCTGCGCGGCTCGGAGCAACTTGAACCTGGGCCACCGCTCGTGCACCTCGCAACCCG
P-Sv.Ubql-1:1:1      GTCTGCGCGGCTCGGAGCAACTTGAACCTGGGCCACCGCTCGTGCACCTCGCAACCCG
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      TTGGCGGAAGAAAGAAATGGCTCGTAGGGGCCGGGTAGAAATCAAGAATGTTGGCGCTGG
P-Sv.Ubql-1:1:1      TTGGCGGAAGAAAGAAATGGCTCGTAGGGGCCGGGTAGAAATCAAGAATGTTGGCGCTGG
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      GCTTCGATTACATACATGGGCTGAAGCTCTAAACGACGGCCCGTACCGGGCGAT
P-Sv.Ubql-1:1:1      GCTTCGATTACATACATGGGCTGAAGCTCTAAACGACGGCCCGTACCGGGCGAT
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----
```

FIG. 3b

## 【図 3 c】

```
P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      GGAAGAGACCGGATCTCTCTGTAATTCGGAAGGCCACAGAGAGCGACCCACCACC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      GACCGGAGGAGTCTGCGGTGCTCAACACGGCCGGCGGCTGGGCTGCGACCTTAACCA
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----

P-Sv.Ubql-1:1:2      -----
P-Sv.Ubql-1:1:1      GCAAGGACGCCACGACCGGCTCGGCCCTGAGGCGATAAATACCTCCCATCC
P-Sv.Ubql-1:1:3      -----
```

FIG. 3c

【図 4 b】

```

EXP-2m, UbgM1 : 1 : 2      TATAAT TGACTACAAATAAACAARATACCCCTTTAGAGAA-TAAAAAAATCAGCAACATCT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 5      ATAAATTCCTACAAATAAAGACACCCCTTTAGAGAA-TAAAAAAATCAGCAACATCT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 1      ATAAAGTGCATAAAAAATCAATATAATCTTTTAGAGAA-TAAAAAAATCAGCAACATCT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 4      ATAAAGTGCATAAAAAATCAACAAATACCCCTTTAGAGAA-TAAAAAAATCAGCAACATCT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 2      TTCTCTGTCTTCAGTAGATAATGACAGCGCTCTTACCGCGTCGACGAGCTTAACGGAGC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 5      TTCTCTGTGTTCGAGTAGATAATGACAGCGCTCTTCAACCGCGTCGAGCGAGCTTAACGGAGC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 1      TTCTCTGTCTTCGAGTAGATAATGACAGCGCTCTTCAACCGCGTCGAGCGAGCTTAACGGAGC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 4      TTCTCTGTGTTCGAGTAGATAATGACAGCGCTCTTAAACCGCGTCGAGCGAGCTTAACGGAGC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 2      ACACCAACGACGAACACAGCGAGCTGCTGCTGGGCGCAAGGGAAGAGACGCGACGGCATCTC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 5      ACACCAACGACGAACAGCGAGCTGCTGCTGGCGCAAGGGAAGAGACGCGACGGCATCTC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 1      ACACCAACGACGAACACAGCGAGCTGCTGCTGGCGCAAGGGAAGAGACGCGACGGCATCTC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 4      ACACCAACGACGAACAGCGAGCTGCTGCTGGGCGCAAGGGAAGAGACGCGACGGCATCTC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 2      TGATGATGCTCTTGAGACCCCTTGAGAGTTCGCGTCCACGCTTGAGCTTGCTTCGGCTGT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 5      TGATGATGCTCTTGAGACCCCTTGAGAGTTCGCGTCCACGCTTGAGCTTGCTTCGGCTGT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 1      TGATGATGCTCTTGAGACCCCTTGAGAGTTCGCGTCCACGCTTGAGCTTGCTTCGGCTGT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 4      TGATGATGCTCTTGAGACCCCTTGAGAGTTCGCGTCCACGCTTGAGCTTGCTTCGGCTGT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 2      CGGCATCCAGAAATTCGCTGGCGGAGCGGCGACAGTGGAGCGGCGACGAGCGGCGCTCTC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 5      CGGCATCCAGAAATTCGCTGGCGGAGCGGCGACAGTGGAGCGGCGACGAGCGGCGCTCTC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 1      CGGCATCCAGAAATTCGCTGGCGGAGCGGCGACAGTGGAGCGGCGACGAGCGGCGCTCTC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 4      CGGCATCCAGAAATTCGCTGGCGGAGCGGCGACAGTGGAGCGGCGACGAGCGGCGCTCTC
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 2      TCTCTCTCTACGCGACCGGCGACTACGCGGGAGATTCCTTCCACACGCTCTCTGGTTGTG
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 5      TCTCTCTCTACGCGACCGGCGACTACGCGGGAGATTCCTTCCACACGCTCTCTGGTTGTG
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 1      CTCTCTCTCTACGCGACCGGCGACTACGCGGGAGATTCCTTCCACACGCTCTCTGGTTGTG
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 4      CTCTCTCTCTACGCGACCGGCGACTACGCGGGAGATTCCTTCCACACGCTCTCTGGTTGTG
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 2      TCTCTCTGCGGCGCGGATAAATAGACACCCCTTCACACCTCTTTCCGCAACGCTGTG
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 5      TCTCTCTGCGGCGCGGATAAATAGACACCCCTTCACACCTCTTTCCGCAACGCTGTG
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 1      TCTCTCTGCGGCGCGGATAAATAGACACCCCTTCACACCTCTTTCCGCAACGCTGTG
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 4      TCTCTCTGCGGCGCGGATAAATAGACACCCCTTCACACCTCTTTCCGCAACGCTGTG
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 2      GTGTGCTTGGAGGCGACACACAGCAACAGATCTCCGCAATTCAGCGCTCGGACCTCT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 5      GTGTGCTTGGAGGCGACACACAGCAACAGATCTCCGCAATTCAGCGCTCGGACCTCT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 1      GTGTGCTTGGAGGCGGCGACACACAGCAACAGATCTCCGCAATTCAGCGCTCGGACCTCT
EXP-2m, UbgM1 : 1 : 4      GTGTGCTTGGAGGCGGCGACACACAGCAACAGATCTCCGCAATTCAGCGCTCGGACCTCT

```

**FIG. 4b**

## 【图 4 d】

```

EXP-Zm_UbqH1:1:2      TGTTCACAACTACCTGGTGGAATTATTAAGAAGATAAAGGGTCGTTAGATCGAGATGAGA
EXP-Zm_UbqH1:1:1      TGTTCACAACTACCTGGTGGAATTATTAAGAAGATAAAGGGTCGTTAGATCGAGATGAGA
EXP-Zm_UbqH1:1:1      TGTTCACAACTACCTGGTGGAATTATTA
EXP-Zm_UbqH1:1:4      TGTTCACAACTACCTGGTGGAATTATTA
*****

EXP-Zm_UbqH1:1:2      ATACGTGTTCAAACTACCTGSGGAAATTATTAAGGAATCGTATGATGATGGC--TACATC
EXP-Zm_UbqH1:1:5      ATACGTGTTCAAACTACCTGSGGAAATTATTAAGGAATCGTATGATGATGGC--TACATC
EXP-Zm_UbqH1:1:1      -----AGGATCGTATGATGATGGCATACAT
EXP-Zm_UbqH1:1:4      -----TTTGGATCGTATGATGATGGCATACAT
*****

EXP-Zm_UbqH1:1:2      TCTCATAGTCAGAGTTAAAGATGATGATGAGGAATTCGATCAGGATAGGATACATGTT
EXP-Zm_UbqH1:1:2      TCTCATAGTCAGAGTTAAAGATGATGATGAGGAATTCGATCAGGATAGGATACATGTT
EXP-Zm_UbqH1:1:1      TCTCATAGTCAGAGTTAAAGATGATGATGAGGAATTCGATCAGGATAGGATACATGTT
EXP-Zm_UbqH1:1:4      TCTCATAGTCAGGATAGGATGATGATGAGGAATTCGATCAGGATAGGATACATGTT
*****

EXP-Zm_UbqH1:1:2      TGATCGGGGTTTACTGATCATATACAGAGATCGCTTTT--TCGCTTGGGTTGATGATGAT
EXP-Zm_UbqH1:1:5      TGATCGGGGTTTACTGATCATATACAGAGATCGCTTTT--TCGCTTGGGTTGATGATGAT
EXP-Zm_UbqH1:1:1      TGATCGGGGTTTACTGATCATATACAGAGATCGCTTTTTCGCTTGGGTTGATGATGAT
EXP-Zm_UbqH1:1:4      TGATCGGGGTTTACTGATCATATACAGAGATCGCTTTTCGCTTGGGTTGATGATGAT
*****

EXP-Zm_UbqH1:1:2      GTGCTGTGTTGGCGGG-----TCGTTCTAGATCGGATAGGAATCTGTTTCAACTT
EXP-Zm_UbqH1:1:5      GTGCTGTGTTGGCGGG-----TCGTTCTAGATCGGATAGGAATCTGTTTCAACTT
EXP-Zm_UbqH1:1:1      GTGCTGTGTTGGCGGG-----TCGTTCTAGATCGGATAGGAATCTGTTTCAACTT
EXP-Zm_UbqH1:1:4      GTGCTGTGTTGGCGGGCGTTCATTCTGATCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
*****

EXP-Zm_UbqH1:1:2      ACCCTGGTGGAATTATTAATTATTTGATCTTTATGTTGGCCATACATCTTCATGATACG
EXP-Zm_UbqH1:1:5      ACCCTGGTGGAATTATTAATTATTTGATCTTTATGTTGGCCATACATCTTCATGATACG
EXP-Zm_UbqH1:1:1      ACCCTGGTGGAATTATTAATTGTTGATCTTTATGTTGGCCATACATCTTCATGATACG
EXP-Zm_UbqH1:1:4      ACCCTGGTGGAATTATTAATTGTTGATCTTTATGTTGGCCATACATCTTCATGATACG
*****

EXP-Zm_UbqH1:1:2      AGTTTAAGATGTGATGATGAGAAATTCGATCAGGATAGGATACATGTTGATGATGGGTT
EXP-Zm_UbqH1:1:5      AGTTTAAGATGTGATGATGAGAAATTCGATCAGGATAGGATACATGTTGATGATGGGTT
EXP-Zm_UbqH1:1:1      AGTTTAAGATGTGATGATGAGAAATTCGATCAGGATAGGATACATGTTGATGATGGGTT
EXP-Zm_UbqH1:1:4      AGTTTAA-----GATGATCGGAAATTCGATCAGGATAGGATACATGTTGATGATGGGTT
*****

EXP-Zm_UbqH1:1:2      TACTGATGATATACATGATGGCATATCGCGGATCTATTATATGCTCTTAACCTTGAGTA
EXP-Zm_UbqH1:1:5      TACTGATGATATACATGATGGCATATCGCGGATCTATTATATGCTCTTAACCTTGAGTA
EXP-Zm_UbqH1:1:1      TACTGATGATATACATGATGGCATATCGCGGATCTATTATATGCTCTTAACCTTGAGTA
EXP-Zm_UbqH1:1:4      TACTGATGATATACATGATGGCATATCGCGGATCTATTATATGCTCTTAACCTTGAGTA
*****

```

**FIG. 4d**

## 【図 4 e】

```

EXP-Zm, UbqM1:1:2      CCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATATTTTIGATCTTGATACTTGGAT
EXP-Zm, UbqM1:1:5      CCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATATTTTIGATCTTGATACTTGGAT
EXP-Zm, UbqM1:1:1      CCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATATTTTIGATCTTGATACTTGGAT
EXP-Zm, UbqM1:1:4      *****

EXP-Zm, UbqM1:1:2      GATGGCATAICGACGAGCTATATGTGGA-TTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTAT
EXP-Zm, UbqM1:1:5      GATGGCATAICGACGAGCTATATGTGGA-TTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTAT
EXP-Zm, UbqM1:1:1      GATGGCATAICGACGAGCTATATGTGGA-TTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTAT
EXP-Zm, UbqM1:1:4      *****

EXP-Zm, UbqM1:1:2      TTGCTTGGTACTGTTTCITTTTGTCCGATGCTCACCCGTGTTGGGTGATACTTCTGAG
EXP-Zm, UbqM1:1:5      TTGCTTGGTACTGTTTCITTTTGTCCGATGCTCACCCGTGTTGGGTGATACTTCTGAG
EXP-Zm, UbqM1:1:1      TTGCTTGGTACTGTTTCITTTTGT-OGATGCTCACCCGTGTTGGGTGATACTTCTGAG
EXP-Zm, UbqM1:1:4      TTGCTTGGTACTGTTTCITTTGT-OGATGCTCACCCGTGTTGGGTGATACTTCTGAG
*****

```

FIG. 4e

## 【図 5 a】

```

P-Sb, Ubq6-1:1:2      -----
P-Sb, Ubq6-1:1:1      CATTAAAGTCATTATGTGTCATGCGTCGTAACATACATGGATATGTTGCTGCGCATCTC
-----
P-Sb, Ubq6-1:1:2      ---CACTAGCTGCGCATGATAAAGCCACAAGCCAAAATTAATTATATGGGTGAGATA
P-Sb, Ubq6-1:1:1      CTCGCCTAGCTGCGCATGATAAAGCCACAAGCCAAAATTAATTATATGGGTGAGATA
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      AATACGTACCGACACCGGCCATAGAAAAAGTACATTATTAAAGTCTAATTTTGGAAACAG
P-Sb, Ubq6-1:1:1      AATACGTACCGACACCGGCCATAGAAAAAGTACATTATTAAAGTCTAATTTTGGAAACAG
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      TCTGAAAACGACGTGCGCTGCGAGAGTAAATGTAATTTTCGGCACTAAAACCATTTACAA
P-Sb, Ubq6-1:1:1      TCTGAAAACGACGTGCGCTGCGAGAGTAAATGTAATTTTCGGCACTAAAACCATTTACAA
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      CTAATTCATTCAATAACAGTATTATTAGAAAATGTATAGCTCGCTCTAAAAAACAGTTTA
P-Sb, Ubq6-1:1:1      CTAATTCATTCAATAACAGTATTATTAGAAAATGTATAGCTCGCTCTAAAAAACAGTTTA
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      GAAAAACAGTCAAAAATAATTCGACCACAAACAGTTAATAAGGTCATTAAATATATAAT
P-Sb, Ubq6-1:1:1      GAAAAACAGTCAAAAATAATTCGACCACAAACAGTTAATAAGGTCATTAAATATATAAT
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      GCACGGTGCTATTTGATCTTTTAAAGGAAAAAGAGGAATAGCTGTGGGCCACAGCGGGA
P-Sb, Ubq6-1:1:1      GCACGGTGCTATTTGATCTTTTAAAGGAAAAAGAGGAATAGCTGTGGGCCACAGCGGGA
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      ATTGGGCGCGGGAGTCTGCGGACGACGCGTTCCGTCCGAACGCGGACCCGACGAGG
P-Sb, Ubq6-1:1:1      ATTGGGCGCGGGAGTCTGCGGACGACGCGTTCCGTCCGAACGCGGACCCGACGAGG
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      CCCCCCGCCGCCACGTGCGAGAACCGTCCGTGGTGATCTGCGCGGGTACACCA
P-Sb, Ubq6-1:1:1      CCCCCCGCCGCCACGTGCGAGAACCGTCCGTGGTGATCTGCGCGGGTACACCA
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      GCGTCGCCCTTGGGCGGCTCAGACGACGTGGGCTCAGACGAGTGGTTTGTCTGGGCTTC
P-Sb, Ubq6-1:1:1      GCGTCGCCCTTGGGCGGCTCAGACGACGTGGGCTCAGACGAGTGGTTTGTCTGGGCTTC
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      GGATCGCACCATATGGGCTCGGCATCAGAAAGACGGGCGCGCTGGGATAGAGAGAC
P-Sb, Ubq6-1:1:1      GGATCGCACCATATGGGCTCGGCATCAGAAAGACGGGCGCGCTGGGATAGAGAGAC
*****

```

FIG. 5a

## 【図 5 b】

```

P-Sb, Ubq6-1:1:2      AGGAACCTCTCTGGATTCCAGAAAGCCAGCCACGAGCGACCCAGCCGCGGAGGATACT
P-Sb, Ubq6-1:1:1      AGGAACCTCTCTCTGGATTCCAGAAAGCCAGCCACGAGCGACCCAGCCGCGGAGGATACT
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      CGTCTCCAACTCCAAAGCAGCCAGGCGCGGCGGCGGACCGCTGGGCTAACTGCGCT
P-Sb, Ubq6-1:1:1      CGTCTCCAACTCCAAAGCAGCCAGGCGCGGCGGCGGACCGCTGGGCTAACTGCGCT
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      AACCTTAACCTCCAAGGACGCCAAGGCCCGCTTCTCCACCCGACATAAATATCCCCCC
P-Sb, Ubq6-1:1:1      AACCTTAACCTCCAAGGACGCCAAGGCCCGCTTCTCCACCCGACATAAATATCCCCCC
*****

P-Sb, Ubq6-1:1:2      ATCCAGGCAAGGCGC
P-Sb, Ubq6-1:1:1      ATCCAGGCAAGGCGC
*****

```

FIG. 5b

## 【図 6 a】

```

P-SETit, Ubq1-1:1:4      ACTGCGCGACACGCCCTCACTGCGGGAGGCTCCGAGCGCTCTCCCGCGCGCGCGCG
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      ACTGCGCGACACGCCCTCACTGCGGGAGGCTCCGAGCGCTCTCCCGCGCGCGCGCG
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----

P-SETit, Ubq1-1:1:4      GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGAGAAATAGAGAAAGAGAGGAGGAGAGAGATAGCG
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGAGAAATAGAGAAAGAGAGGAGGAGAGAGATAGCG
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----

P-SETit, Ubq1-1:1:4      CAAAGAGCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGGCTGTGGTGAITAGAGGACCACTAATCCCTC
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      CAAAGAGCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGGCTGTGGTGAITAGAGGACCACTAATCCCTC
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----

P-SETit, Ubq1-1:1:4      CATCTCCTAATGAGCGGGTGCCTCAAGACAGTGCAGCGGACACAGCGGTCTAAGTGAAC
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      CATCTCCTAATGAGCGGGTGCCTCAAGACAGTGCAGCGGACACAGCGGTCTAAGTGAAC
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----

P-SETit, Ubq1-1:1:4      TTCCGCTAACCTTCCGGTCAATGGCGCTGAAGAGATGTCATGTGGGAGGCGCCCCCTCA
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      TTCCGCTAACCTTCCGGTCAATGGCGCTGAAGAGATGTCATGTGGGAGGCGCCCCCTCA
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----

P-SETit, Ubq1-1:1:4      GTAGATTGCCAAGTGCCTACCGTGCCTCTTCCATGATGATGCTCCCGCTATCCCG
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      GTAGATTGCCAAGTGCCTACCGTGCCTCTTCCATGATGATGCTCCCGCTATCCCG
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----

P-SETit, Ubq1-1:1:4      TTCTCACAACAGATAGACAACAGTAAGCATCACTAAAGCAAGCATGTGTAGAACCTTAA
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      TTCTCACAACAGATAGACAACAGTAAGCATCACTAAAGCAAGCATGTGTAGAACCTTAA
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----

P-SETit, Ubq1-1:1:4      AAAAAAGCTTATACIACAGTATACATCAACAGCATGCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      AAAAAAGCTTATACIACAGTATACATCAACAGCATGCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----GCGTTTTTGAAGTATCCAGGA

P-SETit, Ubq1-1:1:4      TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGGGACCGGTGAACCTTTCTCTTT
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGGGACCTGTGGTAACTTTCTCTTT
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGGGACCTGTGGTAACTTTCTCTTT

P-SETit, Ubq1-1:1:4      TGGCGCTTGTCTAATCTCGGCGGTGCTGGTTCATGCTTAGGCATAGGCAGAGATAGAGC
P-SETit, Ubq1-1:1:3      -----
P-SETit, Ubq1-1:1:1      TGGCGCTTGTCTAATCTCGGCGGTGCTGGTTCATGCTTAGGCATAGGCAGAGATAGAGC
P-SETit, Ubq1-1:1:2      -----TGGCGCTTGTCTAATCTCGGCGGTGCTGGTTCATGCTTAGGCATAGGCAGAGATAGAGC

```

FIG. 6a

## 【図 6 b】

```
P-SETit. Ubq1-1:1:4 CCGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTGAGGGGCGTGGGCTGGTTCCACTAGC
P-SETit. Ubq1-1:1:3 CCGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTGAGGGGCGTGGGCTGGTTCCACTAGC
P-SETit. Ubq1-1:1:1 CCGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTGAGGGGCGTGGGCTGGTTCCACTAGC
P-SETit. Ubq1-1:1:2 CCGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTGAGGGGCGTGGGCTGGTTCCACTAGC

P-SETit. Ubq1-1:1:4 CTACAGCTGTGCCAGCTGCGGGCCGCAAGCGGAAGCAAGCAGCGTGAGCGGTTGGACAG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 CTACAGCTGTGCCAGCTGCGGGCCGCAAGCGGAAGCAAGCAGCGTGAGCGGTTGGACAG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 CTACAGCTGTGCCAGCTGCGGGCCGCAAGCGGAAGCAAGCAGCGTGAGCGGTTGGACAG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 CTACAGCTGTGCCAGCTGCGGGCCGCAAGCGGAAGCAAGCAGCGTGAGCGGTTGGACAG

P-SETit. Ubq1-1:1:4 CTGTGCATAATGCCATTACGTGGATTACAGTAACCTGGCCCTGTAACTACTCTGTTGGCC
P-SETit. Ubq1-1:1:3 CTGTGCATAATGCCATTACGTGGATTACAGTAACCTGGCCCTGTAACTACTCTGTTGGCC
P-SETit. Ubq1-1:1:1 CTGTGCATAATGCCATTACGTGGATTACAGTAACCTGGCCCTGTAACTACTCTGTTGGCC
P-SETit. Ubq1-1:1:2 CTGTGCATAATGCCATTACGTGGATTACAGTAACCTGGCCCTGTAACTACTCTGTTGGCC

P-SETit. Ubq1-1:1:4 ATCATCAAAACGACGACGCTCGCTAGGCGACGACAGGGTAATGACGCGACGCCACCGAGGC
P-SETit. Ubq1-1:1:3 ATCATCAAAACGACGACGCTCGCTAGGCGACGACAGGGTAATGACGCGACGCCACCGAGGC
P-SETit. Ubq1-1:1:1 ATCATCAAAACGACGACGCTCGCTAGGCGACGACAGGGTAATGACGCGACGCCACCGAGGC
P-SETit. Ubq1-1:1:2 ATCATCAAAACGACGACGCTCGCTAGGCGACGACAGGGTAATGACGCGACGCCACCGAGGC

P-SETit. Ubq1-1:1:4 GCGCGCGCTAGCGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 GCGCGCGCTAGCGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 GCGCGCGCTAGCGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 GCGCGCGCTAGCGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG

P-SETit. Ubq1-1:1:4 GGTTAAACGCCAGAAACAGTGTGTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAATATTACACAGA
P-SETit. Ubq1-1:1:3 GGTTAAACGCCAGAAACAGTGTGTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAATATTACACAGA
P-SETit. Ubq1-1:1:1 GGTTAAACGCCAGAAACAGTGTGTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAATATTACACAGA
P-SETit. Ubq1-1:1:2 GGTTAAACGCCAGAAACAGTGTGTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAATATTACACAGA

P-SETit. Ubq1-1:1:4 AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAATGCCAAGCAGGAACCTCACGCCGCTA
P-SETit. Ubq1-1:1:3 AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAATGCCAAGCAGGAACCTCACGCCGCTA
P-SETit. Ubq1-1:1:1 AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAATGCCAAGCAGGAACCTCACGCCGCTA
P-SETit. Ubq1-1:1:2 AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAATGCCAAGCAGGAACCTCACGCCGCTA

P-SETit. Ubq1-1:1:4 ACATCCAAACGGCCAAACAGCTGACGTGCGCGGTGACGAGGATCGGAACCTGGTGAATG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 ACATCCAAACGGCCAAACAGCTGACGTGCGCGGTGACGAGGATCGGAACCTGGTGAATG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 ACATCCAAACGGCCAAACAGCTGACGTGCGCGGTGACGAGGATCGGAACCTGGTGAATG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 ACATCCAAACGGCCAAACAGCTGACGTGCGCGGTGACGAGGATCGGAACCTGGTGAATG

P-SETit. Ubq1-1:1:4 GTGGAGCGCGCAGTATGCGCCCGCAGCAGCGCGAGGTGTTGGTGGCCGTCGCGCCCTGCTG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 GTGGAGCGCGCAGTATGCGCCCGCAGCAGCGCGAGGTGTTGGTGGCCGTCGCGCCCTGCTG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 GTGGAGCGCGCAGTATGCGCCCGCAGCAGCGCGAGGTGTTGGTGGCCGTCGCGCCCTGCTG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 GTGGAGCGCGCAGTATGCGCCCGCAGCAGCGCGAGGTGTTGGTGGCCGTCGCGCCCTGCTG
```

FIG. 6b

## 【図 6 c】

```
P-SETit. Ubq1-1:1:4 TCTGCGCGGCTCGGGCAACTTGAACCTGGGCGACCGCTCGTGCAACTCGCAACCCGT
P-SETit. Ubq1-1:1:3 TCTGCGCGGCTCGGGCAACTTGAACCTGGGCGACCGCTCGTGCAACTCGCAACCCGT
P-SETit. Ubq1-1:1:1 TCTGCGCGGCTCGGGCAACTTGAACCTGGGCGACCGCTCGTGCAACTCGCAACCCGT
P-SETit. Ubq1-1:1:2 TCTGCGCGGCTCGGGCAACTTGAACCTGGGCGACCGCTCGTGCAACTCGCAACCCGT

P-SETit. Ubq1-1:1:4 TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTGTAAGGGGCGCGGTAGAAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTGTAAGGGGCGCGGTAGAAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTGTAAGGGGCGCGGTAGAAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTGTAAGGGGCGCGGTAGAAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG

P-SETit. Ubq1-1:1:4 CTTCGATTACATACATAGGCTGAAGCTCTAAACAGCGGCCGCGTGGCGCGCGATG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 CTTCGATTACATACATAGGCTGAAGCTCTAAACAGCGGCCGCGTGGCGCGCGATG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 CTTCGATTACATACATAGGCTGAAGCTCTAAACAGCGGCCGCGTGGCGCGCGATG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 CTTCGATTACATACATAGGCTGAAGCTCTAAACAGCGGCCGCGTGGCGCGCGATG

P-SETit. Ubq1-1:1:4 GAAAGAGACCGGATCTCTCTGTAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACACCG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 GAAAGAGACCGGATCTCTCTGTAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACACCG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 GAAAGAGACCGGATCTCTCTGTAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACACCG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 GAAAGAGACCGGATCTCTCTGTAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACACCG

P-SETit. Ubq1-1:1:4 ACGCGGAGAGGTGCTGCTGGTGCTCAACACGGCGCGGCGGCTGGGCTGGACCTTAACAG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 ACGCGGAGAGGTGCTGCTGGTGCTCAACACGGCGCGGCGGCTGGGCTGGACCTTAACAG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 ACGCGGAGAGGTGCTGCTGGTGCTCAACACGGCGCGGCGGCTGGGCTGGACCTTAACAG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 ACGCGGAGAGGTGCTGCTGGTGCTCAACACGGCGCGGCGGCTGGGCTGGACCTTAACAG

P-SETit. Ubq1-1:1:4 CAAGGACGCGCACGACCGCCCGCCGCTCGAGGCGATAAATACCTCCCATCC
P-SETit. Ubq1-1:1:3 CAAGGACGCGCACGACCGCCCGCCGCTCGAGGCGATAAATACCTCCCATCC
P-SETit. Ubq1-1:1:1 CAAGGACGCGCACGACCGCCCGCCGCTCGAGGCGATAAATACCTCCCATCC
P-SETit. Ubq1-1:1:2 CAAGGACGCGCACGACCGCCCGCCGCTCGAGGCGATAAATACCTCCCATCC

P-SETit. Ubq1-1:1:4 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG
P-SETit. Ubq1-1:1:3 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG
P-SETit. Ubq1-1:1:1 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG
P-SETit. Ubq1-1:1:2 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG

P-SETit. Ubq1-1:1:4 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT
P-SETit. Ubq1-1:1:3 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT
P-SETit. Ubq1-1:1:1 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT
P-SETit. Ubq1-1:1:2 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT

P-SETit. Ubq1-1:1:4 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT
P-SETit. Ubq1-1:1:3 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT
P-SETit. Ubq1-1:1:1 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT
P-SETit. Ubq1-1:1:2 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT

P-SETit. Ubq1-1:1:4 TTCCCTTCTCGCGCGCC-----
P-SETit. Ubq1-1:1:3 TTCCCTTCTCGCGCGCATATAAATAGCCACCGCTCCAGCTTCTCTGGCCACAT
P-SETit. Ubq1-1:1:1 TTCCCTTCTCGCGCGCATATAAATAGCCACCGCTCCAGCTTCTCTGGCCACAT
P-SETit. Ubq1-1:1:2 TTCCCTTCTCGCGCGCATATAAATAGCCACCGCTCCAGCTTCTCTGGCCACAT
```

FIG. 6c

## 【図 7 a】

```
E-C1. Ubq1-1:1:1 AAGCAGACTCGCATTTATGATGGAGCTCTACCAACTGGCCCTAGGCGATTAACTTACCATG
E-C1. Ubq1-1:1:1 AAGCAGACTCGCATTTATGATGGAGCTCTACCAACTGGCCCTAGGCGATTAACTTACCATG
E-C1. Ubq1-1:1:3 -----
E-C1. Ubq1-1:1:4 -----
E-C1. Ubq1-1:1:5 -----

E-C1. Ubq1-1:1:1 GATCAGATCGTAAAAAAGAACCTTACCATGGATCTTATGTTTCTTTTTCGCGTGA
E-C1. Ubq1-1:1:1 GATCAGATCGTAAAAAAGAACCTTACCATGGATCTTATGTTTCTTTTTCGCGTGA
E-C1. Ubq1-1:1:3 -----
E-C1. Ubq1-1:1:4 -----
E-C1. Ubq1-1:1:5 -----

E-C1. Ubq1-1:1:1 AGAGTGAAGTCATCATCAATATTACCATGGCGGCGTAGGAGCGTTCGTGGAAGACCCA
E-C1. Ubq1-1:1:1 AGAGTGAAGTCATCATCAATATTACCATGGCGGCGTAGGAGCGTTCGTGGAAGACCCA
E-C1. Ubq1-1:1:3 AGAGTGAAGTCATCATCAATATTACCATGGCGGCGTAGGAGCGTTCGTGGAAGACCCA
E-C1. Ubq1-1:1:4 AGAGTGAAGTCATCATCAATATTACCATGGCGGCGTAGGAGCGTTCGTGGAAGACCCA
E-C1. Ubq1-1:1:5 AGAGTGAAGTCATCATCAATATTACCATGGCGGCGTAGGAGCGTTCGTGGAAGACCCA

E-C1. Ubq1-1:1:1 TAGGGGGCGGTACTCGCACCGTGGTGTGTTCTGTTATGTAATATCGAATGGGAGCA
E-C1. Ubq1-1:1:1 TAGGGGGCGGTACTCGCACCGTGGTGTGTTCTGTTATGTAATATCGAATGGGAGCA
E-C1. Ubq1-1:1:3 TAGGGGGCGGTACTCGCACCGTGGTGTGTTCTGTTATGTAATATCGAATGGGAGCA
E-C1. Ubq1-1:1:4 TAGGGGGCGGTACTCGCACCGTGGTGTGTTCTGTTATGTAATATCGAATGGGAGCA
E-C1. Ubq1-1:1:5 TAGGGGGCGGTACTCGCACCGTGGTGTGTTCTGTTATGTAATATCGAATGGGAGCA

E-C1. Ubq1-1:1:1 GTCGGCTAGGTTGGTCCATCGGTTAGTGTGTCCTGTTAGTGGCTAGATGGCGATGTT
E-C1. Ubq1-1:1:1 GTCGGCTAGGTTGGTCCATCGGTTAGTGTGTCCTGTTAGTGGCTAGATGGCGATGTT
E-C1. Ubq1-1:1:3 GTCGGCTAGGTTGGTCCATCGGTTAGTGTGTCCTGTTAGTGGCTAGATGGCGATGTT
E-C1. Ubq1-1:1:4 GTCGGCTAGGTTGGTCCATCGGTTAGTGTGTCCTGTTAGTGGCTAGATGGCGATGTT
E-C1. Ubq1-1:1:5 GTCGGCTAGGTTGGTCCATCGGTTAGTGTGTCCTGTTAGTGGCTAGATGGCGATGTT

E-C1. Ubq1-1:1:1 TGTCTTCAAAACCTCTTTCTCTTAATAACAATCATACGCAAAATTTTTCGGTATTGGA
E-C1. Ubq1-1:1:1 TGTCTTCAAAACCTCTTTCTCTTAATAACAATCATACGCAAAATTTTTCGGTATTGGA
E-C1. Ubq1-1:1:3 TGTCTTCAAAACCTCTTTCTCTTAATAACAATCATACGCAAAATTTTTCGGTATTGGA
E-C1. Ubq1-1:1:4 TGTCTTCAAAACCTCTTTCTCTTAATAACAATCATACGCAAAATTTTTCGGTATTGGA
E-C1. Ubq1-1:1:5 TGTCTTCAAAACCTCTTTCTCTTAATAACAATCATACGCAAAATTTTTCGGTATTGGA

E-C1. Ubq1-1:1:1 GAAAAAAGAGATCTATCTGTTTITTTTTTGAATGGCTCAATTTATAGGAGGAGCC
E-C1. Ubq1-1:1:1 GAAAAAAGAGATCTATCTGTTTITTTTTTGAATGGCTCAATTTATAGGAGGAGCC
E-C1. Ubq1-1:1:3 GAAAAAAGAGATCTATCTGTTTITTTTTTGAATGGCTCAATTTATAGGAGGAGCC
E-C1. Ubq1-1:1:4 GAAAAAAGAGATCTATCTGTTTITTTTTTGAATGGCTCAATTTATAGGAGGAGCC
E-C1. Ubq1-1:1:5 GAAAAAAGAGATCTATCTGTTTITTTTTTGAATGGCTCAATTTATAGGAGGAGCC

E-C1. Ubq1-1:1:1 CGTTTAAACGGCGTCGACAAATCTAACGGACACCAACAGCGAATGAGCGAACCCACGACG
E-C1. Ubq1-1:1:1 CGTTTAAACGGCGTCGACAAATCTAACGGACACCAACAGCGAATGAGCGAACCCACGACG
E-C1. Ubq1-1:1:3 CGTTTAAACGGCGTCGACAAATCTAACGGACACCAACAGCGAATGAGCGAACCCACGACG
E-C1. Ubq1-1:1:4 CGTTTAAACGGCGTCGACAAATCTAACGGACACCAACAGCGAATGAGCGAACCCACGACG
E-C1. Ubq1-1:1:5 CGTTTAAACGGCGTCGACAAATCTAACGGACACCAACAGCGAATGAGCGAACCCACGACG
```

FIG. 7a

## 【図 7 b】

```
E-C1. Ubq1-1:1:1 GCGAAGCTAGCCAGCGAAGCAGACGGCGGACGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA
E-C1. Ubq1-1:1:1 GCGAAGCTAGCCAGCGAAGCAGACGGCGGACGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA
E-C1. Ubq1-1:1:3 GCGAAGCTAGCCAGCGAAGCAGACGGCGGACGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA
E-C1. Ubq1-1:1:4 GCGAAGCTAGCCAGCGAAGCAGACGGCGGACGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA
E-C1. Ubq1-1:1:5 GCGAAGCTAGCCAGCGAAGCAGACGGCGGACGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA

E-C1. Ubq1-1:1:1 TCTCGCTGCTGGCTGGCTGGCTTGGCCCTTCGCGAGAGTTGCGGTCACTTCCACT
E-C1. Ubq1-1:1:1 TCTCGCTGCTGGCTGGCTGGCTTGGCCCTTCGCGAGAGTTGCGGTCACTTCCACT
E-C1. Ubq1-1:1:3 TCTCGCTGCTGGCTGGCTGGCTTGGCCCTTCGCGAGAGTTGCGGTCACTTCCACT
E-C1. Ubq1-1:1:4 TCTCGCTGCTGGCTGGCTGGCTTGGCCCTTCGCGAGAGTTGCGGTCACTTCCACT
E-C1. Ubq1-1:1:5 TCTCGCTGCTGGCTGGCTGGCTTGGCCCTTCGCGAGAGTTGCGGTCACTTCCACT

E-C1. Ubq1-1:1:1 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG
E-C1. Ubq1-1:1:1 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG
E-C1. Ubq1-1:1:3 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG
E-C1. Ubq1-1:1:4 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG
E-C1. Ubq1-1:1:5 GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCCTTCGCGTGGGACTTGTTCGGTTCATCGGTTGGG

E-C1. Ubq1-1:1:1 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT
E-C1. Ubq1-1:1:1 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT
E-C1. Ubq1-1:1:3 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT
E-C1. Ubq1-1:1:4 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT
E-C1. Ubq1-1:1:5 GCATCGGAAATTCGGTGGCGTAGAGCAGGGGCGCTCTCTTCACACGGCAGGAAACCGT

E-C1. Ubq1-1:1:1 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT
E-C1. Ubq1-1:1:1 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT
E-C1. Ubq1-1:1:3 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT
E-C1. Ubq1-1:1:4 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT
E-C1. Ubq1-1:1:5 CACGAGCTCACGGCACCGGCGACGACGGCGGGGATTCCTTCCCCACACCGCTCTTCCCT

E-C1. Ubq1-1:1:1 TTCCCTTCTCGCGCGCC-----
E-C1. Ubq1-1:1:1 TTCCCTTCTCGCGCGCATATAAATAGCCACCGCTCCAGCTTCTCTGGCCACAT
E-C1. Ubq1-1:1:3 TTCCCTTCTCGCGCGCATATAAATAGCCACCGCTCCAGCTTCTCTGGCCACAT
E-C1. Ubq1-1:1:4 TTCCCTTCTCGCGCGCATATAAATAGCCACCGCTCCAGCTTCTCTGGCCACAT
E-C1. Ubq1-1:1:5 TTCCCTTCTCGCGCGCATATAAATAGCCACCGCTCCAGCTTCTCTGGCCACAT
```

FIG. 7b

## 【図 8】

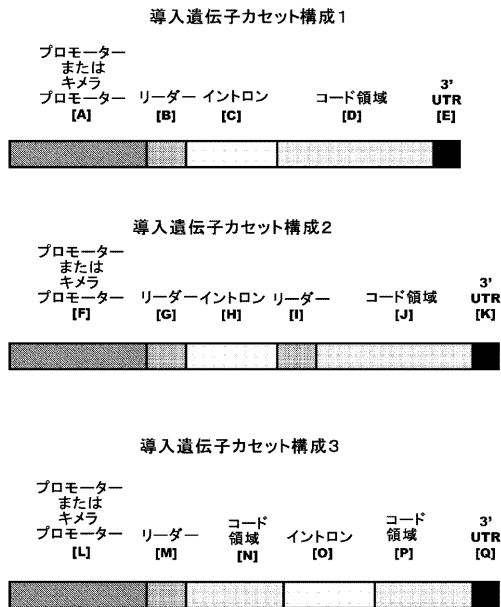


FIG. 8

## 【配列表】

2016165295000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成28年4月7日(2016.4.7)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 配列番号27-32のいずれかに対して少なくとも85パーセントの配列同一性を有する配列；

b) 配列番号27-32のいずれかを含む配列；ならびに

c) 遺伝子調節活性を有する、配列番号27-32のいずれかのフラグメントからなる群より選択されるDNA配列を含み、該配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されているDNA分子。

【請求項2】

該配列が配列番号27-32のいずれかのDNA配列に対して少なくとも90パーセントの配列同一性を有する、請求項1に記載のDNA分子。

【請求項3】

該配列が配列番号27-32のいずれかのDNA配列に対して少なくとも95パーセントの配列同一性を有する、請求項1に記載のDNA分子。

【請求項4】

DNA配列が遺伝子調節活性を有する、請求項1に記載のDNA分子。

**【請求項 5】**

異種転写可能ポリヌクレオチド分子が作物栽培学的関心対象の遺伝子を含む、請求項1に記載のDNA分子。

**【請求項 6】**

作物栽培学的関心対象の遺伝子が植物における除草剤耐性を付与する、請求項5に記載のDNA分子。

**【請求項 7】**

作物栽培学的関心対象の遺伝子が植物における病虫害耐性を付与する、請求項5に記載のDNA分子。

**【請求項 8】**

- a) 配列番号27-32のいずれかに対して少なくとも85パーセントの配列同一性を有する配列；
- b) 配列番号27-32のいずれかを含む配列；ならびに
- c) 遺伝子調節活性を有する、配列番号27-32のいずれかのフラグメントからなる群より選択される配列を含み、該配列が異種転写可能ポリヌクレオチド分子に作動的に連結されている異種DNA分子を含むトランスジェニック植物細胞。

**【請求項 9】**

単子葉植物細胞である、請求項8に記載のトランスジェニック植物細胞。

**【請求項 10】**

双子葉植物細胞である、請求項8に記載のトランスジェニック植物細胞。

**【請求項 11】**

請求項1に記載のDNA分子を含むトランスジェニック植物またはその部分。

**【請求項 12】**

該DNA分子を含む、請求項11に記載のトランスジェニック植物の子孫植物またはその部分。

**【請求項 13】**

請求項1に記載のDNA分子を含むトランスジェニック種子。

**【請求項 14】**

請求項11に記載のトランスジェニック植物またはその部分を取得すること、およびそこから商品生産物を生産することを含む、商品生産物を生産する方法。

**【請求項 15】**

商品生産物が、タンパク質濃縮物、タンパク質単離物、穀物、デンプン、種子、粗挽き粉、穀粉、バイオマス、または種油である、請求項14に記載の方法。

**【請求項 16】**

請求項1に記載のDNA分子を含む商品生産物。

**【請求項 17】**

タンパク質濃縮物、タンパク質単離物、穀物、デンプン、種子、粗挽き粉、穀粉、バイオマス、または種油である、請求項16に記載の商品生産物。

**【請求項 18】**

転写可能ポリヌクレオチド分子を発現させる方法であって、請求項11に記載のトランスジェニック植物を取得すること、および植物を栽培することを含み、そこで転写可能ポリヌクレオチドが発現する方法。

---

フロントページの続き

| (51)Int.Cl.    |             |                  | F I     |      | テーマコード (参考) |  |
|----------------|-------------|------------------|---------|------|-------------|--|
| <b>A 0 1 H</b> | <b>5/08</b> | <b>(2006.01)</b> | A 0 1 H | 5/08 |             |  |
| <b>C 1 2 P</b> | <b>1/00</b> | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 P | 1/00 | Z           |  |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>5/10</b> | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 N | 5/10 |             |  |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>5/14</b> | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 N | 5/14 |             |  |
| <b>A 0 1 H</b> | <b>1/00</b> | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 P | 1/00 | A           |  |
|                |             |                  | A 0 1 H | 1/00 | A           |  |

Fターム(参考) 2B030 AD04 AD05 CA14 CB02 CB03 CG05  
4B064 AB01 AC01 AD85 AD87 AE01 AF01 AG01 DA10 DA11  
4B065 AA88X AA88Y AB03 AB10 AC20 CA53

【外国語明細書】

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**PLANT REGULATORY ELEMENTS AND USES THEREOF****REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

[001] This application claims the benefit of United States provisional application No. 61/467,875 filed March 25, 2011 which is herein incorporated by reference in its entirety.

**INCORPORATION OF SEQUENCE LISTING**

[002] The sequence listing that is contained in the file named "MONS282WO\_seq.txt", which is 347 kilobytes (as measured in Microsoft Windows®) and was created on March 21, 2012, is filed herewith by electronic submission and is incorporated by reference herein.

**FIELD OF THE INVENTION**

[003] The invention relates to the field of plant molecular biology and plant genetic engineering, and DNA molecules useful for modulating gene expression in plants.

**BACKGROUND**

[004] Regulatory elements are genetic elements that regulate gene activity by modulating the transcription of an operably linked transcribable polynucleotide molecule. Such elements include promoters, leaders, introns, and 3' untranslated regions and are useful in the field of plant molecular biology and plant genetic engineering.

**SUMMARY OF THE INVENTION**

[005] The present invention provides novel gene regulatory elements for use in plants. The present invention also provides DNA constructs comprising the regulatory elements. The present invention also provides transgenic plant cells, plants, and seeds comprising the regulatory elements. The sequences may be provided operably linked to a transcribable polynucleotide molecule. In one embodiment, the transcribable polynucleotide molecule may be heterologous with respect to a regulatory sequence provided herein. A regulatory element sequence provided by the invention thus may, in particular embodiments, be defined as operably linked to a heterologous transcribable polynucleotide molecule. The present invention also provides methods of making and using the regulatory elements, the DNA constructs comprising the

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

regulatory elements, and the transgenic plant cells, plants, and seeds comprising the regulatory elements operably linked to a transcribable polynucleotide molecule.

[006] Thus, in one aspect, the present invention provides a DNA molecule comprising a DNA sequence selected from the group consisting of: a) a sequence with at least about 85 percent sequence identity to any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183; b) a sequence comprising any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183; and c) a fragment of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183, wherein the fragment has gene-regulatory activity; wherein the sequence is operably linked to a heterologous transcribable polynucleotide molecule. In specific embodiments, the DNA molecule comprises at least about 90 percent, at least about 95 percent, at least about 98 percent, or at least about 99 percent sequence identity to the DNA sequence of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183. In certain embodiments of the DNA molecule, the DNA sequence comprises a regulatory element. In some embodiments the regulatory element comprises a promoter. In particular embodiments, the heterologous transcribable polynucleotide molecule comprises a gene of agronomic interest, such as a gene capable of providing herbicide resistance in plants, or a gene capable of providing plant pest resistance in plants.

[007] The invention also provides a transgenic plant cell comprising a heterologous DNA construct provided by the invention, including a sequence of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183, or a fragment or variant thereof, wherein said sequence is operably linked to a heterologous transcribable polynucleotide molecule. In certain embodiments, the transgenic plant cell is a monocotyledonous plant cell. In other embodiments, the transgenic plant cell is a dicotyledonous plant cell.

[008] Further provided by the invention is a transgenic plant, or part thereof, comprising a DNA molecule as provided herein, including a DNA sequence selected from the group consisting of: a) a sequence with at least 85 percent sequence identity to any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183; b) a sequence comprising any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183; and c) a fragment of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183, wherein the fragment has gene-regulatory activity; wherein the sequence is operably linked to a heterologous transcribable polynucleotide molecule. In specific embodiments, the transgenic plant may be a progeny plant of any generation that comprises the DNA molecule, relative to a starting transgenic plant comprising the DNA molecule. Still further provided is a transgenic seed comprising a DNA molecule according to the invention.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[009] In yet another aspect, the invention provides a method of producing a commodity product comprising obtaining a transgenic plant or part thereof according to the invention and producing the commodity product therefrom. In one embodiment, a commodity product of the invention is protein concentrate, protein isolate, grain, starch, seeds, meal, flour, biomass, or seed oil. In another aspect, the invention provides a commodity produced using the above method. For instance, in one embodiment the invention provides a commodity product comprising a DNA molecule as provided herein, including a DNA sequence selected from the group consisting of: a) a sequence with at least 85 percent sequence identity to any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183; b) a sequence comprising any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183; and c) a fragment of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183, wherein the fragment has gene-regulatory activity; wherein the sequence is operably linked to a heterologous transcribable polynucleotide molecule.

[0010] In still yet another aspect, the invention provides a method of expressing a transcribable polynucleotide molecule that comprises obtaining a transgenic plant according to the invention, such as a plant comprising a DNA molecule as described herein, and cultivating plant, wherein a transcribable polynucleotide in the DNA molecule is expressed.

[0011] Throughout this specification and the claims, unless the context requires otherwise, the word "comprise" and its variations, such as "comprises" and "comprising," will be understood to imply the inclusion of a stated composition, step, and/or value, or group thereof, but not the exclusion of any other composition, step, and/or value, or group thereof.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0012] **FIGS. 1a- 1h** depict alignment of promoter size variants corresponding to promoter elements isolated from the grass species *Andropogon gerardii*. In particular, Figs. 1a-1h show alignment of the 2603 bp promoter sequence P-ANDge.Ubq1-1:1:11 (SEQ ID NO: 2), found in the transcriptional regulatory expression element group EXP-ANDge.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 1), with promoter sequences derived via deletion analysis of P-ANDge.Ubq1-1:1:11. Deletion, for instance of the 5' end of P-ANDge.Ubq1-1:1:11, produced the promoter P-ANDge.Ubq1-1:1:9 (SEQ ID NO: 6), a 2114 bp sequence which is found within EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5). Other promoter sequences in Fig. 1 include P-ANDge.Ubq1-1:1:10 (SEQ ID NO: 9), a 1644 bp sequence comprised within EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8); P-ANDge.Ubq1-1:1:12 (SEQ ID NO: 11), a 1472 bp sequence comprised within EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

ID NO: 10); P-ANDge.Ubq1-1:1:8 (SEQ ID NO: 13), a 1114 bp sequence comprised within EXP-ANDge.Ubq1-1:1:6 (SEQ ID NO: 12); P-ANDge.Ubq1-1:1:13 (SEQ ID NO: 15), a 771 bp sequence comprised within EXP-ANDge.Ubq1-1:1:11 (SEQ ID NO: 14); and P-ANDge.Ubq1-1:1:14 (SEQ ID NO: 17), a 482 bp sequence comprised within EXP-ANDge.Ubq1-1:1:12 (SEQ ID NO: 16).

[0013] **FIGS. 2a- 2g** depict alignment of promoter variants isolated from the grass *Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*). In particular, FIGS. 2a- 2g show an alignment of the 2536 bp promoter sequence P-ERlra.Ubq1-1:1:10 (SEQ ID NO: 19) (found, for instance, within the transcriptional regulatory expression element group EXP-ERlra.Ubq1 (SEQ ID NO: 18)) with promoter sequences derived from deletion analysis of P-ERlra.Ubq1-1:1:10: a 2014 bp promoter sequence P-ERlra.Ubq1-1:1:9 (SEQ ID NO: 23); a 1525 bp promoter sequence P-ERlra.Ubq1-1:1:11 (SEQ ID NO: 26); a 1044 bp promoter sequence P-ERlra.Ubq1-1:1:8 (SEQ ID NO: 28); a 796 bp sequence P-ERlra.Ubq1-1:1:12 (SEQ ID NO: 30); and a 511 bp sequence P-ERlra.Ubq1-1:1:13 (SEQ ID NO: 32).

[0014] **FIGS. 3a- 3c** depict alignment of promoter size variants corresponding to promoter elements isolated from the grass species *Setaria viridis*. In particular, FIGS. 3a-3c show an alignment of a 1493 bp promoter sequence, P-Sv.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 34) with promoters derived from deletion analysis of the 5' end of P-Sv.Ubq1-1:1:1: a 1035 bp sized promoter P-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 38); and a 681 bp promoter sequence P-Sv.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 40).

[0015] **FIGS. 4a- 4e** depict alignment of transcriptional regulatory expression element group variants derived from the grass *Zea mays* subsp. *mexicana*. In particular, FIGS. 4a- 4e compare a 2005 bp transcriptional regulatory expression element group termed EXP-Zm.UbqM1:1:2 (SEQ ID NO: 49) with allelic variant EXP-Zm.UbqM1:1:5 (SEQ ID NO: 53), as well as with size variants EXP-Zm.UbqM1:1:1 (SEQ ID NO: 41), which is 1922 bps in length, and EXP-Zm.UbqM1:1:4 (SEQ ID NO: 45), which is 1971 bps in length.

[0016] **FIGS. 5a- 5b** depict alignment of promoter size variants isolated from the grass *Sorghum bicolor*. In particular, FIGS. 5a- 5b shows alignment of the 791 bp sized promoter element, P-Sb.Ubq6-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) comprised within the transcriptional regulatory expression

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

element group EXP-Sb.Ubq6 (SEQ ID NO: 59), with 855 bp promoter element P-Sb.Ubq6-1:1:1 (SEQ ID NO: 64) comprised within EXP-Sb.Ubq6:1:1 (SEQ ID NO: 63).

[0017] **FIGS. 6a- 6c** depict alignment of promoter size variants corresponding to promoter elements isolated from the grass *Setaria italica*. In particular, FIGS. 6a- 6c show an alignment of the 1492 bp promoter variant P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 70) with 1492 bp promoter variant P-SETit.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 74), 1034 bp promoter element P-SETit.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 76), and 680 bp promoter element P-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 78).

[0018] **FIGS. 7a- 7b** depict alignment of promoter size variants and an enhancer element corresponding to promoter elements isolated from the grass species *Coix lachryma-jobi*. In particular, FIGS. 7a and 7b show an alignment of the 837 bp promoter variant, P-Cl.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 80) found within transcriptional regulatory expression element group EXP-Cl.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 79), with an enhancer fragment derived from P-Cl.Ubq1-1:1:1, termed E-Cl.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 89) that is 798 bp in length, as well as with three 5' end deletion variants of P-Cl.Ubq1-1:1:1: a 742 bp element P-Cl.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 84); a 401 bp element P-Cl.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 86); and a 54 bp minimal promoter element P-Cl.Ubq1-1:1:5 (SEQ ID NO: 88).

[0019] **FIG. 8** depicts transgene cassette configurations of the present invention.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCES

[0020] SEQ ID NOS: 1, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 49, 53, 55, 59, 63, 65, 69, 73, 75, 77, 79, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 128, 130, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 180, 181 and 183 are sequences of transcriptional regulatory expression element groups or EXP sequences comprising a promoter sequence operably linked 5' to a leader sequence which is operably linked 5' to an intron sequence.

[0021] SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 and 135 are promoter sequences.

[0022] SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 and 81 are leader sequences.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0023] SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182 are intron sequences.

[0024] SEQ ID NO: 89 is the sequence of an enhancer.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0025] The invention disclosed herein provides polynucleotide molecules having beneficial gene regulatory activity from plant species. The design, construction, and use of these polynucleotide molecules are provided by the invention. The nucleotide sequences of these polynucleotide molecules are provided among SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183. These polynucleotide molecules are, for instance, capable of affecting the expression of an operably linked transcribable polynucleotide molecule in plant tissues, and therefore selectively regulating gene expression, or activity of an encoded gene product, in transgenic plants. The present invention also provides methods of modifying, producing, and using the same. The invention also provides compositions, transformed host cells, transgenic plants, and seeds containing the promoters and/or other disclosed nucleotide sequences, and methods for preparing and using the same.

[0026] The following definitions and methods are provided to better define the present invention and to guide those of ordinary skill in the art in the practice of the present invention. Unless otherwise noted, terms are to be understood according to conventional usage by those of ordinary skill in the relevant art.

##### DNA Molecules

[0027] As used herein, the term "DNA" or "DNA molecule" refers to a double-stranded DNA molecule of genomic or synthetic origin, *i.e.* a polymer of deoxyribonucleotide bases or a polynucleotide molecule, read from the 5' (upstream) end to the 3' (downstream) end. As used herein, the term "DNA sequence" refers to the nucleotide sequence of a DNA molecule. The nomenclature used herein corresponds to that of by Title 37 of the United States Code of Federal Regulations § 1.822, and set forth in the tables in WIPO Standard ST.25 (1998), Appendix 2, Tables 1 and 3.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0028] As used herein, the term “isolated DNA molecule” refers to a DNA molecule at least partially separated from other molecules normally associated with it in its native or natural state. In one embodiment, the term “isolated” refers to a DNA molecule that is at least partially separated from some of the nucleic acids which normally flank the DNA molecule in its native or natural state. Thus, DNA molecules fused to regulatory or coding sequences with which they are not normally associated, for example as the result of recombinant techniques, are considered isolated herein. Such molecules are considered isolated when integrated into the chromosome of a host cell or present in a nucleic acid solution with other DNA molecules, in that they are not in their native state.

[0029] Any number of methods well known to those skilled in the art can be used to isolate and manipulate a DNA molecule, or fragment thereof, disclosed in the present invention. For example, PCR (polymerase chain reaction) technology can be used to amplify a particular starting DNA molecule and/or to produce variants of the original molecule. DNA molecules, or fragment thereof, can also be obtained by other techniques such as by directly synthesizing the fragment by chemical means, as is commonly practiced by using an automated oligonucleotide synthesizer.

[0030] As used herein, the term “sequence identity” refers to the extent to which two optimally aligned polynucleotide sequences or two optimally aligned polypeptide sequences are identical. An optimal sequence alignment is created by manually aligning two sequences, *e.g.* a reference sequence and another sequence, to maximize the number of nucleotide matches in the sequence alignment with appropriate internal nucleotide insertions, deletions, or gaps. As used herein, the term “reference sequence” refers to a sequence provided as the polynucleotide sequences of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183.

[0031] As used herein, the term “percent sequence identity” or “percent identity” or “% identity” is the identity fraction times 100. The “identity fraction” for a sequence optimally aligned with a reference sequence is the number of nucleotide matches in the optimal alignment, divided by the total number of nucleotides in the reference sequence, *e.g.* the total number of nucleotides in the full length of the entire reference sequence. Thus, one embodiment of the invention is a DNA molecule comprising a sequence that when optimally aligned to a reference sequence, provided herein as SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183, has at least about 85 percent identity, at least about 90 percent identity, at least about 95 percent identity, at least about 96 percent identity, at least

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

about 97 percent identity, at least about 98 percent identity, or at least about 99 percent identity to the reference sequence. In particular embodiments such sequences may be defined as having gene-regulatory activity.

**Regulatory Elements**

[0032] A regulatory element is a DNA molecule having gene regulatory activity, *i.e.* one that has the ability to affect the transcription and/or translation of an operably linked transcribable polynucleotide molecule. The term “gene regulatory activity” thus refers to the ability to affect the expression pattern of an operably linked transcribable polynucleotide molecule by affecting the transcription and/or translation of that operably linked transcribable polynucleotide molecule. As used herein, a transcriptional regulatory expression element group or “EXP” sequence may be comprised of expression elements, such as enhancers, promoters, leaders and introns, operably linked. Thus a transcriptional regulatory expression element group may be comprised, for instance, of a promoter operably linked 5′ to a leader sequence, which is in turn operably linked 5′ to an intron sequence. The intron sequence may be comprised of a sequence beginning at the point of the first intron/exon splice junction of the native sequence and further may be comprised of a small leader fragment comprising the second intron/exon splice junction so as to provide for proper intron/exon processing to facilitate transcription and proper processing of the resulting transcript. Leaders and introns may positively affect transcription of an operably linked transcribable polynucleotide molecule as well as translation of the resulting transcribed RNA. The pre-processed RNA molecule comprises leaders and introns, which may affect the post-transcriptional processing of the transcribed RNA and/or the export of the transcribed RNA molecule from the cell nucleus into the cytoplasm. Following post-transcriptional processing of the transcribed RNA molecule, the leader sequence may be retained as part of the final messenger RNA and may positively affect the translation of the messenger RNA molecule.

[0033] Regulatory elements such as promoters, leaders, introns, and transcription termination regions (or 3′ UTRs) are DNA molecules that have gene regulatory activity and play an integral part in the overall expression of genes in living cells. The term “regulatory element” refers to a DNA molecule having gene regulatory activity, *i.e.* one that has the ability to affect the transcription and/or translation of an operably linked transcribable polynucleotide molecule. Isolated regulatory elements, such as promoters and leaders that function in plants are therefore useful for modifying plant phenotypes through the methods of genetic engineering.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0034] Regulatory elements may be characterized by their expression pattern effects (qualitatively and/or quantitatively), *e.g.* positive or negative effects and/or constitutive or other effects such as by their temporal, spatial, developmental, tissue, environmental, physiological, pathological, cell cycle, and/or chemically responsive expression pattern, and any combination thereof, as well as by quantitative or qualitative indications. A promoter is useful as a regulatory element for modulating the expression of an operably linked transcribable polynucleotide molecule.

[0035] As used herein, a “gene expression pattern” is any pattern of transcription of an operably linked DNA molecule into a transcribed RNA molecule. The transcribed RNA molecule may be translated to produce a protein molecule or may provide an antisense or other regulatory RNA molecule, such as a dsRNA, a tRNA, an rRNA, a miRNA, and the like.

[0036] As used herein, the term “protein expression” is any pattern of translation of a transcribed RNA molecule into a protein molecule. Protein expression may be characterized by its temporal, spatial, developmental, or morphological qualities as well as by quantitative or qualitative indications.

[0037] As used herein, the term “promoter” refers generally to a DNA molecule that is involved in recognition and binding of RNA polymerase II and other proteins (trans-acting transcription factors) to initiate transcription. A promoter may be initially isolated from the 5′ untranslated region (5′ UTR) of a genomic copy of a gene. Alternately, promoters may be synthetically produced or manipulated DNA molecules. Promoters may also be chimeric, that is a promoter produced through the fusion of two or more heterologous DNA molecules. Promoters useful in practicing the present invention include SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 and 135, or fragments or variants thereof. In specific embodiments of the invention, such molecules and any variants or derivatives thereof as described herein, are further defined as comprising promoter activity, *i.e.*, are capable of acting as a promoter in a host cell, such as in a transgenic plant. In still further specific embodiments, a fragment may be defined as exhibiting promoter activity possessed by the starting promoter molecule from which it is derived, or a fragment may comprise a “minimal promoter” which provides a basal level of transcription and is comprised of a TATA box or equivalent sequence for recognition and binding of the RNA polymerase II complex for initiation of transcription.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0038] In one embodiment, fragments are provided of a promoter sequence disclosed herein. Promoter fragments may comprise promoter activity, as described above, and may be useful alone or in combination with other promoters and promoter fragments, such as in constructing chimeric promoters. In specific embodiments, fragments of a promoter are provided comprising at least about 50, 95, 150, 250, 500, 750, or at least about 1000 contiguous nucleotides, or longer, of a polynucleotide molecule having promoter activity disclosed herein.

[0039] Compositions derived from any of the promoters presented as SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 and 135, such as internal or 5' deletions, for example, can be produced using methods known in the art to improve or alter expression, including by removing elements that have either positive or negative effects on expression; duplicating elements that have positive or negative effects on expression; and/or duplicating or removing elements that have tissue or cell specific effects on expression. Compositions derived from any of the promoters presented as SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 and 135 comprised of 3' deletions in which the TATA box element or equivalent sequence thereof and downstream sequence is removed can be used, for example, to make enhancer elements. Further deletions can be made to remove any elements that have positive or negative; tissue specific; cell specific; or timing specific (such as, but not limited to, circadian rhythms) effects on expression. Any of the promoters presented as SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 and 135 and fragments or enhancers derived there from can be used to make chimeric transcriptional regulatory element compositions comprised of any of the promoters presented as SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 and 135 and the fragments or enhancers derived therefrom operably linked to other enhancers and promoters. The efficacy of the modifications, duplications or deletions described herein on the desired expression aspects of a particular transgene may be tested empirically in stable and transient plant assays, such as those described in the working examples herein, so as to validate the results, which may vary depending upon the changes made and the goal of the change in the starting molecule.

[0040] As used herein, the term "leader" refers to a DNA molecule isolated from the untranslated 5' region (5' UTR) of a genomic copy of a gene and defined generally as a

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

nucleotide segment between the transcription start site (TSS) and the protein coding sequence start site. Alternately, leaders may be synthetically produced or manipulated DNA elements. A leader can be used as a 5' regulatory element for modulating expression of an operably linked transcribable polynucleotide molecule. Leader molecules may be used with a heterologous promoter or with their native promoter. Promoter molecules of the present invention may thus be operably linked to their native leader or may be operably linked to a heterologous leader. Leaders useful in practicing the present invention include SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 and 81 or fragments or variants thereof. In specific embodiments, such sequences may be provided defined as being capable of acting as a leader in a host cell, including, for example, a transgenic plant cell. In one embodiment such sequences are decoded as comprising leader activity.

[0041] The leader sequences (5' UTR) presented as SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 and 81 may be comprised of regulatory elements or may adopt secondary structures that can have an effect on transcription or translation of a transgene. The leader sequences presented as SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 and 81 can be used in accordance with the invention to make chimeric regulatory elements that affect transcription or translation of a transgene. In addition, the leader sequences presented as SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 and 81 can be used to make chimeric leader sequences that affect transcription or translation of a transgene.

[0042] The introduction of a foreign gene into a new plant host does not always result in a high expression of the incoming gene. Furthermore, if dealing with complex traits, it is sometimes necessary to modulate several genes with spatially or temporarily different expression pattern. Introns can principally provide such modulation. However multiple use of the same intron in one plant has shown to exhibit disadvantages. In those cases it is necessary to have a collection of basic control elements for the construction of appropriate recombinant DNA elements. As the available collection of introns known in the art with expression enhancing properties is limited, alternatives are needed.

[0043] Compositions derived from any of the introns presented as SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182 can be comprised of internal deletions or duplications of cis regulatory elements; and/or alterations of the 5' and 3'

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

sequences comprising the intron/exon splice junctions can be used to improve expression or specificity of expression when operably linked to a promoter + leader or chimeric promoter + leader and coding sequence. Alterations of the 5' and 3' regions comprising the intron/exon splice junction can also be made to reduce the potential for introduction of false start and stop codons being produced in the resulting transcript after processing and splicing of the messenger RNA. The introns can be tested empirically as described in the working examples to determine the intron's effect on expression of a transgene.

[0044] In accordance with the invention a promoter or promoter fragment may be analyzed for the presence of known promoter elements, *i.e.* DNA sequence characteristics, such as a TATA-box and other known transcription factor binding site motifs. Identification of such known promoter elements may be used by one of skill in the art to design variants of the promoter having a similar expression pattern to the original promoter.

[0045] As used herein, the term "enhancer" or "enhancer element" refers to a cis-acting transcriptional regulatory element, a.k.a. cis-element, which confers an aspect of the overall expression pattern, but is usually insufficient alone to drive transcription, of an operably linked polynucleotide sequence. Unlike promoters, enhancer elements do not usually include a transcription start site (TSS) or TATA box or equivalent sequence. A promoter may naturally comprise one or more enhancer elements that affect the transcription of an operably linked polynucleotide sequence. An isolated enhancer element may also be fused to a promoter to produce a chimeric promoter cis-element, which confers an aspect of the overall modulation of gene expression. A promoter or promoter fragment may comprise one or more enhancer elements that effect the transcription of operably linked genes. Many promoter enhancer elements are believed to bind DNA-binding proteins and/or affect DNA topology, producing local conformations that selectively allow or restrict access of RNA polymerase to the DNA template or that facilitate selective opening of the double helix at the site of transcriptional initiation. An enhancer element may function to bind transcription factors that regulate transcription. Some enhancer elements bind more than one transcription factor, and transcription factors may interact with different affinities with more than one enhancer domain. Enhancer elements can be identified by a number of techniques, including deletion analysis, *i.e.* deleting one or more nucleotides from the 5' end or internal to a promoter; DNA binding protein analysis using DNase I footprinting, methylation interference, electrophoresis mobility-shift assays, *in*

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

*vivo* genomic footprinting by ligation-mediated PCR, and other conventional assays; or by DNA sequence similarity analysis using known cis-element motifs or enhancer elements as a target sequence or target motif with conventional DNA sequence comparison methods, such as BLAST. The fine structure of an enhancer domain can be further studied by mutagenesis (or substitution) of one or more nucleotides or by other conventional methods. Enhancer elements can be obtained by chemical synthesis or by isolation from regulatory elements that include such elements, and they can be synthesized with additional flanking nucleotides that contain useful restriction enzyme sites to facilitate subsequence manipulation. Thus, the design, construction, and use of enhancer elements according to the methods disclosed herein for modulating the expression of operably linked transcribable polynucleotide molecules are encompassed by the present invention.

[0046] In plants, the inclusion of some introns in gene constructs leads to increased mRNA and protein accumulation relative to constructs lacking the intron.

[0047] This effect has been termed “intron mediated enhancement” (IME) of gene expression (Mascarenhas *et al.*, (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913-920). Introns known to stimulate expression in plants have been identified in maize genes (*e.g.* *tubA1*, *Adh1*, *Sh1*, *Ubi1* (Jeon *et al.* (2000) *Plant Physiol.* 123:1005-1014; Callis *et al.* (1987) *Genes Dev.* 1:1183-1200; Vasil *et al.* (1989) *Plant Physiol.* 91:1575-1579; Christiansen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689) and in rice genes (*e.g.* *salt*, *tpi*; McElroy *et al.*, *Plant Cell* 2:163-171 (1990); Xu *et al.*, *Plant Physiol.* 106:459-467 (1994)). Similarly, introns from dicotyledonous plant genes like those from petunia (*e.g.* *rbcS*), potato (*e.g.* *st-ls1*) and from *Arabidopsis thaliana* (*e.g.* *ubq3* and *pat1*) have been found to elevate gene expression rates (Dean *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:201-208; Leon *et al.* (1991) *Plant Physiol.* 95:968-972; Norris *et al.* (1993) *Plant Mol Biol* 21:895-906; Rose and Last (1997) *Plant J.* 11:455-464). It has been shown that deletions or mutations within the splice sites of an intron reduce gene expression, indicating that splicing might be needed for IME (Mascarenhas *et al.* (1990) *Plant Mol Biol.* 15:913-920; Clancy and Hannah (2002) *Plant Physiol.* 130:918-929). However, that splicing per se is not required for a certain IME in dicotyledonous plants has been shown by point mutations within the splice sites of the *pat1* gene from *A. thaliana* (Rose and Beliakoff (2000) *Plant Physiol.* 122:535-542).

[0048] Enhancement of gene expression by introns is not a general phenomenon because some intron insertions into recombinant expression cassettes fail to enhance expression (*e.g.* introns

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

from dicot genes (*rbcS* gene from pea, phaseolin gene from bean and the *stls-1* gene from *Solanum tuberosum*) and introns from maize genes (*adh1* gene the ninth intron, *hsp81* gene the first intron)) (Chee *et al.* (1986) *Gene* 41:47-57; Kuhlemeier *et al.* (1988) *Mol Gen Genet* 212:405-411; Mascarenhas *et al.* (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913-920; Sinibaldi and Mettler (1992) In WE Cohn, K Moldave, eds, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 42. Academic Press, New York, pp 229-257; Vancanneyt *et al.* 1990 *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250). Therefore, not each intron can be employed in order to manipulate the gene expression level of non-endogenous genes or endogenous genes in transgenic plants. What characteristics or specific sequence features must be present in an intron sequence in order to enhance the expression rate of a given gene is not known in the prior art and therefore from the prior art it is not possible to predict whether a given plant intron, when used heterologously, will cause enhancement of expression at the DNA level or at the transcript level (IME).

[0049] As used herein, the term “chimeric” refers to a single DNA molecule produced by fusing a first DNA molecule to a second DNA molecule, where neither first nor second DNA molecule would normally be found in that configuration, *i.e.* fused to the other. The chimeric DNA molecule is thus a new DNA molecule not otherwise normally found in nature. As used herein, the term “chimeric promoter” refers to a promoter produced through such manipulation of DNA molecules. A chimeric promoter may combine two or more DNA fragments; an example would be the fusion of a promoter to an enhancer element. Thus, the design, construction, and use of chimeric promoters according to the methods disclosed herein for modulating the expression of operably linked transcribable polynucleotide molecules are encompassed by the present invention.

[0050] As used herein, the term “variant” refers to a second DNA molecule that is in composition similar, but not identical to, a first DNA molecule and yet the second DNA molecule still maintains the general functionality, *i.e.* same or similar expression pattern, of the first DNA molecule. A variant may be a shorter or truncated version of the first DNA molecule and/or an altered version of the sequence of the first DNA molecule, such as one with different restriction enzyme sites and/or internal deletions, substitutions, and/or insertions. A “variant” can also encompass a regulatory element having a nucleotide sequence comprising a substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides of a reference sequence, wherein the derivative regulatory element has more or less or equivalent transcriptional or translational

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

activity than the corresponding parent regulatory molecule. The regulatory element “variants” will also encompass variants arising from mutations that naturally occur in bacterial and plant cell transformation. In the present invention, a polynucleotide sequence provided as SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183 may be used to create variants that are in composition similar, but not identical to, the polynucleotide sequence of the original regulatory element, while still maintaining the general functionality, *i.e.* same or similar expression pattern, of the original regulatory element. Production of such variants of the present invention is well within the ordinary skill of the art in light of the disclosure and is encompassed within the scope of the present invention. Chimeric regulatory element “variants” comprise the same constituent elements as a reference sequence but the constituent elements comprising the chimeric regulatory element may be operatively linked by various methods known in the art such as, restriction enzyme digestion and ligation, ligation independent cloning, modular assembly of PCR products during amplification, or direct chemical synthesis of the regulatory element as well as other methods known in the art. The resulting chimeric regulatory element “variant” can be comprised of the same, or variants of the same, constituent elements of the reference sequence but differ in the sequence or sequences that comprise the linking sequence or sequences which allow the constituent parts to be operatively linked. In the present invention, a polynucleotide sequence provided as SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183 provide a reference sequence wherein the constituent elements that comprise the reference sequence may be joined by methods known in the art and may comprise substitutions, deletions and/or insertions of one or more nucleotides or mutations that naturally occur in bacterial and plant cell transformation.

**Constructs**

[0051] As used herein, the term “construct” means any recombinant polynucleotide molecule such as a plasmid, cosmid, virus, autonomously replicating polynucleotide molecule, phage, or linear or circular single-stranded or double-stranded DNA or RNA polynucleotide molecule, derived from any source, capable of genomic integration or autonomous replication, comprising a polynucleotide molecule where one or more polynucleotide molecule has been linked in a functionally operative manner, *i.e.* operably linked. As used herein, the term “vector” means any recombinant polynucleotide construct that may be used for the purpose of transformation, *i.e.* the introduction of heterologous DNA into a host cell. The term includes an expression cassette isolated from any of the aforementioned molecules.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0052] As used herein, the term “operably linked” refers to a first molecule joined to a second molecule, wherein the molecules are so arranged that the first molecule affects the function of the second molecule. The two molecules may or may not be part of a single contiguous molecule and may or may not be adjacent. For example, a promoter is operably linked to a transcribable polynucleotide molecule if the promoter modulates transcription of the transcribable polynucleotide molecule of interest in a cell. A leader, for example, is operably linked to coding sequence when it is capable of serving as a leader for the polypeptide encoded by the coding sequence.

[0053] The constructs of the present invention may be provided, in one embodiment, as double Ti plasmid border DNA constructs that have the right border (RB or AGRtu.RB) and left border (LB or AGRtu.LB) regions of the Ti plasmid isolated from *Agrobacterium tumefaciens* comprising a T-DNA, that along with transfer molecules provided by the *A. tumefaciens* cells, permit the integration of the T-DNA into the genome of a plant cell (*see*, for example, US Patent 6,603,061). The constructs may also contain the plasmid backbone DNA segments that provide replication function and antibiotic selection in bacterial cells, for example, an *Escherichia coli* origin of replication such as *ori322*, a broad host range origin of replication such as *oriV* or *oriRi*, and a coding region for a selectable marker such as Spec/Strp that encodes for Tn7 aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA*) conferring resistance to spectinomycin or streptomycin, or a gentamicin (Gm, Gent) selectable marker gene. For plant transformation, the host bacterial strain is often *A. tumefaciens* ABI, C58, or LBA4404; however, other strains known to those skilled in the art of plant transformation can function in the present invention.

[0054] Methods are known in the art for assembling and introducing constructs into a cell in such a manner that the transcribable polynucleotide molecule is transcribed into a functional mRNA molecule that is translated and expressed as a protein product. For the practice of the present invention, conventional compositions and methods for preparing and using constructs and host cells are well known to one skilled in the art, *see*, for example, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition Volumes 1, 2, and 3 (2000) J. Sambrook, D.W. Russell, and N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Methods for making recombinant vectors particularly suited to plant transformation include, without limitation, those described in U.S. Patent No. 4,971,908; 4,940,835; 4,769,061; and 4,757,011 in their entirety. These types of vectors have also been reviewed in the scientific literature (*see*, for example, Rodriguez, *et al.*,

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

*Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston, (1988) and Glick, *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL. (1993)). Typical vectors useful for expression of nucleic acids in higher plants are well known in the art and include vectors derived from the tumor-inducing (Ti) plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* (Rogers, *et al.*, *Methods in Enzymology* 153: 253-277 (1987)). Other recombinant vectors useful for plant transformation, including the pCaMVCN transfer control vector, have also been described in the scientific literature (*see*, for example, Fromm, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828 (1985)).

[0055] Various regulatory elements may be included in a construct including any of those provided herein. Any such regulatory elements may be provided in combination with other regulatory elements. Such combinations can be designed or modified to produce desirable regulatory features. In one embodiment, constructs of the present invention comprise at least one regulatory element operably linked to a transcribable polynucleotide molecule operably linked to a 3' UTR.

[0056] Constructs of the present invention may include any promoter or leader provided herein or known in the art. For example, a promoter of the present invention may be operably linked to a heterologous non-translated 5' leader such as one derived from a heat shock protein gene (*see*, for example, U.S. Patent No. 5,659,122 and 5,362,865). Alternatively, a leader of the present invention may be operably linked to a heterologous promoter such as the Cauliflower Mosaic Virus 35S transcript promoter (*see*, U.S. Patent No. 5,352,605).

[0057] As used herein, the term "intron" refers to a DNA molecule that may be isolated or identified from the genomic copy of a gene and may be defined generally as a region spliced out during mRNA processing prior to translation. Alternately, an intron may be a synthetically produced or manipulated DNA element. An intron may contain enhancer elements that effect the transcription of operably linked genes. An intron may be used as a regulatory element for modulating expression of an operably linked transcribable polynucleotide molecule. A DNA construct may comprise an intron, and the intron may or may not be heterologous with respect to the transcribable polynucleotide molecule sequence. Examples of introns in the art include the rice actin intron (U.S. Patent No. 5,641,876) and the corn HSP70 intron (U.S. Patent No. 5,859,347). Introns useful in practicing the present invention include SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122,

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182. Further, when modifying intron/exon boundary sequences, it may be preferable to avoid using the nucleotide sequence AT or the nucleotide A just prior to the 5' end of the splice site (GT) and the nucleotide G or the nucleotide sequence TG, respectively just after 3' end of the splice site (AG) to eliminate the potential of unwanted start codons from being formed during processing of the messenger RNA into the final transcript. The sequence around the 5' or 3' end splice junction sites of the intron can thus be modified in this manner.

[0058] As used herein, the term "3' transcription termination molecule" or "3' UTR" refers to a DNA molecule that is used during transcription to produce the 3' untranslated region (3' UTR) of an mRNA molecule. The 3' untranslated region of an mRNA molecule may be generated by specific cleavage and 3' polyadenylation, a.k.a. polyA tail. A 3' UTR may be operably linked to and located downstream of a transcribable polynucleotide molecule and may include polynucleotides that provide a polyadenylation signal and other regulatory signals capable of affecting transcription, mRNA processing, or gene expression. PolyA tails are thought to function in mRNA stability and in initiation of translation. Examples of 3' transcription termination molecules in the art are the nopaline synthase 3' region (*see*, Fraley, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803-4807 (1983)); wheat hsp17 3' region; pea rubisco small subunit 3' region; cotton E6 3' region (U.S. Patent 6,096,950); 3' regions disclosed in WO0011200A2; and the coixin 3' UTR (U.S. Patent No. 6,635,806).

[0059] 3' UTRs typically find beneficial use for the recombinant expression of specific genes. In animal systems, a machinery of 3' UTRs has been well defined (*e.g.* Zhao *et al.*, *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405-445 (1999); Proudfoot, *Nature* 322:562-565 (1986); Kim *et al.*, *Biotechnology Progress* 19:1620-1622 (2003); Yonaha and Proudfoot, *EMBO J.* 19:3770-3777 (2000); Cramer *et al.*, *FEBS Letters* 498:179-182 (2001); Kuerstem and Goodwin, *Nature Reviews Genetics* 4:626-637 (2003)). Effective termination of RNA transcription is required to prevent unwanted transcription of trait- unrelated (downstream) sequences, which may interfere with trait performance. Arrangement of multiple gene expression cassettes in local proximity to one another (*e.g.* within one T- DNA) may cause suppression of gene expression of one or more genes in said construct in comparison to independent insertions (Padidam and Cao, *BioTechniques* 31:328-334 (2001)). This may interfere with achieving adequate levels of expression, for instance in cases where strong gene expression from all cassettes is desired.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0060] In plants, clearly defined polyadenylation signal sequences are not known. Hasegawa *et al.*, *Plant J.* 33:1063-1072, (2003)) were not able to identify conserved polyadenylation signal sequences in both *in vitro* and *in vivo* systems in *Nicotiana sylvestris* and to determine the actual length of the primary (non-polyadenylated) transcript. A weak 3' UTR has the potential to generate read-through, which may affect the expression of the genes located in the neighboring expression cassettes (Padidam and Cao, *BioTechniques* 31:328-334 (2001)). Appropriate control of transcription termination can prevent read-through into sequences (*e.g.* other expression cassettes) localized downstream and can further allow efficient recycling of RNA polymerase, to improve gene expression. Efficient termination of transcription (release of RNA Polymerase II from the DNA) is pre-requisite for re-initiation of transcription and thereby directly affects the overall transcript level. Subsequent to transcription termination, the mature mRNA is released from the site of synthesis and template to the cytoplasm. Eukaryotic mRNAs are accumulated as poly(A) forms *in vivo*, so that it is difficult to detect transcriptional termination sites by conventional methods. However, prediction of functional and efficient 3' UTRs by bioinformatics methods is difficult in that there are no conserved sequences which would allow easy prediction of an effective 3' UTR.

[0061] From a practical standpoint, it is typically beneficial that a 3' UTR used in a transgene cassette possesses the following characteristics. The 3' UTR should be able to efficiently and effectively terminate transcription of the transgene and prevent read-through of the transcript into any neighboring DNA sequence which can be comprised of another transgene cassette as in the case of multiple cassettes residing in one T-DNA, or the neighboring chromosomal DNA into which the T-DNA has inserted. The 3' UTR should not cause a reduction in the transcriptional activity imparted by the promoter, leader and introns that are used to drive expression of the transgene. In plant biotechnology, the 3' UTR is often used for priming of amplification reactions of reverse transcribed RNA extracted from the transformed plant and used to (1) assess the transcriptional activity or expression of the transgene cassette once integrated into the plant chromosome; (2) assess the copy number of insertions within the plant DNA; and (3) assess zygosity of the resulting seed after breeding. The 3' UTR is also used in amplification reactions of DNA extracted from the transformed plant to characterize the intactness of the inserted cassette.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0062] 3' UTRs useful in providing expression of a transgene in plants may be identified based upon the expression of expressed sequence tags (ESTs) in cDNA libraries made from messenger RNA isolated from seed, flower and other tissues derived from Big bluestem (*Andropogon gerardii*), Plume grass (*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)), Green bristlegrass (*Setaria viridis*), Teosinte (*Zea mays subsp. mexicana*), Foxtail millet (*Setaria italica*), or Coix (*Coix lacryma-jobi*). Libraries of cDNA are made from tissues isolated from selected plant species using methods known to those skilled in the art from flower tissue, seed, leaf and root. The resulting cDNAs are sequenced using various sequencing methods known in the art. The resulting ESTs are assembled into clusters using bioinformatics software such as *clc\_ref\_assemble\_complete* version 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Transcript abundance of each cluster is determined by counting the number of cDNA reads for each cluster. The identified 3' UTRs may be comprised of sequence derived from cDNA sequence as well as sequence derived from genomic DNA. The cDNA sequence is used to design primers, which are then used with GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) libraries constructed following the manufacturer's protocol to clone the 3' region of the corresponding genomic DNA sequence to provide a longer termination sequence. Analysis of relative transcript abundance either by direct counts or normalized counts of observed sequence reads for each tissue library can be used to infer properties about patterns of expression. For example, some 3' UTRs may be found in transcripts seen in higher abundance in root tissue as opposed to leaf. This is suggestive that the transcript is highly expressed in root and that the properties of root expression may be attributable to the transcriptional regulation of the promoter, the lead, the introns or the 3' UTR. Empirical testing of 3' UTRs identified by the properties of expression within specific organs, tissues or cell types can result in the identification of 3' UTRs that enhance expression in those specific organs, tissues or cell types.

[0063] Constructs and vectors may also include a transit peptide coding sequence that expresses a linked peptide that is useful for targeting of a protein product, particularly to a chloroplast, leucoplast, or other plastid organelle; mitochondria; peroxisome; vacuole; or an extracellular location. For descriptions of the use of chloroplast transit peptides, see U.S. Patent No. 5,188,642 and U.S. Patent No. 5,728,925. Many chloroplast-localized proteins are expressed from nuclear genes as precursors and are targeted to the chloroplast by a chloroplast transit peptide (CTP). Examples of such isolated chloroplast proteins include, but are not limited to,

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

those associated with the small subunit (SSU) of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, ferredoxin, ferredoxin oxidoreductase, the light-harvesting complex protein I and protein II, thioredoxin F, enolpyruvyl shikimate phosphate synthase (EPSPS), and transit peptides described in U.S. Patent No. 7,193,133. It has been demonstrated *in vivo* and *in vitro* that non-chloroplast proteins may be targeted to the chloroplast by use of protein fusions with a heterologous CTP and that the CTP is sufficient to target a protein to the chloroplast. Incorporation of a suitable chloroplast transit peptide such as the *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (*See*, Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442 (1987)) or the *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (*See*, della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877 (1986)) has been shown to target heterologous EPSPS protein sequences to chloroplasts in transgenic plants (*See*, U.S. Patent Nos. 5,627,061; 5,633,435; and 5,312,910 and EP 0218571; EP 189707; EP 508909; and EP 924299).

**Transcribable polynucleotide molecules**

[0064] As used herein, the term “transcribable polynucleotide molecule” refers to any DNA molecule capable of being transcribed into a RNA molecule, including, but not limited to, those having protein coding sequences and those producing RNA molecules having sequences useful for gene suppression. A “transgene” refers to a transcribable polynucleotide molecule heterologous to a host cell at least with respect to its location in the genome and/or a transcribable polynucleotide molecule artificially incorporated into a host cell’s genome in the current or any prior generation of the cell.

[0065] A promoter of the present invention may be operably linked to a transcribable polynucleotide molecule that is heterologous with respect to the promoter molecule. As used herein, the term “heterologous” refers to the combination of two or more polynucleotide molecules when such a combination is not normally found in nature. For example, the two molecules may be derived from different species and/or the two molecules may be derived from different genes, *e.g.* different genes from the same species or the same genes from different species. A promoter is thus heterologous with respect to an operably linked transcribable polynucleotide molecule if such a combination is not normally found in nature, *i.e.* that transcribable polynucleotide molecule is not naturally occurring operably linked in combination with that promoter molecule.

[0066] The transcribable polynucleotide molecule may generally be any DNA molecule for which expression of a RNA transcript is desired. Such expression of an RNA transcript may

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

result in translation of the resulting mRNA molecule and thus protein expression. Alternatively, for example, a transcribable polynucleotide molecule may be designed to ultimately cause decreased expression of a specific gene or protein. In one embodiment, this may be accomplished by using a transcribable polynucleotide molecule that is oriented in the antisense direction. One of ordinary skill in the art is familiar with using such antisense technology. Briefly, as the antisense transcribable polynucleotide molecule is transcribed, the RNA product hybridizes to and sequesters a complementary RNA molecule inside the cell. This duplex RNA molecule cannot be translated into a protein by the cell's translational machinery and is degraded in the cell. Any gene may be negatively regulated in this manner.

[0067] Thus, one embodiment of the invention is a regulatory element of the present invention, such as those provided as SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183, operably linked to a transcribable polynucleotide molecule so as to modulate transcription of the transcribable polynucleotide molecule at a desired level or in a desired pattern when the construct is integrated in the genome of a plant cell. In one embodiment, the transcribable polynucleotide molecule comprises a protein-coding region of a gene, and the promoter affects the transcription of an RNA molecule that is translated and expressed as a protein product. In another embodiment, the transcribable polynucleotide molecule comprises an antisense region of a gene, and the promoter affects the transcription of an antisense RNA molecule, double stranded RNA or other similar inhibitory RNA molecule in order to inhibit expression of a specific RNA molecule of interest in a target host cell.

#### **Genes of Agronomic Interest**

[0068] Transcribable polynucleotide molecules may be genes of agronomic interest. As used herein, the term "gene of agronomic interest" refers to a transcribable polynucleotide molecule that when expressed in a particular plant tissue, cell, or cell type confers a desirable characteristic, such as associated with plant morphology, physiology, growth, development, yield, product, nutritional profile, disease or pest resistance, and/or environmental or chemical tolerance. Genes of agronomic interest include, but are not limited to, those encoding a yield protein, a stress resistance protein, a developmental control protein, a tissue differentiation protein, a meristem protein, an environmentally responsive protein, a senescence protein, a hormone responsive protein, an abscission protein, a source protein, a sink protein, a flower control protein, a seed protein, an herbicide resistance protein, a disease resistance protein, a

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

fatty acid biosynthetic enzyme, a tocopherol biosynthetic enzyme, an amino acid biosynthetic enzyme, a pesticidal protein, or any other agent such as an antisense or RNAi molecule targeting a particular gene for suppression. The product of a gene of agronomic interest may act within the plant in order to cause an effect upon the plant physiology or metabolism or may be act as a pesticidal agent in the diet of a pest that feeds on the plant.

[0069] In one embodiment of the invention, a promoter of the present invention is incorporated into a construct such that the promoter is operably linked to a transcribable polynucleotide molecule that is a gene of agronomic interest. The expression of the gene of agronomic interest is desirable in order to confer an agronomically beneficial trait. A beneficial agronomic trait may be, for example, but is not limited to, herbicide tolerance, insect control, modified yield, fungal disease resistance, virus resistance, nematode resistance, bacterial disease resistance, plant growth and development, starch production, modified oils production, high oil production, modified fatty acid content, high protein production, fruit ripening, enhanced animal and human nutrition, biopolymers, environmental stress resistance, pharmaceutical peptides and secretable peptides, improved processing traits, improved digestibility, enzyme production, flavor, nitrogen fixation, hybrid seed production, fiber production, and biofuel production. Examples of genes of agronomic interest known in the art include those for herbicide resistance (U.S. Patent No. 6,803,501; 6,448,476; 6,248,876; 6,225,114; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 5,633,435; and 5,463,175), increased yield (U.S. Patent Nos. USRE38,446; 6,716,474; 6,663,906; 6,476,295; 6,441,277; 6,423,828; 6,399,330; 6,372,211; 6,235,971; 6,222,098; and 5,716,837), insect control (U.S. Patent Nos. 6,809,078; 6,713,063; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,537,756; 6,521,442; 6,501,009; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,177,615; 6,156,573; 6,153,814; 6,110,464; 6,093,695; 6,063,756; 6,063,597; 6,023,013; 5,959,091; 5,942,664; 5,942,658; 5,880,275; 5,763,245; and 5,763,241), fungal disease resistance (U.S. Patent Nos. 6,653,280; 6,573,361; 6,506,962; 6,316,407; 6,215,048; 5,516,671; 5,773,696; 6,121,436; 6,316,407; and 6,506,962), virus resistance (U.S. Patent Nos. 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023; and 5,304,730), nematode resistance (U.S. Patent No. 6,228,992), bacterial disease resistance (U.S. Patent No. 5,516,671), plant growth and development (U.S. Patent Nos. 6,723,897 and 6,518,488), starch production (U.S. Patent Nos. 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876; 6,476,295), modified oils production (U.S. Patent

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

Nos. 6,444,876; 6,426,447; and 6,380,462), high oil production (U.S. Patent Nos. 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008; and 6,476,295), modified fatty acid content (U.S. Patent Nos. 6,828,475; 6,822,141; 6,770,465; 6,706,950; 6,660,849; 6,596,538; 6,589,767; 6,537,750; 6,489,461; and 6,459,018), high protein production (U.S. Patent No. 6,380,466), fruit ripening (U.S. Patent No. 5,512,466), enhanced animal and human nutrition (U.S. Patent Nos. 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; and 6,171,640), biopolymers (U.S. Patent Nos. USRE37,543; 6,228,623; and 5,958,745, and 6,946,588), environmental stress resistance (U.S. Patent No. 6,072,103), pharmaceutical peptides and secretable peptides (U.S. Patent Nos. 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075; and 6,080,560), improved processing traits (U.S. Patent No. 6,476,295), improved digestibility (U.S. Patent No. 6,531,648) low raffinose (U.S. Patent No. 6,166,292), industrial enzyme production (U.S. Patent No. 5,543,576), improved flavor (U.S. Patent No. 6,011,199), nitrogen fixation (U.S. Patent No. 5,229,114), hybrid seed production (U.S. Patent No. 5,689,041), fiber production (U.S. Patent Nos. 6,576,818; 6,271,443; 5,981,834; and 5,869,720) and biofuel production (U.S. Patent No. 5,998,700).

[0070] Alternatively, a gene of agronomic interest can affect the above mentioned plant characteristic or phenotype by encoding a RNA molecule that causes the targeted modulation of gene expression of an endogenous gene, for example via antisense (see *e.g.* US Patent 5,107,065); inhibitory RNA ("RNAi", including modulation of gene expression via miRNA-, siRNA-, trans-acting siRNA-, and phased sRNA-mediated mechanisms, *e.g.* as described in published applications US 2006/0200878 and US 2008/0066206, and in US patent application 11/974,469); or cosuppression-mediated mechanisms. The RNA could also be a catalytic RNA molecule (*e.g.* a ribozyme or a riboswitch; see *e.g.* US 2006/0200878) engineered to cleave a desired endogenous mRNA product. Thus, any transcribable polynucleotide molecule that encodes a transcribed RNA molecule that affects an agronomically important phenotype or morphology change of interest may be useful for the practice of the present invention. Methods are known in the art for constructing and introducing constructs into a cell in such a manner that the transcribable polynucleotide molecule is transcribed into a molecule that is capable of causing gene suppression. For example, posttranscriptional gene suppression using a construct with an anti-sense oriented transcribable polynucleotide molecule to regulate gene expression in plant cells is disclosed in U.S. Patent Nos. 5,107,065 and 5,759,829, and posttranscriptional gene suppression using a construct with a sense-oriented transcribable polynucleotide molecule to

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

regulate gene expression in plants is disclosed in U.S. Patent Nos. 5,283,184 and 5,231,020. Expression of a transcribable polynucleotide in a plant cell can also be used to suppress plant pests feeding on the plant cell, for example, compositions isolated from coleopteran pests (U.S. Patent Publication No. US20070124836) and compositions isolated from nematode pests (U.S. Patent Publication No. US20070250947). Plant pests include, but are not limited to arthropod pests, nematode pests, and fungal or microbial pests. Exemplary transcribable polynucleotide molecules for incorporation into constructs of the present invention include, for example, DNA molecules or genes from a species other than the target species or genes that originate with or are present in the same species, but are incorporated into recipient cells by genetic engineering methods rather than classical reproduction or breeding techniques. The type of polynucleotide molecule can include, but is not limited to, a polynucleotide molecule that is already present in the plant cell, a polynucleotide molecule from another plant, a polynucleotide molecule from a different organism, or a polynucleotide molecule generated externally, such as a polynucleotide molecule containing an antisense message of a gene, or a polynucleotide molecule encoding an artificial, synthetic, or otherwise modified version of a transgene.

#### Selectable Markers

[0071] As used herein the term “marker” refers to any transcribable polynucleotide molecule whose expression, or lack thereof, can be screened for or scored in some way. Marker genes for use in the practice of the present invention include, but are not limited to transcribable polynucleotide molecules encoding  $\beta$ -glucuronidase (GUS described in U.S. Patent No. 5,599,670), green fluorescent protein and variants thereof (GFP described in U.S. Patent No. 5,491,084 and 6,146,826), proteins that confer antibiotic resistance, or proteins that confer herbicide tolerance. Useful antibiotic resistance markers, including those encoding proteins conferring resistance to kanamycin (*nptII*), hygromycin B (*aph IV*), streptomycin or spectinomycin (*aad*, *spec/strep*) and gentamycin (*aac3* and *aacC4*) are known in the art. Herbicides for which transgenic plant tolerance has been demonstrated and the method of the present invention can be applied, include, but are not limited to: amino-methyl-phosphonic acid, glyphosate, glufosinate, sulfonylureas, imidazolinones, bromoxynil, dalapon, dicamba, cyclohexanedione, protoporphyrinogen oxidase inhibitors, and isoxasflutole herbicides. Transcribable polynucleotide molecules encoding proteins involved in herbicide tolerance are known in the art, and include, but are not limited to, a transcribable polynucleotide molecule

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS for glyphosate tolerance described in U.S. Patent No. 5,627,061; 5,633,435; 6,040,497; and 5,094,945); a transcribable polynucleotide molecule encoding a glyphosate oxidoreductase and a glyphosate-N-acetyl transferase (GOX described in U.S. Patent No. 5,463,175; GAT described in U.S. Patent publication No. 20030083480, and dicamba monooxygenase U.S. Patent publication No. 20030135879); a transcribable polynucleotide molecule encoding bromoxynil nitrilase (*Bxn* for Bromoxynil tolerance described in U.S. Patent No. 4,810,648); a transcribable polynucleotide molecule encoding phytoene desaturase (*crtI*) described in Misawa, *et al.*, *Plant Journal* 4:833-840 (1993) and Misawa, *et al.*, *Plant Journal* 6:481-489 (1994) for norflurazon tolerance; a transcribable polynucleotide molecule encoding acetohydroxyacid synthase (AHAS, *aka* ALS) described in Sathasiivan, *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18:2188-2193 (1990) for tolerance to sulfonylurea herbicides; and the *bar* gene described in DeBlock, *et al.*, *EMBO Journal* 6:2513-2519 (1987) for glufosinate and bialaphos tolerance. The promoter molecules of the present invention can express linked transcribable polynucleotide molecules that encode for phosphinothricin acetyltransferase, glyphosate resistant EPSPS, aminoglycoside phosphotransferase, hydroxyphenyl pyruvate dehydrogenase, hygromycin phosphotransferase, neomycin phosphotransferase, dalapon dehalogenase, bromoxynil resistant nitrilase, anthranilate synthase, aryloxyalkanoate dioxygenases, acetyl CoA carboxylase, glyphosate oxidoreductase, and glyphosate-N-acetyl transferase.

[0072] Included within the term "selectable markers" are also genes which encode a secretable marker whose secretion can be detected as a means of identifying or selecting for transformed cells. Examples include markers that encode a secretable antigen that can be identified by antibody interaction, or even secretable enzymes which can be detected catalytically. Selectable secreted marker proteins fall into a number of classes, including small, diffusible proteins which are detectable, (*e.g.* by ELISA), small active enzymes which are detectable in extracellular solution (*e.g.* alpha-amylase, beta-lactamase, phosphinothricin transferase), or proteins which are inserted or trapped in the cell wall (such as proteins which include a leader sequence such as that found in the expression unit of extension or tobacco pathogenesis related proteins also known as tobacco PR-S). Other possible selectable marker genes will be apparent to those of skill in the art and are encompassed by the present invention.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Cell Transformation**

[0073] The invention is also directed to a method of producing transformed cells and plants which comprise a promoter operably linked to a transcribable polynucleotide molecule.

[0074] The term “transformation” refers to the introduction of nucleic acid into a recipient host. As used herein, the term “host” refers to bacteria, fungi, or plant, including any cells, tissue, organs, or progeny of the bacteria, fungi, or plant. Plant tissues and cells of particular interest include protoplasts, calli, roots, tubers, seeds, stems, leaves, seedlings, embryos, and pollen.

[0075] As used herein, the term “transformed” refers to a cell, tissue, organ, or organism into which a foreign polynucleotide molecule, such as a construct, has been introduced. The introduced polynucleotide molecule may be integrated into the genomic DNA of the recipient cell, tissue, organ, or organism such that the introduced polynucleotide molecule is inherited by subsequent progeny. A “transgenic” or “transformed” cell or organism also includes progeny of the cell or organism and progeny produced from a breeding program employing such a transgenic organism as a parent in a cross and exhibiting an altered phenotype resulting from the presence of a foreign polynucleotide molecule. The term “transgenic” refers to a bacteria, fungi, or plant containing one or more heterologous polynucleic acid molecules.

[0076] There are many methods for introducing polynucleic acid molecules into plant cells. The method generally comprises the steps of selecting a suitable host cell, transforming the host cell with a recombinant vector, and obtaining the transformed host cell. Suitable methods include bacterial infection (*e.g. Agrobacterium*), binary bacterial artificial chromosome vectors, direct delivery of DNA (*e.g. via PEG-mediated transformation, desiccation/inhibition-mediated DNA uptake, electroporation, agitation with silicon carbide fibers, and acceleration of DNA coated particles, etc.* (reviewed in Potrykus, *et al.*, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205 (1991)).

[0077] Technology for introduction of a DNA molecule into cells is well known to those of skill in the art. Methods and materials for transforming plant cells by introducing a plant DNA construct into a plant genome in the practice of this invention can include any of the well-known and demonstrated methods. Any transformation methods may be utilized to transform a host cell with one or more promoters and/or constructs of the present. Host cells may be any cell or organism such as a plant cell, algae cell, algae, fungal cell, fungi, bacterial cell, or insect cell.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

Preferred hosts and transformed cells include cells from: plants, *Aspergillus*, yeasts, insects, bacteria and algae.

[0078] Regenerated transgenic plants can be self-pollinated to provide homozygous transgenic plants. Alternatively, pollen obtained from the regenerated transgenic plants may be crossed with non-transgenic plants, preferably inbred lines of agronomically important species. Descriptions of breeding methods that are commonly used for different traits and crops can be found in one of several reference books, *see*, for example, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of crop improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Snee and Hendriksen, *Plant breeding perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2nd Edition, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of variety development, Theory and Technique*, (Vol. 1) and *Crop Species Soybean* (Vol 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987). Conversely, pollen from non-transgenic plants may be used to pollinate the regenerated transgenic plants.

[0079] The transformed plants may be analyzed for the presence of the genes of interest and the expression level and/or profile conferred by the regulatory elements of the present invention. Those of skill in the art are aware of the numerous methods available for the analysis of transformed plants. For example, methods for plant analysis include, but are not limited to Southern blots or northern blots, PCR-based approaches, biochemical analyses, phenotypic screening methods, field evaluations, and immunodiagnostic assays. The expression of a transcribable polynucleotide molecule can be measured using TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) reagents and methods as described by the manufacturer and PCR cycle times determined using the TaqMan® Testing Matrix. Alternatively, the Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) reagents and methods as described by the manufacturer can be used to measure transgene expression.

[0080] The seeds of the plants of this invention can be harvested from fertile transgenic plants and be used to grow progeny generations of transformed plants of this invention including hybrid plant lines comprising the construct of this invention and expressing a gene of agronomic interest.

[0081] The present invention also provides for parts of the plants of the present invention. Plant parts, without limitation, include leaves, stems, roots, tubers, seeds, endosperm, ovule, and

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

pollen. The invention also includes and provides transformed plant cells which comprise a nucleic acid molecule of the present invention.

[0082] The transgenic plant may pass along the transgenic polynucleotide molecule to its progeny. Progeny includes any regenerable plant part or seed comprising the transgene derived from an ancestor plant. The transgenic plant is preferably homozygous for the transformed polynucleotide molecule and transmits that sequence to all offspring as a result of sexual reproduction. Progeny may be grown from seeds produced by the transgenic plant. These additional plants may then be self-pollinated to generate a true breeding line of plants. The progeny from these plants are evaluated, among other things, for gene expression. The gene expression may be detected by several common methods such as western blotting, northern blotting, immuno-precipitation, and ELISA.

#### **Commodity Products**

[0083] The present invention provides a commodity product comprising DNA molecules according to the invention. As used herein, a "commodity product" refers to any composition or product which is comprised of material derived from a plant, seed, plant cell or plant part comprising a DNA molecule of the invention. Commodity products may be sold to consumers and may be viable or nonviable. Nonviable commodity products include but are not limited to nonviable seeds and grains; processed seeds, seed parts, and plant parts; dehydrated plant tissue, frozen plant tissue, and processed plant tissue; seeds and plant parts processed for animal feed for terrestrial and/or aquatic animals consumption, oil, meal, flour, flakes, bran, fiber, milk, cheese, paper, cream, wine, and any other food for human consumption; and biomasses and fuel products. Viable commodity products include but are not limited to seeds and plant cells. Plants comprising a DNA molecule according to the invention can thus be used to manufacture any commodity product typically acquired from plants or parts thereof.

[0084] Having now generally described the invention, the same will be more readily understood through reference to the following examples which are provided by way of illustration, and are not intended to be limiting of the present invention, unless specified. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the following examples represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments that are disclosed and still obtain a like or

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

similar result without departing from the spirit and scope of the invention, therefore all matter set forth or shown in the accompanying drawings is to be interpreted as illustrative and not in a limiting sense.

## EXAMPLES

### Example 1: Identification and Cloning of Regulatory Elements.

[0085] Novel ubiquitin transcriptional regulatory elements, or transcriptional regulatory expression element group (EXP) sequences were identified and isolated from genomic DNA of the monocot species Big bluestem (*Andropogon gerardii*), Plume Grass (*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)), Green bristlegrass (*Setaria viridis*), Teosinte (*Zea mays subsp. mexicana*), Foxtail millet (*Setaria italica*), and Coix (*Coix lacryma-jobi*).

[0086] Ubiquitin 1 transcript sequences were identified from each of the above species. The 5' untranslated region (5' UTR) of each of the Ubiquitin 1 transcripts was used to design primers to amplify the corresponding transcriptional regulatory elements for the identified Ubiquitin gene, which comprises a promoter, leader (5' UTR) and first intron operably linked. The primers were used with GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) libraries constructed following the manufacturer's protocol to clone the 5' region of the corresponding genomic DNA sequence. Ubiquitin transcriptional regulatory elements were also isolated from the monocot *Sorghum bicolor* using public sequences that are homologs to the Ubiquitin 4, 6 and 7 genes of *Zea mays*.

[0087] Using the identified sequences, a bioinformatic analysis was conducted to identify regulatory elements within the amplified DNA. Using the results of this analysis, regulatory elements were defined within the DNA sequences and primers designed to amplify the regulatory elements. The corresponding DNA molecule for each regulatory element was amplified using standard polymerase chain reaction conditions with primers containing unique restriction enzyme sites and genomic DNA isolated from *A. gerardii*, *S. ravennae*, *S. viridis*, *Z. mays subsp. mexicana*, *S. italica*, *C. lacryma-jobi*, and *S. bicolor*. The resulting DNA fragments were ligated into base plant expression vectors and sequenced. An analysis of the regulatory element TSS and intron/exon splice junctions was then done using transformed plant protoplasts. Briefly, the protoplasts were transformed with the plant expression vectors comprising the

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

cloned DNA fragments operably linked to a heterologous transcribable polynucleotide molecule and the 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) was used to confirm the regulatory element TSS and intron/exon splice junctions by analyzing the sequence of the mRNA transcripts produced thereby.

[0088] Sequences of the identified transcriptional regulatory expression element groups ("EXP's") are provided herein as SEQ ID NOS: 1, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 49, 53, 55, 59, 63, 65, 69, 73, 75, 77, 79, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 128, 130, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 180, 181 and 183, as listed in Table 1 below. Promoter sequences are provided herein as SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 and 135. Leader sequences are provided herein as SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 and 81. Intron sequences are provided herein as SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182. An enhancer sequence is provided as SEQ ID NO: 89.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

Table 1. Transcriptional regulatory expression element groups ("EXP's"), promoters, enhancers, leaders and introns isolated from various grass species.

| Annotation            | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                      | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP |
|-----------------------|------------|-----------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| EXP-ANDge.Ubql-1:1:9  | 1          | 3741      | <i>A. gerardii</i>   | EXP: P-ANDge.Ubql-1:1:11 (SEQ ID NO:2); L-ANDge.Ubql-1:1:2 (SEQ ID NO:3); 1-ANDge.Ubql-1:1:13 (SEQ ID NO:4). |                                                   |
| P-ANDge.Ubql-1:1:11   | 2          | 2603      | <i>A. gerardii</i>   | promoter                                                                                                     |                                                   |
| L-ANDge.Ubql-1:1:2    | 3          | 99        | <i>A. gerardii</i>   | leader                                                                                                       |                                                   |
| L-ANDge.Ubql-1:1:3    | 4          | 1039      | <i>A. gerardii</i>   | intron                                                                                                       |                                                   |
| EXP-ANDge.Ubql-1:1:7  | 5          | 3255      | <i>A. gerardii</i>   | EXP: P-ANDge.Ubql-1:1:9 (SEQ ID NO:6); L-ANDge.Ubql-1:1:2 (SEQ ID NO:3); 1-ANDge.Ubql-1:1:4 (SEQ ID NO:7).   | pMON136264, PCR0145892, pMON140896, PCR41         |
| P-ANDge.Ubql-1:1:9    | 6          | 2114      | <i>A. gerardii</i>   | promoter                                                                                                     |                                                   |
| L-ANDge.Ubql-1:1:4    | 7          | 1042      | <i>A. gerardii</i>   | intron                                                                                                       |                                                   |
| EXP-ANDge.Ubql-1:1:8  | 8          | 2785      | <i>A. gerardii</i>   | EXP: P-ANDge.Ubql-1:1:10 (SEQ ID NO:9); L-ANDge.Ubql-1:1:2 (SEQ ID NO:3); 1-ANDge.Ubql-1:1:4 (SEQ ID NO:7).  | pMON140917, PCR42                                 |
| P-ANDge.Ubql-1:1:10   | 9          | 1644      | <i>A. gerardii</i>   | promoter                                                                                                     |                                                   |
| EXP-ANDge.Ubql-1:1:10 | 10         | 2613      | <i>A. gerardii</i>   | EXP: P-ANDge.Ubql-1:1:12 (SEQ ID NO:11); L-ANDge.Ubql-1:1:2 (SEQ ID NO:3); 1-ANDge.Ubql-1:1:4 (SEQ ID NO:7). | PCR0145815, PCR43                                 |
| P-ANDge.Ubql-1:1:12   | 11         | 1472      | <i>A. gerardii</i>   | promoter                                                                                                     |                                                   |
| EXP-ANDge.Ubql-1:1:6  | 12         | 2255      | <i>A. gerardii</i>   | EXP: P-ANDge.Ubql-1:1:8 (SEQ ID NO:13); L-ANDge.Ubql-1:1:2 (SEQ ID NO:3); 1-ANDge.Ubql-1:1:4 (SEQ ID NO:7).  | pMON136259, PCR0145893, pMON140898, PCR44         |
| P-ANDge.Ubql-1:1:8    | 13         | 1114      | <i>A. gerardii</i>   | promoter                                                                                                     |                                                   |
| EXP-ANDge.Ubql-1:1:11 | 14         | 1912      | <i>A. gerardii</i>   | EXP: P-ANDge.Ubql-1:1:13 (SEQ ID NO:15); L-ANDge.Ubql-1:1:2 (SEQ ID NO:3); 1-ANDge.Ubql-1:1:4 (SEQ ID NO:7). | PCR0145817, pMON140899, PCR45                     |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation            | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                        | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP                                |
|-----------------------|------------|-----------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| P-ANDge.Ubq1-1:1:13   | 15         | 771       | <i>A. gerardii</i>   | promoter                                                                                                       | PCR0145819,<br>pMON140900,<br>PCR46                                              |
| EXP-ANDge.Ubq1-1:1:12 | 16         | 1623      | <i>A. gerardii</i>   | EXP: P-ANDge.Ubq1-1:1:14 (SEQ ID NO:17); L-ANDge.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:3); L-ANDge.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO:7).   |                                                                                  |
| P-ANDge.Ubq1-1:1:14   | 17         | 482       | <i>A. gerardii</i>   | promoter                                                                                                       |                                                                                  |
| EXP-ERtra.Ubq1        | 18         | 3483      | <i>E. ravennae</i>   | EXP: P-ERtra.Ubq1-1:1:10 (SEQ ID NO:19); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:20); L-ERtra.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:21). | pMON136263,<br>PCR0145896,<br>pMON140904,<br>PCR50                               |
| P-ERtra.Ubq1-1:1:10   | 19         | 2536      | <i>E. ravennae</i>   | promoter                                                                                                       |                                                                                  |
| L-ERtra.Ubq1-1:1:2    | 20         | 94        | <i>E. ravennae</i>   | leader                                                                                                         |                                                                                  |
| L-ERtra.Ubq1-1:1:1    | 21         | 1041      | <i>E. ravennae</i>   | intron                                                                                                         | pMON136263,<br>PCR0145896,<br>pMON140904,<br>PCR50                               |
| EXP-ERtra.Ubq1-1:1:9  | 22         | 3152      | <i>E. ravennae</i>   | EXP: P-ERtra.Ubq1-1:1:9 (SEQ ID NO:23); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:20); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:24).  |                                                                                  |
| P-ERtra.Ubq1-1:1:9    | 23         | 2014      | <i>E. ravennae</i>   | promoter                                                                                                       |                                                                                  |
| L-ERtra.Ubq1-1:1:2    | 24         | 1044      | <i>E. ravennae</i>   | intron                                                                                                         | PCR0145820,<br>pMON140905,<br>PCR51                                              |
| EXP-ERtra.Ubq1-1:1:10 | 25         | 2663      | <i>E. ravennae</i>   | EXP: P-ERtra.Ubq1-1:1:11 (SEQ ID NO:26); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:20); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:24). |                                                                                  |
| P-ERtra.Ubq1-1:1:11   | 26         | 1525      | <i>E. ravennae</i>   | promoter                                                                                                       |                                                                                  |
| EXP-ERtra.Ubq1-1:1:8  | 27         | 2182      | <i>E. ravennae</i>   | EXP: P-ERtra.Ubq1-1:1:8 (SEQ ID NO:28); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:20); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:24).  | pMON136258,<br>PCR0145897,<br>pMON140906,<br>PCR52,<br>pMON142864,<br>pMON142862 |
| P-ERtra.Ubq1-1:1:8    | 28         | 1044      | <i>E. ravennae</i>   | promoter                                                                                                       | PCR0145821,<br>pMON140907,<br>PCR53                                              |
| EXP-ERtra.Ubq1-1:1:11 | 29         | 1934      | <i>E. ravennae</i>   | EXP: P-ERtra.Ubq1-1:1:12 (SEQ ID NO:30); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:20); L-ERtra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:24). |                                                                                  |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation                    | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species                  | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                 | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP |
|-------------------------------|------------|-----------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| P-ER1ra.Ubq1-1:1:12           | 30         | 796       | <i>E. ravennae</i>                    | promoter                                                                                                | PCR0145822, pMON140908, PCR54                     |
| EXP-ER1ra.Ubq1-1:1:12         | 31         | 1649      | <i>E. ravennae</i>                    | EXP: P-ER1ra.Ubq1-1:1:13 (SEQ ID NO:32); L-ER1ra.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:24).                             |                                                   |
| P-ER1ra.Ubq1-1:1:13           | 32         | 511       | <i>E. ravennae</i>                    | promoter                                                                                                |                                                   |
| EXP-Sv.Ubq1-1:1:2             | 33         | 2631      | <i>S. viridis</i>                     | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:34); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:35); I-Sv.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:36).    | pMON140878, PCR0145909, pMON129203, pMON131958    |
| P-Sv.Ubq1-1:1:1               | 34         | 1493      | <i>S. viridis</i>                     | promoter                                                                                                |                                                   |
| L-Sv.Ubq1-1:1:2               | 35         | 127       | <i>S. viridis</i>                     | leader                                                                                                  |                                                   |
| I-Sv.Ubq1-1:1:1               | 36         | 1011      | <i>S. viridis</i>                     | intron                                                                                                  |                                                   |
| EXP-Sv.Ubq1-1:1:3             | 37         | 2173      | <i>S. viridis</i>                     | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:38); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:35); I-Sv.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:36).    | PCR0145929, pMON129204                            |
| P-Sv.Ubq1-1:1:2               | 38         | 1035      | <i>S. viridis</i>                     | promoter                                                                                                |                                                   |
| EXP-Sv.Ubq1-1:1:5             | 39         | 1819      | <i>S. viridis</i>                     | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO:40); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:35); I-Sv.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:36).    | pMON129205, pMON131959                            |
| P-Sv.Ubq1-1:1:3               | 40         | 681       | <i>S. viridis</i>                     | promoter                                                                                                |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1-1:1:1 (Allele-1) | 41         | 1922      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:1 (SEQ ID NO:42); L-Zm.UbqM1-1:1:1 (SEQ ID NO:43); I-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO:44). | pMON140881, PCR0145914, pMON129210, pMON131961    |
| P-Zm.UbqM1-1:1:1 (Allele-1)   | 42         | 850       | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | promoter                                                                                                |                                                   |
| L-Zm.UbqM1-1:1:1 (Allele-1)   | 43         | 78        | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | leader                                                                                                  |                                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:5 (Allele-1)   | 44         | 994       | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | intron                                                                                                  |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1-1:1:4 (Allele-2) | 45         | 1971      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO:46); L-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO:47); I-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO:48). | pMON140882, PCR0145915, pMON129212                |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation                   | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species                  | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                  | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP |
|------------------------------|------------|-----------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|                              |            |           |                                       |                                                                                                          | pMON131963                                        |
| P-Zm.UbqM1-1:1:4 (Allele-2)  | 46         | 887       | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | promoter                                                                                                 |                                                   |
| L-Zm.UbqM1-1:1:5 (Allele-2)  | 47         | 77        | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | leader                                                                                                   |                                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:4 (Allele-2)  | 48         | 1007      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | intron                                                                                                   |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1:1:2 (Allele-3)  | 49         | 2005      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO:50); L-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO:51); I-Zm.UbqM1-1:1:11 (SEQ ID NO:52). | PCR0145916, pMON129211, pMON131962, pMON132047    |
| P-Zm.UbqM1-1:1:5 (Allele-3)  | 50         | 877       | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | promoter                                                                                                 |                                                   |
| L-Zm.UbqM1-1:1:4 (Allele-3)  | 51         | 78        | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | leader                                                                                                   |                                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:11 (Allele-3) | 52         | 1050      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | intron                                                                                                   |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1:1:5 (Allele-3)  | 53         | 2005      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO:50); L-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO:51); I-Zm.UbqM1-1:1:12 (SEQ ID NO:54). |                                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:12 (Allele-3) | 54         | 1050      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> | intron                                                                                                   |                                                   |
| EXP-Sb.Ubq4:1:1              | 55         | 1632      | <i>S. bicolor</i>                     | EXP: P-Sb.Ubq4-1:1:1 (SEQ ID NO:56); L-Sb.Ubq4-1:1:1 (SEQ ID NO:57); I-Sb.Ubq4-1:1:1 (SEQ ID NO:58).     | pMON140886, PCR0145921, pMON129219, pMON132932    |
| P-Sb.Ubq4-1:1:1              | 56         | 401       | <i>S. bicolor</i>                     | promoter                                                                                                 |                                                   |
| L-Sb.Ubq4-1:1:1              | 57         | 154       | <i>S. bicolor</i>                     | leader                                                                                                   |                                                   |
| I-Sb.Ubq4-1:1:1              | 58         | 1077      | <i>S. bicolor</i>                     | intron                                                                                                   |                                                   |
| EXP-Sb.Ubq6                  | 59         | 2000      | <i>S. bicolor</i>                     | EXP: P-Sb.Ubq6-1:1:2 (SEQ ID NO:60); L-Sb.Ubq6-1:1:1                                                     |                                                   |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation         | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                       | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP |
|--------------------|------------|-----------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| P-Sb.Ubq6-1:1:2    | 60         | 791       | <i>S. bicolor</i>    | promoter                                                                                                      |                                                   |
| L-Sb.Ubq6-1:1:1    | 61         | 136       | <i>S. bicolor</i>    | leader                                                                                                        |                                                   |
| I-Sb.Ubq6-1:1:1    | 62         | 1073      | <i>S. bicolor</i>    | intron                                                                                                        |                                                   |
| EXP-Sb.Ubq6:1:1    | 63         | 2064      | <i>S. bicolor</i>    | EXP: P-Sb.Ubq6-1:1:1 (SEQ ID NO:64); L-Sb.Ubq6-1:1:1 (SEQ ID NO:61); I-Sb.Ubq6-1:1:1 (SEQ ID NO:62).          | pMON140887, PCR0145920, pMON129218                |
| P-Sb.Ubq6-1:1:1    | 64         | 855       | <i>S. bicolor</i>    | promoter                                                                                                      |                                                   |
| EXP-Sb.Ubq7:1:1    | 65         | 2000      | <i>S. bicolor</i>    | EXP: P-Sb.Ubq7-1:1:1 (SEQ ID NO:66); L-Sb.Ubq7-1:1:1 (SEQ ID NO:67); I-Sb.Ubq7-1:1:1 (SEQ ID NO:68).          | pMON132974                                        |
| P-Sb.Ubq7-1:1:1    | 66         | 565       | <i>S. bicolor</i>    | promoter                                                                                                      |                                                   |
| L-Sb.Ubq7-1:1:1    | 67         | 77        | <i>S. bicolor</i>    | leader                                                                                                        |                                                   |
| I-Sb.Ubq7-1:1:1    | 68         | 1358      | <i>S. bicolor</i>    | intron                                                                                                        |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1:1:1 | 69         | 2622      | <i>S. italica</i>    | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:70); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:71); I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:72). | pMON140877, PCR0145900, pMON129200                |
| P-SETit.Ubq1-1:1:1 | 70         | 1492      | <i>S. italica</i>    | promoter                                                                                                      |                                                   |
| L-SETit.Ubq1-1:1:1 | 71         | 127       | <i>S. italica</i>    | leader                                                                                                        |                                                   |
| I-SETit.Ubq1-1:1:1 | 72         | 1003      | <i>S. italica</i>    | intron                                                                                                        |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1:1:4 | 73         | 2622      | <i>S. italica</i>    | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO:74); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:71); I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:72). | pMON132037                                        |
| P-SETit.Ubq1-1:1:4 | 74         | 1492      | <i>S. italica</i>    | promoter                                                                                                      |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1:1:2 | 75         | 2164      | <i>S. italica</i>    | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO:76); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:71); I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:72). |                                                   |
| P-SETit.Ubq1-1:1:2 | 76         | 1034      | <i>S. italica</i>    | promoter                                                                                                      |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1:1:3 | 77         | 1810      | <i>S. italica</i>    | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO:78); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:71); I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO:72). | PCR0145905, PCR0129202, pMON131957                |
| P-SETit.Ubq1-1:1:3 | 78         | 680       | <i>S. italica</i>    | promoter                                                                                                      |                                                   |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation      | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species   | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):           | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP                                                                                                                 |
|-----------------|------------|-----------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EXP-CLUbq1-1:1  | 79         | 1940      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:80); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:81); I-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:82). | pMON140889, PCR0145922, pMON140913, PCR19, pMON129221, pMON146795, pMON146796, pMON146797, pMON146798, pMON146799, pMON132047, pMON146800, pMON146801, pMON146802 |
| P-CLUbq1-1:1:1  | 80         | 837       | <i>C. lacryma-jobi</i> | promoter                                                                                          |                                                                                                                                                                   |
| L-CLUbq1-1:1:1  | 81         | 86        | <i>C. lacryma-jobi</i> | leader                                                                                            |                                                                                                                                                                   |
| I-CLUbq1-1:1:1  | 82         | 1017      | <i>C. lacryma-jobi</i> | intron                                                                                            |                                                                                                                                                                   |
| EXP-CLUbq1-1:3  | 83         | 1845      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:4 (SEQ ID NO:84); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:81); I-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:82). | PCR0145945, pMON140914, PCR20                                                                                                                                     |
| P-CLUbq1-1:1:4  | 84         | 742       | <i>C. lacryma-jobi</i> | promoter                                                                                          |                                                                                                                                                                   |
| EXP-CLUbq1-1:4  | 85         | 1504      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:3 (SEQ ID NO:86); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:81); I-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:82). | PCR0145946, pMON140915, PCR21                                                                                                                                     |
| P-CLUbq1-1:1:3  | 86         | 401       | <i>C. lacryma-jobi</i> | promoter                                                                                          |                                                                                                                                                                   |
| EXP-CLUbq1-1:5  | 87         | 1157      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:5 (SEQ ID NO:88); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:81); I-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO:82). | PCR0145947, pMON140916, PCR22                                                                                                                                     |
| P-CLUbq1-1:1:5  | 88         | 54        | <i>C. lacryma-jobi</i> | promoter                                                                                          |                                                                                                                                                                   |
| E-CLUbq1-1:1:1  | 89         | 798       | <i>C. lacryma-jobi</i> | enhancer                                                                                          |                                                                                                                                                                   |
| EXP-CLUbq1-1:12 | 90         | 3393      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:9 (SEQ ID NO: 91); L-CLUbq1-1:1:1                                               | pMON142729                                                                                                                                                        |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation        | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species   | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):               | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP     |
|-------------------|------------|-----------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| P-CLUbq1-1:1:9    | 91         | 2287      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Promoter (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:7 (SEQ ID NO: 92)                                              |                                                       |
| I-CLUbq1-1:1:7    | 92         | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                |                                                       |
| EXP-CLUbq1-1:1:16 | 93         | 3393      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:9 (SEQ ID NO: 91); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:6 (SEQ ID NO: 94)   | pMON146750, pMON142748                                |
| I-CLUbq1-1:1:6    | 94         | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                |                                                       |
| EXP-CLUbq1-1:1:11 | 95         | 2166      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:10 (SEQ ID NO: 96); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:7 (SEQ ID NO: 92)  | pMON142730                                            |
| P-CLUbq1-1:1:10   | 96         | 1060      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Promoter                                                                                              |                                                       |
| EXP-CLUbq1-1:1:17 | 97         | 2166      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:10 (SEQ ID NO: 96); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:6 (SEQ ID NO: 94)  | pMON146751, pMON142749                                |
| EXP-CLUbq1-1:1:10 | 98         | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:6 (SEQ ID NO: 94)   | pMON140889, PCR0145922, pMON140913, PCR19, pMON129221 |
| EXP-CLUbq1-1:1:18 | 99         | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:7 (SEQ ID NO: 92)   | pMON146795                                            |
| EXP-CLUbq1-1:1:19 | 100        | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:8 (SEQ ID NO: 101)  | pMON146796                                            |
| I-CLUbq1-1:1:8    | 101        | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                |                                                       |
| EXP-CLUbq1-1:1:20 | 102        | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:9 (SEQ ID NO: 103)  | pMON146797                                            |
| I-CLUbq1-1:1:9    | 103        | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                |                                                       |
| EXP-CLUbq1-1:1:21 | 104        | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:10 (SEQ ID NO: 105) | pMON146798                                            |
| I-CLUbq1-1:1:10   | 105        | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                |                                                       |
| EXP-CLUbq1-1:1:22 | 106        | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:11 (SEQ ID NO: 107) | pMON146799                                            |
| I-CLUbq1-1:1:11   | 107        | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                |                                                       |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation          | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species   | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                          | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP |
|---------------------|------------|-----------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| EXP-CLUbq1-1:23     | 108        | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:12 (SEQ ID NO: 109)                | pMON132047, pMON146800                            |
| I-CLUbq1-1:1:12     | 109        | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-CLUbq1-1:24     | 110        | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:13 (SEQ ID NO: 111)                | pMON146801                                        |
| I-CLUbq1-1:1:13     | 111        | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-CLUbq1-1:25     | 112        | 1943      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 80); L-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:14 (SEQ ID NO: 113)                | pMON146802                                        |
| I-CLUbq1-1:1:14     | 113        | 1020      | <i>C. lacryma-jobi</i> | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-CLUbq1-1:13     | 114        | 1848      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 84); L-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:6 (SEQ ID NO: 94)                | PCR0145945, pMON140914, PCR20                     |
| EXP-CLUbq1-1:14     | 115        | 1507      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 86); L-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:6 (SEQ ID NO: 94)                | PCR0145946, pMON140915, PCR21                     |
| EXP-CLUbq1-1:15     | 116        | 1160      | <i>C. lacryma-jobi</i> | EXP: P-CLUbq1-1:1:5 (SEQ ID NO: 88); L-CLUbq1-1:1 (SEQ ID NO: 81); I-CLUbq1-1:1:6 (SEQ ID NO: 94)                | PCR0145947, pMON140916, PCR22                     |
| EXP-SETit.Ubq1-1:5  | 117        | 2625      | <i>S. italica</i>      | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1 (SEQ ID NO: 70); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I-SETit.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 118)   | pMON140877, PCR0145900, pMON129200                |
| I-SETit.Ubq1-1:1:2  | 118        | 1006      | <i>S. italica</i>      | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1-1:10 | 119        | 2625      | <i>S. italica</i>      | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 64); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 120) | pMON132037                                        |
| I-SETit.Ubq1-1:1:3  | 120        | 1006      | <i>S. italica</i>      | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1-1:12 | 121        | 2625      | <i>S. italica</i>      | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 64); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I-SETit.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 122) |                                                   |
| I-SETit.Ubq1-1:1:4  | 122        | 1006      | <i>S. italica</i>      | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1-1:7  | 123        | 2167      | <i>S. italica</i>      | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 71); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I-SETit.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 123) | PCR0145928, pMON129201                            |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation                   | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species           | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                          | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP |
|------------------------------|------------|-----------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| EXP-SETit.Ubq1-1:6           | 124        | 1813      | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 73); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); L-SETit.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 118) | PCR0145905, pMON129202                            |
| EXP-SETit.Ubq1-1:11          | 125        | 1813      | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 73); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); L-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 120) | pMON131957                                        |
| EXP-SETit.Ubq1-1:13          | 126        | 1813      | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 73); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); L-SETit.Ubq1-1:1:5 (SEQ ID NO: 127) |                                                   |
| L-SETit.Ubq1-1:1:5           | 127        | 1006      | <i>S. italica</i>              | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-Sv.Ubq1-1:7              | 128        | 2634      | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 34); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 35); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 129)          | pMON140878, PCR0145909, pMON129203                |
| L-Sv.Ubq1-1:1:2              | 129        | 1014      | <i>S. viridis</i>              | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-Sv.Ubq1-1:11             | 130        | 2634      | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 34); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 35); L-Sv.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 131)          | pMON131958                                        |
| L-Sv.Ubq1-1:1:3              | 131        | 1014      | <i>S. viridis</i>              | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-Sv.Ubq1-1:8              | 132        | 2176      | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 38); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 35); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 129)          | PCR0145929, pMON129204                            |
| EXP-Sv.Ubq1-1:9              | 133        | 1822      | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 40); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 35); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 129)          | pMON129205                                        |
| EXP-Sv.Ubq1-1:10             | 134        | 1822      | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 135); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 35); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 129)         | PCR0145911                                        |
| P-Sv.Ubq1-1:1:4              | 135        | 681       | <i>S. viridis</i>              | Promoter                                                                                                         |                                                   |
| EXP-Sv.Ubq1-1:12             | 136        | 1822      | <i>S. viridis</i>              | EXP: P-Sv.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 40); L-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 35); L-Sv.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 131)          | pMON131959                                        |
| EXP-Zm.UbqM1-1:6 (Allele-1)  | 137        | 1925      | <i>Z. mays subsp. Mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:1 (SEQ ID NO: 42); L-Zm.UbqM1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43); L-Zm.UbqM1-1:1:1:3 (SEQ ID NO: 138)     | pMON140881, PCR0145914, pMON129210                |
| L-Zm.UbqM1-1:1:13 (Allele-1) | 138        | 997       | <i>Z. mays subsp. Mexicana</i> | Intron                                                                                                           |                                                   |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation                   | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species                  | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                     | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP |
|------------------------------|------------|-----------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| EXP-Zm.UbqM1-1:10 (Allele-1) | 139        | 1925      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:1 (SEQ ID NO: 42); L-Zm.UbqM1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43); I-Zm.UbqM1-1:1:17 (SEQ ID NO: 140) | pMON131961                                        |
| I-Zm.UbqM1-1:1:17 (Allele-1) | 140        | 997       | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | Intron                                                                                                      |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1-1:7 (Allele-2)  | 141        | 1974      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO: 46); L-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO: 47); I-Zm.UbqM1-1:1:14 (SEQ ID NO: 142) | pMON140882, PCR0145915, pMON129212                |
| I-Zm.UbqM1-1:1:14 (Allele-2) | 142        | 1010      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | Intron                                                                                                      |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1-1:12 (Allele-2) | 143        | 1974      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO: 46); L-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO: 47); I-Zm.UbqM1-1:1:19 (SEQ ID NO: 144) | pMON131963                                        |
| I-Zm.UbqM1-1:1:19 (Allele-2) | 144        | 1010      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | Intron                                                                                                      |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1-1:8 (Allele-3)  | 145        | 2008      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO: 50); L-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO: 51); I-Zm.UbqM1-1:1:15 (SEQ ID NO: 146) | PCR0145916, pMON129211                            |
| I-Zm.UbqM1-1:1:15 (Allele-3) | 146        | 1053      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | Intron                                                                                                      |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1-1:9 (Allele-3)  | 147        | 2008      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO: 50); L-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO: 51); I-Zm.UbqM1-1:1:16 (SEQ ID NO: 148) |                                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:16 (Allele-3) | 148        | 1053      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | Intron                                                                                                      |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1-1:11 (Allele-3) | 149        | 2008      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO: 50); L-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO: 51); I-Zm.UbqM1-1:1:18 (SEQ ID NO: 150) | pMON131962, pMON132047                            |
| I-Zm.UbqM1-1:1:18 (Allele-3) | 150        | 1053      | <i>Z. mays</i> subsp. <i>Mexicana</i> | Intron                                                                                                      |                                                   |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2              | 151        | 1635      | <i>S. bicolor</i>                     | EXP: P-Sb.Ubq4-1:1:1 (SEQ ID NO: 56); L-Sb.Ubq4-1:1:1 (SEQ ID NO: 57); I-Sb.Ubq4-1:1:2 (SEQ ID NO: 152)     | pMON140886, PCR0145921,                           |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation                   | SEQ ID NO: | Size (bp) | Source Genus/species           | Description and/or regulatory elements of EXP linked in 5' → 3' direction (SEQ ID NOs):                          | Plasmid Construct(s) and Amplicons comprising EXP |
|------------------------------|------------|-----------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| I-Sb.Ubq4-1:1:2              | 152        | 1080      | <i>S. bicolor</i>              | Intron                                                                                                           | pMON129219, pMON132932                            |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2              | 153        | 2067      | <i>S. bicolor</i>              | EXP: P-Sb.Ubq6-1:1:1 (SEQ ID NO: 64); L-Sb.Ubq6-1:1:1 (SEQ ID NO: 57); I-Sb.Ubq6-1:1:2 (SEQ ID NO: 154)          | pMON140887, PCR0145920, pMON129218, pMON132931    |
| I-Sb.Ubq6-1:1:2              | 154        | 1076      | <i>S. bicolor</i>              | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-Sb.Ubq6:1:3              | 155        | 2067      | <i>S. bicolor</i>              | EXP: P-Sb.Ubq6-1:1:1 (SEQ ID NO: 64); L-Sb.Ubq6-1:1:1 (SEQ ID NO: 57); I-Sb.Ubq6-1:1:3 (SEQ ID NO: 1569)         | pMON132931                                        |
| I-Sb.Ubq6-1:1:3              | 156        | 1076      | <i>S. bicolor</i>              | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-Sb.Ubq7:1:2              | 157        | 2003      | <i>S. bicolor</i>              | EXP: P-Sb.Ubq7-1:1:1 (SEQ ID NO: 66); L-Sb.Ubq7-1:1:1 (SEQ ID NO: 67); I-Sb.Ubq7-1:1:1A (SEQ ID NO: 158)         | pMON132974                                        |
| I-Sb.Ubq7-1:1:2              | 158        | 1361      | <i>S. bicolor</i>              | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1:1:E           | 180        | 2625      | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 64); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I-SETit.Ubq1-1:1:5 (SEQ ID NO: 127) |                                                   |
| EXP-Zm.UbqM1:1:13 (Allele-3) | 181        | 2008      | <i>Z. mays subsp. Mexicana</i> | EXP: P-Zm.UbqM1-1:1:5 (SEQ ID NO: 50); L-Zm.UbqM1-1:1:4 (SEQ ID NO: 51); I-Zm.UbqM1-1:1:20 (SEQ ID NO: 182)      |                                                   |
| I-Zm.UbqM1-1:1:20 (Allele-3) | 182        | 1053      | <i>Z. mays subsp. Mexicana</i> | Intron                                                                                                           |                                                   |
| EXP-SETit.Ubq1:1:9           | 183        | 2625      | <i>S. italica</i>              | EXP: P-SETit.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 64); L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I-SETit.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 118) |                                                   |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0089] As shown in Table 1, for example, the transcriptional regulatory EXP sequence designated EXP-ANDge.Ubq1-1:9 (SEQ ID NO: 1), with components isolated from *A. gerardii*, comprises a promoter element, P-ANDge.Ubq1-1:1:11 (SEQ ID NO: 2), operably linked 5' to a leader element, L-ANDge.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 3), operably linked 5' to an intron element, I-ANDge.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 4). Other EXP's are linked similarly, as outlined in Table 1.

[0090] As shown in Table 1, the sequence listing and FIGS. 1-7, variants of promoter sequences from the species *A. gerardii*, *E. ravennae*, *Z. mays* subsp. *mexicana*, *S. bicolor*, *C. lacryma-jobi*, *S. italica*, and *S. viridis* were engineered which comprise shorter promoter fragments of, for instance, P-ANDge.Ubq1-1:1:11 (SEQ ID NO:2), P-ERlra.Ubq1-1:1:10 (SEQ ID NO:19) or other respective promoters from other species, and for instance resulting in P-ANDge.Ubq1-1:1:9 (SEQ ID NO: 6), P-ERlra.Ubq1-1:1:9 (SEQ ID NO: 23), P-Cl.Ubq1-1:1:10 (SEQ ID NO: 96), P-SETit.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 76) and P-Sv.Ubq1-1:1:2 (SEQ ID NO: 38), as well as other promoter fragments. P-SETit.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 74) comprises a single nucleotide change relative to P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 70). Likewise, P-Sv.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 40) comprises a single nucleotide change relative to P-Sv.Ubq1-1:1:4 (SEQ ID NO: 135).

[0091] In some instances, variants of specific introns were created by altering the last 3 nucleotides of each respective intron following the sequence 5'-AG-3' of the 3' intron splice junction. These intron variants are shown in Table 2 below.

**Table 2. 3' end sequence of intron variants.**

| Annotation       | SEQ ID NO: | Intron 3' end nucleotides immediately following 3' splice site AG |
|------------------|------------|-------------------------------------------------------------------|
| I-Cl.Ubq1-1:1:7  | 92         | GTG                                                               |
| I-Cl.Ubq1-1:1:6  | 94         | GTC                                                               |
| I-Cl.Ubq1-1:1:8  | 101        | GCG                                                               |
| I-Cl.Ubq1-1:1:9  | 103        | GAC                                                               |
| I-Cl.Ubq1-1:1:10 | 105        | ACC                                                               |
| I-Cl.Ubq1-1:1:11 | 107        | GGG                                                               |
| I-Cl.Ubq1-1:1:12 | 109        | GGT                                                               |
| I-Cl.Ubq1-1:1:13 | 111        | CGT                                                               |
| I-Cl.Ubq1-1:1:14 | 113        | TGT                                                               |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Annotation                   | SEQ ID NO: | Intron 3' end nucleotides immediately following 3' splice site AG |
|------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------|
| I-SETit.Ubq1-1:1:2           | 118        | GTG                                                               |
| I-SETit.Ubq1-1:1:3           | 120        | GGT                                                               |
| I-SETit.Ubq1-1:1:4           | 122        | ACC                                                               |
| I-SETit.Ubq1-1:1:5           | 127        | GGC                                                               |
| I-Sv.Ubq1-1:1:2              | 129        | GTG                                                               |
| I-Sv.Ubq1-1:1:3              | 131        | GGT                                                               |
| I-Zm.UbqM1-1:1:13 (Allele-1) | 138        | GTC                                                               |
| I-Zm.UbqM1-1:1:17 (Allele-1) | 140        | GGT                                                               |
| I-Zm.UbqM1-1:1:14 (Allele-2) | 142        | GTC                                                               |
| I-Zm.UbqM1-1:1:19 (Allele-2) | 144        | GGT                                                               |
| I-Zm.UbqM1-1:1:15 (Allele-3) | 146        | GTC                                                               |
| I-Zm.UbqM1-1:1:18 (Allele-3) | 148        | GGT                                                               |
| I-Sb.Ubq6-1:1:2              | 154        | GTG                                                               |
| I-Sb.Ubq6-1:1:3              | 156        | GGT                                                               |
| I-Zm.UbqM1-1:1:20 (Allele-3) | 182        | CGG                                                               |

[0092] Also listed in Table 1 are three allelic variants isolated using the same primer sets designed for amplification of genomic DNA from *Z. mays* subsp. *mexicana*. Allelic variants of the EXP sequences are comprised of sequence that shares some identity within various regions of other sequences, but insertions, deletions and nucleotide mismatches may also be apparent within each promoter, leader and/or intron of each of the EXP sequences. The EXP sequence designated EXP-Zm.UbqM1:1:1 (SEQ ID NO: 41) represents a first allele (Allele-1) of the *Z. mays* subsp. *mexicana* Ubq1 gene transcriptional regulatory expression element group. The EXP sequences designated EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137) and EXP-Zm.UbqM1:1:10 (SEQ ID NO: 139) represent a first allele (Allele-1), with the only difference between the two EXPs occurring in the last 3' nucleotides of each respective intron following the sequence 5'-AG-3' of the 3' intron splice junction. The EXP sequence designated EXP-Zm.UbqM1:1:4 (SEQ ID NO: 45) represents a second allele (Allele-2) of the *Z. mays* subsp. *mexicana* Ubq1 gene transcriptional regulatory expression element group. The EXP sequences designated EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) and EXP-Zm.UbqM1:1:12 (SEQ ID NO: 143) represent a second allele (Allele-2), with the only difference between the two EXPs occurring in the last 3'

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

nucleotides of each respective intron following the sequence 5'-AG-3' of the 3' intron splice junction. The EXP sequences EXP-Zm.UbqM1:1:2 (SEQ ID NO: 49) and EXP-Zm.UbqM1:1:5 (SEQ ID NO: 53) represents a third allele (Allele-3) of the *Z. mays* subsp. *mexicana* Ubq1 gene transcriptional regulatory expression element group and comprise a single nucleotide difference at position 1034 within their respective introns (G for I-Zm.UbqM1-1:1:11, SEQ ID NO: 52 and T for I-Zm.UbqM1-1:1:12, SEQ ID NO: 54). The EXP sequences designated EXP-Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP-Zm.UbqM1:1:9 (SEQ ID NO: 147), EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) and EXP-Zm.UbqM1:1:13 (SEQ ID NO: 181) also represent a third allele (Allele-3). The intron of EXP-Zm.UbqM1:1:9, I-Zm.UbqM1-1:1:16 (SEQ ID NO: 148) comprises a thymine residue at position 1034, while the introns of EXP-Zm.UbqM1:1:8, EXP-Zm.UbqM1:1:11 and EXP-Zm.UbqM1:1:13 (I-Zm.UbqM1-1:1:15, SEQ ID NO: 146; I-Zm.UbqM1-1:1:18, SEQ ID NO: 11 and; I-Zm.UbqM1-1:1:20, SEQ ID NO: 182) each comprise a guanine residue at position 1034. In addition, the last 3, 3' end nucleotides of EXP-Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145) and EXP-Zm.UbqM1:1:9 (SEQ ID NO: 147) differ from those of EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) and EXP-Zm.UbqM1:1:13 (SEQ ID NO: 181).

#### **Example 2: Analysis of Regulatory Elements Driving GUS in Corn Protoplasts.**

[0093] Corn leaf protoplasts were transformed with plant expression vectors containing an EXP sequence driving expression of the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) transgene and compared to GUS expression in leaf protoplasts in which expression of GUS is driven by known constitutive promoters.

[0094] Expression of a transgene driven by EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) or EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) was compared with expression from known constitutive promoters. The foregoing EXP sequences were cloned into plant expression vectors as shown in Table 3 below to yield vectors in which an EXP sequence is operably linked 5' to a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter that contained a processable intron (referred to as GUS-2, SEQ ID NO: 160) derived from the potato light-inducible tissue-specific ST-LS1 gene (GenBank Accession: X04753) or a contiguous GUS coding sequence (GUS-1, SEQ ID NOS: 159), which was operably linked 5' to a 3' UTR derived from the *A. tumefaciens* Nopaline synthase gene (T-

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 161) or the wheat Hsp17 gene (T-Ta.Hsp17-1:1:1, SEQ ID NO: 162).

**Table 3. GUS plant expression plasmid construct and corresponding EXP sequence, GUS coding sequence and 3' UTR used for transformation of corn leaf protoplasts. "SEQ ID NO:" refers to given EXP sequence.**

| Plasmid    | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | GUS   | 3' UTR             |
|------------|---------------------------------------|------------|-------|--------------------|
| pMON19469  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1          | 170        | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON65328  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | GUS-2 | T-Ta.Hsp17-1:1:1   |
| pMON25455  | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179        | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON122605 | EXP-Os.TubA-3:1:1                     | 165        | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON136264 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                    | 5          | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON136259 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                    | 12         | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON136263 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:9                    | 22         | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |
| pMON136258 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8                    | 27         | GUS-1 | T-AGRtu.nos-1:1:13 |

[0095] Control plasmids (pMON19469, pMON65328, pMON25455 and pMON122605) used for comparison were constructed as described above and contain a known EXP sequence: EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170), EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163), EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179), or EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 165), respectively, operably linked 5' to a GUS coding sequence and 3' UTR. Three additional controls were provided to assess background GUS and luciferase expression: a no DNA control, an empty vector which is not designed for transgene expression, and an expression vector used to express green fluorescent protein (GFP).

[0096] Two plasmids, for use in co-transformation and normalization of data, were also constructed using methods known in the art. Each plasmid contained a specific luciferase coding sequence that was driven by a constitutive EXP sequence. The plant vector pMON19437 comprises a transgene cassette with a constitutive promoter operably linked 5' to an intron, (EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1, SEQ ID NO: 170), operably linked 5' to a firefly (*Photinus pyralis*) luciferase coding sequence (LUCIFERASE:1:3, SEQ ID NO: 166), operably linked 5' to a 3' UTR from the *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 161). The plant vector pMON63934 comprises a transgene cassette with a constitutive EXP sequence (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID NO: 168),

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

operably linked 5' to a sea pansy (*Renilla reniformis*) luciferase coding sequence (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 167), operably linked 5' to a 3' UTR from the *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 161).

[0097] Corn leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method, as is well known in the art. Protoplast cells were transformed with pMON19437 plasmid DNA, pMON63934 plasmid DNA, and an equimolar quantity of one of the plasmids presented in Table 3 and incubated overnight in total darkness. Measurements of both GUS and luciferase were conducted by placing aliquots of a lysed preparation of cells transformed as above into two different small-well trays. One tray was used for GUS measurements, and a second tray was used to perform a dual luciferase assay using the dual luciferase reporter assay system (Promega Corp., Madison, WI; see for example, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02). One or two transformations for each EXP sequence were performed and the mean expression values for each EXP sequence determined from several samples from each transformation experiment. Sample measurements were made using four replicates of each EXP sequence construct transformation, or alternatively, three replicates of each EXP sequence construct per one of two transformation experiments. The mean GUS and luciferase expression levels are provided in Table 4. In this table, the firefly luciferase values (*e.g.* from expression of pMON19437) are provided in the column labeled "FLuc" and the *Renilla* luciferase values are provided as in the column labeled "RLuc."

**Table 4. Mean GUS and Luciferase activity in transformed corn leaf protoplast cells.**

| Plasmid    | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | Gus     | RLuc   | FLuc  |
|------------|---------------------------------------|------------|---------|--------|-------|
| pMON19469  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1          | 170        | 789147  | 298899 | 36568 |
| pMON65328  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | 508327  | 158227 | 17193 |
| pMON25455  | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179        | 460579  | 183955 | 53813 |
| pMON122605 | EXP-Os.TubA-3:1:1                     | 165        | 25082   | 25821  | 21004 |
| pMON136264 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                    | 5          | 926083  | 101213 | 23704 |
| pMON136259 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                    | 12         | 845274  | 193153 | 51479 |
| pMON136263 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:9                    | 22         | 901985  | 132765 | 41313 |
| pMON136258 | EXP-ERIRA.Ubq1:1:8                    | 27         | 1011447 | 210635 | 66803 |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0098] To compare the relative activity of each EXP sequence, GUS values were expressed as a ratio of GUS to luciferase activity and normalized with respect to the expression levels observed for the EXP sequence EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 165). Table 5 below shows the GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.TubA-3:1:1 expression in corn protoplasts.

[0099] As can be seen in Table 5, GUS expression, driven by EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) or EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) was 4.51 to 9.42 fold higher than GUS expression driven by EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 165). GUS expression driven by EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) or EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) was also higher than that of EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170), EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163), or EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179).

**Table 5. GUS/RLuc fold expression as relative to EXP-Os.TubA-3:1:1 expression in corn leaf protoplast cells.**

| Plasmid    | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | Gus/RLuc | Gus/RLuc Normalized with respect to EXP-Os.TubA-3:1:1 |
|------------|---------------------------------------|------------|----------|-------------------------------------------------------|
| pMON19469  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1          | 170        | 2.640000 | 2.72                                                  |
| pMON65328  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | 3.210000 | 3.31                                                  |
| pMON25455  | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179        | 2.500000 | 2.57                                                  |
| pMON122605 | EXP-Os.TubA-3:1:1                     | 165        | 0.971000 | 1.00                                                  |
| pMON136264 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                    | 5          | 9.150000 | 9.42                                                  |
| pMON136259 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                    | 12         | 4.380000 | 4.51                                                  |
| pMON136263 | EXP-ERlra.Ubq1:1:9                    | 22         | 6.790000 | 6.99                                                  |
| pMON136258 | EXP-ERlra.Ubq1:1:8                    | 27         | 4.800000 | 4.94                                                  |

[00100] Table 6 below show GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.TubA-3:1:1 expression in corn protoplasts.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 6. GUS/FLuc fold expression as relative to EXP-Os.TubA-3:1:1 expression in corn leaf protoplast cells.**

| Plasmid    | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | Gus/FLuc  | Normalized with respect to EXP-Os.TubA-3:1:1 |
|------------|---------------------------------------|------------|-----------|----------------------------------------------|
| pMON19469  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1          | 170        | 21.600000 | 18.15                                        |
| pMON65328  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | 29.600000 | 24.87                                        |
| pMON25455  | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179        | 8.560000  | 7.19                                         |
| pMON122605 | EXP-Os.TubA-3:1:1                     | 165        | 1.190000  | 1.00                                         |
| pMON136264 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                    | 5          | 39.100000 | 32.86                                        |
| pMON136259 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                    | 12         | 16.400000 | 13.78                                        |
| pMON136263 | EXP-ERlra.Ubq1:1:9                    | 22         | 21.800000 | 18.32                                        |
| pMON136258 | EXP-ERlra.Ubq1:1:8                    | 27         | 15.100000 | 12.69                                        |

[00101] As can be seen in Table 6, GUS expression, driven by EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) or EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) demonstrated the same general trend when expressed as ratio of GUS/FLuc values and is normalized with respect to EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 165). Expression was 12.69 to 32.86 fold higher than GUS expression driven by EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 165). GUS expression driven by EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) or EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) was also higher in certain comparisons than that of EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170), EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163), or EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179).

### **Example 3: Analysis of Regulatory Elements Driving GUS in Corn Protoplasts Using GUS Transgene Cassette Amplicons.**

[00102] Corn leaf protoplasts were transformed with DNA amplicons derived from plant expression vectors containing an EXP sequence, driving expression of the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) transgene, and compared to leaf protoplast in which expression of GUS is driven by known constitutive promoters in a series of experiments presented below.

[0100] In a first set of experiments, corn protoplast cells, derived from leaf tissue were transformed as above with amplicons produced from amplification of GUS transgene cassettes

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

comprising plant expression vectors to compare expression of a transgene (GUS) driven by one of EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP-SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP-SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP-Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP-Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP-Sv.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 134), EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151), EXP-Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) and EXP-C1.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) with that of known constitutive promoters. Each EXP sequence comprising the amplification template from which the transgene cassette amplicon is produced was cloned using methods known in the art into a plant expression vector shown in Table 7 below under the heading of "Amplicon Template." The resulting plant expression vectors comprise a transgene cassette comprised of a EXP sequence, operably linked 5' to a coding sequence for  $\beta$ -glucuronidase (GUS) that either contains a processable intron ("GUS-2" as discussed in Example 2 above), or a contiguous GUS coding sequence ("GUS-1", as discussed above), operably linked 5' to a 3' UTR T-AGRtu.nos-1:1:13 or T-Ta.Hsp17-1:1:1, as also noted above. Amplicons were produced using methods known to those skilled in the art using the plasmid construct templates presented in Table 7 below. Briefly, a 5' oligonucleotide primer was designed to anneal to the promoter sequence and a 3' oligonucleotide primer, which anneals at the 3' end of the 3' UTR was used for amplification of each transgene cassette. Successive 5' deletions were introduced into the promoter sequences comprising the transgene cassettes, giving rise to different EXP sequences, by the use of different oligonucleotide primers which were designed to anneal at different positions within the promoter sequence comprising each amplicon template.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 7. GUS plant expression amplicons and corresponding plasmid construct amplicon templates, EXP sequence, GUS coding sequence and 3' UTR used for transformation of corn leaf protoplasts.**

| Amplicon ID | Amplicon Template | EXP sequence                                    | SEQ ID NO: | GUS Coding Sequence | 3' UTR                     |
|-------------|-------------------|-------------------------------------------------|------------|---------------------|----------------------------|
| PCR0145942  | pMON25455         | EXP-Os.Act1:1:9                                 | 179        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145941  | pMON33449         | P-CAMV.35S-ENH-<br>1:1:102/L-CAMV.35S-<br>1:1:2 | 169        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145943  | pMON65328         | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1       | 163        | GUS-2               | T-<br>Ta.Hsp17-<br>1:1:1   |
| PCR0145944  | pMON81552         | EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1                | 170        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145892  | pMON136264        | EXP-ANDge.Ubq1:1:7                              | 5          | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145815  | pMON136264        | EXP-ANDge.Ubq1:1:10                             | 10         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145893  | pMON136259        | EXP-ANDge.Ubq1:1:6                              | 12         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145817  | pMON136264        | EXP-ANDge.Ubq1:1:11                             | 14         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145819  | pMON136264        | EXP-ANDge.Ubq1:1:12                             | 16         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145896  | pMON136263        | EXP-ERlra.Ubq1:1:9                              | 22         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145820  | pMON136263        | EXP-ERlra.Ubq1:1:10                             | 25         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145897  | pMON136258        | EXP-ERlra.Ubq1:1:8                              | 27         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145821  | pMON136263        | EXP-ERlra.Ubq1:1:11                             | 29         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Amplicon ID | Amplicon Template | EXP sequence        | SEQ ID NO: | GUS Coding Sequence | 3' UTR                     |
|-------------|-------------------|---------------------|------------|---------------------|----------------------------|
| PCR0145822  | pMON136263        | EXP-ERlra.Ubq1:1:12 | 31         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145900  | pMON140877        | EXP-SETit.Ubq1:1:5  | 117        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145928  | pMON140877        | EXP-SETit.Ubq1:1:7  | 123        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145905  | pMON140877        | EXP-SETit.Ubq1:1:6  | 124        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145909  | pMON140878        | EXP-Sv.Ubq1:1:7     | 128        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145929  | pMON140878        | EXP-Sv.Ubq1:1:8     | 132        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145911  | pMON140878        | EXP-Sv.Ubq1:1:10    | 134        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145914  | pMON140881        | EXP-Zm.UbqM1:1:6    | 137        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145915  | pMON140882        | EXP-Zm.UbqM1:1:7    | 141        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145921  | pMON140886        | EXP-Sb.Ubq4:1:2     | 151        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145920  | pMON140887        | EXP-Sb.Ubq6:1:2     | 153        | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |
| PCR0145922  | pMON140889        | EXP-CI.Ubq1:1:10    | 98         | GUS-1               | T-<br>AGRtu.nos-<br>1:1:13 |

[0101] Plasmid constructs listed as amplicon templates in Table 7 served as templates for amplification of transgene expression cassettes comprising the listed EXP sequences of Table 7. Control plasmids used to generate GUS transgene amplicons for comparison were constructed as

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

previously described with known constitutive EXP sequences described in Example 2. Negative controls for determination of GUS and luciferase background, a no DNA control, and a control sample in which the two luciferase plasmids are used in transformation along with a plasmid DNA that does not express a coding sequence were also used. Plasmids pMON19437 and pMON63934, as discussed in Example 2, were also employed for co-transformation and normalization of data.

[0102] Corn leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method as described in Example 2, above. Table 8 below shows the average GUS and luciferase expression values determined for each transgene cassette.

**Table 8. Mean GUS and Luciferase activity in transformed corn leaf protoplast cells.**

| EXP sequence                            | SEQ ID NO: | GUS     | RLuc     | FLuc   |
|-----------------------------------------|------------|---------|----------|--------|
| EXP-Os.Act1:1:9                         | 179        | 1540.3  | 105416.8 | 2671.8 |
| P-CAMV.35S-ENH-1:1:102/L-CAMV.35S-1:1:2 | 169        | 10426.3 | 344088.6 | 8604.1 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1   | 163        | 12530.8 | 137722.6 | 3067.1 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1            | 170        | 61036.1 | 208125.3 | 5787.6 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                      | 5          | 59447.4 | 84667.6  | 2578.4 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                     | 10         | 40123.3 | 76753.8  | 2419.8 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                      | 12         | 42621.0 | 121751.3 | 3974.8 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                     | 14         | 44358.5 | 87105.8  | 2687.1 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                     | 16         | 48219.0 | 107762.1 | 3279.6 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9                      | 22         | 31253.0 | 171684.1 | 6476.1 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10                     | 25         | 7905.8  | 21235.6  | 462.4  |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8                      | 27         | 39935.8 | 173766.6 | 5320.3 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11                     | 29         | 34141.3 | 111626.8 | 3377.6 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12                     | 31         | 11540.3 | 42362.1  | 1045.3 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                      | 117        | 20496.5 | 88695.8  | 2358.8 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                      | 123        | 75728.5 | 185223.8 | 4723.1 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                      | 124        | 44148.3 | 161216.3 | 4962.1 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:7                         | 128        | 15043.8 | 74670.6  | 1888.3 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8                         | 132        | 31997.8 | 113787.1 | 3219.8 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:10                        | 134        | 38952.8 | 220208.6 | 7011.3 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6                        | 137        | 30528.3 | 90113.1  | 2453.6 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7                        | 141        | 34986.3 | 105724.7 | 2553.8 |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2                         | 151        | 9982.3  | 72593.8  | 2171.6 |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2                         | 153        | 33689.0 | 114709.6 | 3879.6 |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| EXP sequence     | SEQ ID NO: | GUS     | RLuc     | FLuc   |
|------------------|------------|---------|----------|--------|
| EXP-CI.Ubq1:1:10 | 98         | 50622.3 | 107084.3 | 2621.3 |

[0103] To compare the relative activity of each EXP sequence GUS values were expressed as a ratio of GUS to luciferase activity and normalized with respect to the expression levels observed for EXP-Os.Act1:1:1 and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1. Table 9 below shows the GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:1 and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 driven expression in corn protoplasts. Table 10 below shows the GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:1 and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 driven expression in corn protoplasts.

**Table 9. GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) in corn protoplasts.**

| EXP sequence                            | SEQ ID NO: | GUS/RLuc Relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | GUS/FLuc Relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 |
|-----------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9                         | 179        | 0.16                                                       | 0.14                                                       |
| P-CAMV.35S-ENH-1:1:102/L-CAMV.35S-1:1:2 | 169        | 0.33                                                       | 0.30                                                       |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1   | 163        | 1.00                                                       | 1.00                                                       |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1            | 170        | 3.22                                                       | 2.58                                                       |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                      | 5          | 7.72                                                       | 5.64                                                       |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                     | 10         | 5.75                                                       | 4.06                                                       |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                      | 12         | 3.85                                                       | 2.62                                                       |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                     | 14         | 5.60                                                       | 4.04                                                       |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                     | 16         | 4.92                                                       | 3.60                                                       |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9                      | 22         | 2.00                                                       | 1.18                                                       |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10                     | 25         | 4.09                                                       | 4.18                                                       |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8                      | 27         | 2.53                                                       | 1.84                                                       |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11                     | 29         | 3.36                                                       | 2.47                                                       |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12                     | 31         | 2.99                                                       | 2.70                                                       |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                      | 117        | 2.54                                                       | 2.13                                                       |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                      | 123        | 4.49                                                       | 3.92                                                       |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                      | 124        | 3.01                                                       | 2.18                                                       |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| EXP sequence     | SEQ ID NO: | GUS/RLuc Relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | GUS/FLuc Relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 |
|------------------|------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| EXP-Sv.Ubq1:1:7  | 128        | 2.21                                                       | 1.95                                                       |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8  | 132        | 3.09                                                       | 2.43                                                       |
| EXP-Sv.Ubq1:1:10 | 134        | 1.94                                                       | 1.36                                                       |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6 | 137        | 3.72                                                       | 3.05                                                       |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7 | 141        | 3.64                                                       | 3.35                                                       |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2  | 151        | 1.51                                                       | 1.13                                                       |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2  | 153        | 3.23                                                       | 2.13                                                       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10 | 98         | 5.20                                                       | 4.73                                                       |

**Table 10. GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) in corn leaf protoplasts.**

| EXP sequence                            | SEQ ID NO: | GUS/RLuc Relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/FLuc Relative to EXP-Os.Act1:1:9 |
|-----------------------------------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9                         | 179        | 1.00                                 | 1.00                                 |
| P-CAMV.35S-ENH-1:1:102/L-CAMV.35S-1:1:2 | 169        | 2.07                                 | 2.10                                 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1   | 163        | 6.23                                 | 7.09                                 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1            | 170        | 20.07                                | 18.29                                |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                      | 5          | 48.05                                | 39.99                                |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                     | 10         | 35.78                                | 28.76                                |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                      | 12         | 23.96                                | 18.60                                |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                     | 14         | 34.85                                | 28.64                                |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                     | 16         | 30.62                                | 25.50                                |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9                      | 22         | 12.46                                | 8.37                                 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10                     | 25         | 25.48                                | 29.66                                |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8                      | 27         | 15.73                                | 13.02                                |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11                     | 29         | 20.93                                | 17.53                                |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12                     | 31         | 18.64                                | 19.15                                |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                      | 117        | 15.82                                | 15.07                                |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                      | 123        | 27.98                                | 27.81                                |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                      | 124        | 18.74                                | 15.43                                |
| EXP-Sv.Ubq1:1:7                         | 128        | 13.79                                | 13.82                                |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8                         | 132        | 19.25                                | 17.24                                |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| EXP sequence     | SEQ ID NO: | GUS/RLuc Relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/FLuc Relative to EXP-Os.Act1:1:9 |
|------------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| EXP-Sv.Ubq1:1:10 | 134        | 12.11                                | 9.64                                 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6 | 137        | 23.19                                | 21.58                                |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7 | 141        | 22.65                                | 23.76                                |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2  | 151        | 9.41                                 | 7.97                                 |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2  | 153        | 20.10                                | 15.06                                |
| EXP-CI.Ubq1:1:10 | 98         | 32.35                                | 33.50                                |

[0104] As can be seen in Tables 9 and 10, nearly all of the EXP sequences were capable of driving GUS transgene expression in corn cells. Average GUS expression was higher for EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP-SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP-SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP-Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP-Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP-Sv.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 134), EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151), EXP-Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) and EXP-CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) when compared to GUS expression driven by EXP-Os.Act1:1:1 or EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1.

[0105] In a second set of experiments, a GUS cassette amplicon comprising the EXP sequence EXP-Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145) was compared to the control amplicons, PCR0145942 (EXP-Os.Act1:1:9, SEQ ID NO: 179) and PCR0145944 (EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1, SEQ ID NO: 170) with respect to GUS expression. GUS expression driven by the EXP sequence EXP-Zm.UbqM1:1:8 was higher than that of the two controls. Table 11 below shows the mean GUS and luciferase values determined for each amplicon. Table 12 below shows the GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 driven expression in corn protoplasts.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 11. Mean GUS and Luciferase activity in transformed corn leaf protoplast cells.**

| Amplicon   | EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS     | RLuc   | FLuc    |
|------------|------------------------------|------------|---------|--------|---------|
| PCR0145942 | EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 1512.25 | 190461 | 11333.8 |
| PCR0145944 | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 41176.5 | 330837 | 13885.8 |
| PCR0145916 | EXP-Zm.UbqM1:1:8             | 145        | 79581.5 | 330756 | 15262.5 |

**Table 12. GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) in corn leaf protoplasts.**

| EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS/RLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/FLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | GUS/FLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 |
|------------------------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 1.00                                 | 1.00                                 | 0.06                                              | 0.04                                              |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 15.68                                | 22.22                                | 1.00                                              | 1.00                                              |
| EXP-Zm.UbqM1:1:8             | 145        | 30.30                                | 39.08                                | 1.93                                              | 1.76                                              |

[0106] In a third set of experiments, amplicon GUS transgene cassettes were made as described above and assayed for expression driven by the EXP sequences, EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116). The amplicons were comprised of an EXP sequence operably linked to the GUS-1 coding sequence which was operably linked to the T-AGRtu.nos-1:1:13 3' UTR. Expression was compared to the controls EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170). Table 13 below shows the mean GUS and luciferase values determined for each amplicon. Table 14 below shows the GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 driven expression in corn protoplasts.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 13. Mean GUS and Luciferase activity in transformed corn leaf protoplast cells.**

| <b>Amplicon ID</b> | <b>EXP sequence</b>          | <b>SEQ ID NO:</b> | <b>GUS</b> | <b>RLuc</b> |
|--------------------|------------------------------|-------------------|------------|-------------|
| PCR0145942         | EXP-Os.Act1:1:9              | 179               | 9445.25    | 929755      |
| PCR0145944         | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170               | 78591.25   | 445127      |
| PCR0146628         | EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8                 | 192056.75  | 972642      |
| PCR0145922         | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98                | 175295.25  | 395563      |
| PCR0145945         | EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114               | 173674.5   | 402966      |
| PCR0145946         | EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115               | 185987.5   | 390052      |
| PCR0145947         | EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116               | 9435       | 320749      |

**Table 14. GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) in corn leaf protoplasts.**

| <b>EXP sequence</b>          | <b>SEQ ID NO:</b> | <b>GUS/RLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9</b> | <b>GUS/RLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1</b> |
|------------------------------|-------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9              | 179               | 1.00                                        | 0.06                                                     |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170               | 17.38                                       | 1.00                                                     |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8                 | 19.44                                       | 1.12                                                     |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98                | 43.62                                       | 2.51                                                     |
| EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114               | 42.43                                       | 2.44                                                     |
| EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115               | 46.94                                       | 2.70                                                     |
| EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116               | 2.90                                        | 0.17                                                     |

[0107] As can be seen in Table 14 above, the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) are capable of driving transgene expression. Expression driven by EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114) and EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) was higher than that of both controls. Expression driven by EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) was lower than EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) but higher than the control, EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179).

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0108] In a fourth set of experiments, amplicon GUS transgene cassettes were made as described above and assayed for expression driven by the EXP sequences, EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97). Expression was compared to the controls EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170). Table 15 below shows the mean GUS and luciferase values determined for each amplicon. Table 16 below shows the GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 driven expression in corn protoplasts.

**Table 15. Mean GUS and Luciferase activity in transformed corn leaf protoplast cells.**

| Amplicon ID | EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS       | RLuc      | FLuc     |
|-------------|------------------------------|------------|-----------|-----------|----------|
| PCR0145942  | EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 5333.5    | 171941.75 | 77817.88 |
| PCR0145944  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 88517     | 177260.25 | 54207.38 |
| PCR0145922  | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 130125.75 | 194216    | 32055    |
| pMON146750  | EXP-Cl.Ubq1:1:16             | 93         | 134101.75 | 182317.5  | 32434.5  |
| pMON146751  | EXP-Cl.Ubq1:1:17             | 97         | 107122.5  | 151783.25 | 51354.38 |

**Table 16. GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) in corn leaf protoplasts.**

| Amplicon ID | EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS/RLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/FLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | GUS/FLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 |
|-------------|------------------------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| PCR0145942  | EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 1.00                                 | 1.00                                 | 0.06                                              | 0.04                                              |
| PCR0145944  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 16.10                                | 23.83                                | 1.00                                              | 1.00                                              |
| PCR0145922  | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 21.60                                | 59.23                                | 1.34                                              | 2.49                                              |
| pMON146750  | EXP-Cl.Ubq1:1:16             | 93         | 23.71                                | 60.32                                | 1.47                                              | 2.53                                              |
| pMON146751  | EXP-Cl.Ubq1:1:17             | 97         | 22.75                                | 30.43                                | 1.41                                              | 1.28                                              |

[0109] As can be seen in Table 16, the EXP sequences EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) were able to

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

drive transgene expression. Expression driven by each of the EXP sequences was higher than that of both controls.

[0110] In a fifth set of experiments, amplicon GUS transgene cassettes were made as described above assay expression driven by the EXP sequences, EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) and EXP-Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108). Expression was compared to the controls EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163). Table 17 below shows the mean GUS and luciferase values determined for each amplicon. Table 18 below shows the GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 driven expression in corn protoplasts.

**Table 17. Mean GUS and Luciferase activity in transformed corn leaf protoplast cells.**

| Template   | Amplicon   | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | GUS      | RLuc     |
|------------|------------|---------------------------------------|------------|----------|----------|
| pMON65328  | PCR0145943 | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | 70352.00 | 79028.75 |
| pMON25455  | PCR0145942 | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179        | 33155.25 | 92337.00 |
| pMON131962 | pMON131962 | EXP-Zm.UbqM1:1:11                     | 149        | 18814.75 | 33663.00 |
| pMON132047 | pMON132047 | EXP-Cl.Ubq1:1:23                      | 108        | 15387.50 | 40995.50 |

**Table 18. GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) in corn leaf protoplasts.**

| Amplicon   | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | GUS/RLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 |
|------------|---------------------------------------|------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| PCR0145943 | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | 2.48                                 | 1.00                                                       |
| PCR0145942 | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179        | 1.00                                 | 0.40                                                       |
| pMON131962 | EXP-Zm.UbqM1:1:11                     | 149        | 1.56                                 | 0.63                                                       |
| pMON132047 | EXP-Cl.Ubq1:1:23                      | 108        | 1.05                                 | 0.42                                                       |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0111] As can be seen in Table 18 above, the EXP sequences, EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) and EXP-Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108) were able to drive GUS expression in corn leaf protoplasts. Expression was similar to that of the control, EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and lower than that of EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163).

[0112] The efficacy of regulatory elements driving GUS expression from amplicons can be similarly studied in sugarcane leaf protoplasts. For instance, sugarcane protoplasts may be transformed with DNA amplicons derived from plant expression vectors containing an EXP sequence, driving expression of the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) transgene, and compared to leaf protoplast in which expression of GUS is driven by known constitutive promoters. Likewise, regulatory elements driving CP4 expression from amplicons in corn or wheat protoplasts may be similarly studied.

**Example 4: Analysis of Regulatory Elements Driving GUS in Wheat Protoplasts Using GUS Transgene Cassette Amplicons.**

[0113] Wheat leaf protoplasts were transformed with DNA amplicons derived from plant expression vectors containing an EXP sequence, driving expression of the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) transgene, and compared to leaf protoplast in which expression of GUS was driven by known constitutive promoters.

[0114] Wheat protoplast cells derived from leaf tissue were transformed using methods known in the art with amplicons produced from amplification of GUS transgene cassettes comprising plant expression vectors to compare expression of a transgene (GUS) driven by the EXP sequences listed in Tables 10-11 with that of known constitutive promoters with methodology as described in a previous example (Example 3), using the same GUS cassette amplicons as that used for assay in Corn in Example 3 above. Control GUS cassette amplicons and Luciferase plasmids used for wheat protoplast transformation were also the same as those presented in the previous example and provided in Table 7 above in Example 3. Likewise, negative controls were used for the determination of GUS and luciferase background, as described above. Wheat leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method, as described in Example 3 above. Table 19 lists mean GUS and LUC activity seen in transformed wheat leaf protoplast cells, and Table 20 shows normalized GUS/RLuc ratios of expression in wheat protoplasts.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 19. Mean GUS and Luciferase activity in transformed wheat leaf protoplast cells.**

| EXP sequence                            | SEQ ID NO: | GUS     | RLuc    | GUS/RLuc  |
|-----------------------------------------|------------|---------|---------|-----------|
| EXP-Os.Act1:1:9                         | 179        | 2976.33 | 53334.8 | 0.0558047 |
| P-CAMV.35S-ENH-1:1:102/L-CAMV.35S-1:1:2 | 169        | 1431.33 | 55996.1 | 0.0255612 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1   | 163        | 29299.3 | 50717.4 | 0.5776973 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1            | 170        | 34294.3 | 63307.9 | 0.5417066 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                      | 5          | 68444.3 | 60329.1 | 1.1345158 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                     | 10         | 60606.3 | 60659.4 | 0.9991245 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                      | 12         | 33386.3 | 56712.1 | 0.5886984 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                     | 14         | 43237.3 | 48263.4 | 0.8958609 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                     | 16         | 51712.7 | 64702.8 | 0.7992341 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9                      | 22         | 20998.3 | 60273.4 | 0.3483845 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10                     | 25         | 17268.3 | 25465.4 | 0.6781084 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8                      | 27         | 34635.7 | 59467.1 | 0.5824341 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11                     | 29         | 28979   | 56153.8 | 0.516065  |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12                     | 31         | 41409.7 | 55152.4 | 0.7508221 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                      | 117        | 39427.7 | 57463.1 | 0.6861388 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                      | 123        | 108091  | 49330.4 | 2.191169  |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                      | 124        | 58703   | 46110.1 | 1.2731047 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:7                         | 128        | 29330   | 43367.1 | 0.676319  |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8                         | 132        | 53359   | 40076.4 | 1.3314306 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:10                        | 134        | 49122.7 | 53180.8 | 0.9236922 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6                        | 137        | 37268   | 54088.1 | 0.6890239 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7                        | 141        | 51408   | 47297.4 | 1.0869087 |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2                         | 151        | 35660.3 | 62591.1 | 0.5697347 |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2                         | 153        | 27543   | 57826.4 | 0.4763046 |
| EXP-CI.Ubq1:1:10                        | 98         | 54493.3 | 41964.1 | 1.2985699 |

**Table 20. GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) in wheat leaf protoplasts.**

| EXP sequence    | SEQ ID NO: | GUS/RLuc Relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc Relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 |
|-----------------|------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9 | 179        | 1.00                                 | 0.10                                                       |
| P-CAMV.35S-ENH- | 169        | 0.46                                 | 0.04                                                       |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

|                                           |     |       |      |
|-------------------------------------------|-----|-------|------|
| 1:1:102/L-CAMV.35S-1:1:2                  |     |       |      |
| EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163 | 10.35 | 1.00 |
| EXP-CaMV.35S-<br>enh+Zm.DnaK:1:1          | 170 | 9.71  | 0.94 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7                        | 5   | 20.33 | 1.96 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10                       | 10  | 17.90 | 1.73 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6                        | 12  | 10.55 | 1.02 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11                       | 14  | 16.05 | 1.55 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12                       | 16  | 14.32 | 1.38 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9                        | 22  | 6.24  | 0.60 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10                       | 25  | 12.15 | 1.17 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8                        | 27  | 10.44 | 1.01 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11                       | 29  | 9.25  | 0.89 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12                       | 31  | 13.45 | 1.30 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:5                        | 117 | 12.30 | 1.19 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:7                        | 123 | 39.26 | 3.79 |
| EXP-SETit.Ubq1:1:6                        | 124 | 22.81 | 2.20 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:7                           | 128 | 12.12 | 1.17 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:8                           | 132 | 23.86 | 2.30 |
| EXP-Sv.Ubq1:1:10                          | 134 | 16.55 | 1.60 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:6                          | 137 | 12.35 | 1.19 |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7                          | 141 | 19.48 | 1.88 |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2                           | 151 | 10.21 | 0.99 |
| EXP-Sb.Ubq6:1:2                           | 153 | 8.54  | 0.82 |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10                          | 98  | 23.27 | 2.25 |

[0115] As can be seen in Table 20 above, nearly all of the EXP sequences were capable of driving GUS transgene expression in wheat cells. GUS transgene expression driven by EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP-SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP-SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP-Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP-Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP-Sv.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 134), EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO:

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

137), EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151), EXP-Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) and EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) was much higher than GUS expression driven by EXP-Os.Act1:1:9. GUS expression of the amplicons in wheat leaf protoplast cells relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 was slightly different from the expression observed in corn protoplast cells. Each of EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP-SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP-SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP-Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP-Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP-Sv.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 134), EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) and EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) demonstrated higher levels of GUS expression relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1. The EXP sequences EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) and EXP-Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) demonstrated lower levels of GUS expression relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1.

[0116] In a second set of experiments, amplicon GUS transgene cassettes were made as described above and assayed for expression driven by the EXP sequences, EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116). The amplicons were comprised of an EXP sequence operably linked to the GUS-1 coding sequence which was operably linked to the T-AGRtu.nos-1:1:13 3' UTR. Expression was compared to the controls EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170). Table 21 below shows the mean GUS and luciferase values determined for each amplicon. Table 22 below shows the GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 driven expression in corn protoplasts.

**Table 21. Mean GUS and Luciferase activity in transformed wheat leaf protoplast cells.**

| Amplicon ID | EXP sequence    | SEQ ID NO: | GUS  | RLuc     |
|-------------|-----------------|------------|------|----------|
| PCR0145942  | EXP-Os.Act1:1:9 | 179        | 1234 | 176970.5 |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

|            |                              |     |         |          |
|------------|------------------------------|-----|---------|----------|
| PCR0145944 | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170 | 12883.5 | 119439   |
| PCR0146628 | EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8   | 38353.3 | 171535.3 |
| PCR0145922 | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98  | 34938   | 154245.8 |
| PCR0145945 | EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114 | 32121   | 122220.8 |
| PCR0145946 | EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115 | 56814   | 143318.3 |
| PCR0145947 | EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116 | 1890.5  | 167178.5 |

**Table 22. GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) in wheat leaf protoplasts.**

| EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS/RLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 |
|------------------------------|------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 1.00                                 | 0.06                                              |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 15.47                                | 1.00                                              |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8          | 32.07                                | 2.07                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 32.48                                | 2.10                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114        | 37.69                                | 2.44                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115        | 56.85                                | 3.68                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116        | 1.62                                 | 0.10                                              |

[0117] As can be seen in Table 22 above, the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) are capable of driving transgene expression. Expression driven by EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114) and EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) was higher than that of both controls. Expression driven by EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) was lower than EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) but higher than the control, EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179).

[0118] In a third set of experiments, amplicon GUS transgene cassettes were made as described above to assay expression driven by the EXP sequences, EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97). Expression was compared to the controls EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170). Table 23 below shows the mean GUS and luciferase values determined for each amplicon. Table 24 below shows the GUS/RLuc and GUS/FLuc

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 driven expression in corn protoplasts.

**Table 23. Mean GUS and Luciferase activity in transformed wheat leaf protoplast cells.**

| Amplicon ID | EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS     | RLuc    | FLuc    |
|-------------|------------------------------|------------|---------|---------|---------|
| PCR0145942  | EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 478     | 46584.5 | 2709.75 |
| PCR0145944  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 8178.5  | 43490.8 | 2927.25 |
| PCR0145922  | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 22068.3 | 47662.3 | 1289    |
| pMON146750  | EXP-Cl.Ubq1:1:16             | 93         | 34205   | 45064.5 | 1379.63 |
| pMON146751  | EXP-Cl.Ubq1:1:17             | 97         | 31758   | 45739.3 | 2820.75 |

**Table 24. GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) in wheat leaf protoplasts.**

| Amplicon ID | EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS/RLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/FLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | GUS/FLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 |
|-------------|------------------------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| PCR0145942  | EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 1.00                                 | 1.00                                 | 0.05                                              | 0.06                                              |
| PCR0145944  | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 18.33                                | 15.84                                | 1.00                                              | 1.00                                              |
| PCR0145922  | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 45.12                                | 97.05                                | 2.46                                              | 6.13                                              |
| pMON146750  | EXP-Cl.Ubq1:1:16             | 93         | 73.97                                | 140.55                               | 4.04                                              | 8.87                                              |
| pMON146751  | EXP-Cl.Ubq1:1:17             | 97         | 67.67                                | 63.82                                | 3.69                                              | 4.03                                              |

[0119] As can be seen in Table 24 above, the EXP sequences EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) were able to drive transgene expression. Expression driven by each of the EXP sequences was higher than that of both controls.

[0120] In a fourth set of experiments, amplicon GUS transgene cassettes were made as described above to assay expression driven by the EXP sequences, EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) and EXP-Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108). Expression was compared to the controls EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163). Table 25 below shows the mean GUS and luciferase values determined for each amplicon. Table 26 below shows the GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

Os.Act1:1:9 and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 driven expression in corn protoplasts.

**Table 25. Mean GUS and Luciferase activity in transformed wheat leaf protoplast cells.**

| Template   | Amplicon ID | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | GUS      | RLuc     |
|------------|-------------|---------------------------------------|------------|----------|----------|
| pMON65328  | PCR0145943  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | 67459.13 | 11682.00 |
| pMON25455  | PCR0145942  | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179        | 56618.33 | 16654.83 |
| pMON131962 | pMON131962  | EXP-Zm.UbqM1:1:11                     | 149        | 53862.13 | 10313.75 |
| pMON132047 | pMON132047  | EXP-Cl.Ubq1:1:23                      | 108        | 38869.38 | 12279.00 |

**Table 26. GUS/RLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) in wheat leaf protoplasts.**

| Amplicon ID | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | GUS/RLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 |
|-------------|---------------------------------------|------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| PCR0145943  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | 1.70                                 | 1.00                                                       |
| PCR0145942  | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179        | 1.00                                 | 0.59                                                       |
| pMON131962  | EXP-Zm.UbqM1:1:11                     | 149        | 1.54                                 | 0.90                                                       |
| pMON132047  | EXP-Cl.Ubq1:1:23                      | 108        | 0.93                                 | 0.55                                                       |

[0121] As can be seen in Table 26 above, the EXP sequences, EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) and EXP-Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108) were able to drive GUS expression in wheat leaf protoplasts. Expression was similar to that of the control, EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and lower than that of EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163).

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Example 5: Analysis of Regulatory Elements Driving GUS in Sugarcane Protoplasts Using GUS Transgene Cassette Amplicons.**

[0122] Sugarcane leaf protoplasts were transformed with DNA amplicons derived from plant expression vectors containing an EXP sequence, driving expression of the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) transgene, and compared to leaf protoplast in which expression of GUS was driven by known constitutive promoters.

[0123] Sugarcane protoplast cells derived from leaf tissue were transformed using a PEG-based transformation method, as described in Example 3 above with amplicons produced from amplification of GUS transgene cassettes comprising plant expression vectors to compare expression of a transgene (GUS) driven by one of EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) and presented in Table 27 below, with that of known constitutive promoters.

**Table 27. GUS plant expression amplicons and corresponding plasmid construct amplicon template and EXP sequence.**

| Amplicon ID | Amplicon Template | EXP sequence                 | SEQ ID NO: |
|-------------|-------------------|------------------------------|------------|
| PCR0145942  | pMON25455         | EXP-Os.Act1:1:9              | 179        |
| PCR0145944  | pMON81552         | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        |
| PCR0145892  | pMON136264        | EXP-ANDge.Ubq1:1:7           | 5          |
| PCR0145815  | pMON136264        | EXP-ANDge.Ubq1:1:10          | 10         |
| PCR0145893  | pMON136259        | EXP-ANDge.Ubq1:1:6           | 12         |
| PCR0145817  | pMON136264        | EXP-ANDge.Ubq1:1:11          | 14         |
| PCR0145819  | pMON136264        | EXP-ANDge.Ubq1:1:12          | 16         |
| PCR0145896  | pMON136263        | EXP-ERlra.Ubq1:1:9           | 22         |
| PCR0145820  | pMON136263        | EXP-ERlra.Ubq1:1:10          | 25         |
| PCR0145897  | pMON136258        | EXP-ERlra.Ubq1:1:8           | 27         |
| PCR0145821  | pMON136263        | EXP-ERlra.Ubq1:1:11          | 29         |
| PCR0145822  | pMON136263        | EXP-ERlra.Ubq1:1:12          | 31         |
| PCR0145922  | pMON140889        | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

|            |            |                  |     |
|------------|------------|------------------|-----|
| PCR0145945 | pMON140889 | EXP-Cl.Ubq1:1:13 | 114 |
| PCR0145946 | pMON140889 | EXP-Cl.Ubq1:1:14 | 115 |
| PCR0145947 | pMON140889 | EXP-Cl.Ubq1:1:15 | 116 |

[0124] Control GUS cassette amplicons and Luciferase plasmids used for sugarcane protoplast transformation were also the same as those presented in Examples 2 through 4 and provided in Table 7 above in Example 3. Likewise, negative controls were used for the determination of GUS and luciferase background, as described above. Table 28 lists mean GUS and Luc activity seen in transformed sugarcane leaf protoplast cells, and Table 29 shows normalized GUS/RLuc ratios of expression in sugarcane leaf protoplasts.

**Table 28. Mean GUS and Luciferase activity in transformed wheat leaf protoplast cells.**

| EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS     | RLuc    | FLuc    |
|------------------------------|------------|---------|---------|---------|
| EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 6667.5  | 3024.5  | 1129.25 |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 14872.8 | 5171    | 2019.5  |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7           | 5          | 15225   | 4618.25 | 1775.75 |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10          | 10         | 17275.3 | 4333    | 1678    |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6           | 12         | 17236   | 5633.25 | 2240    |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11          | 14         | 22487.8 | 6898.25 | 2878    |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12          | 16         | 22145.3 | 6240.25 | 2676.5  |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9           | 22         | 16796.5 | 7759.75 | 3179    |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10          | 25         | 16267.5 | 5632.75 | 2436.75 |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8           | 27         | 25351   | 9019.5  | 4313.5  |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11          | 29         | 16652.3 | 3672.25 | 1534    |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12          | 31         | 12654.5 | 3256.75 | 1261.5  |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 22383.8 | 7097.5  | 3109.25 |
| EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114        | 14532.3 | 2786.5  | 1198.25 |
| EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115        | 19244.5 | 3455.25 | 1475    |
| EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116        | 6676.5  | 3870.25 | 1497.75 |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 29. GUS/RLuc and GUS/FLuc ratios of expression normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) in sugarcane leaf protoplasts.**

| EXP sequence                 | SEQ ID NO: | GUS/RLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/FLuc relative to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | GUS/FLuc relative to EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 |
|------------------------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| EXP-Os.Act1:1:9              | 179        | 1.00                                 | 1.00                                 | 0.77                                              | 0.80                                              |
| EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 1.30                                 | 1.25                                 | 1.00                                              | 1.00                                              |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:7           | 5          | 1.50                                 | 1.45                                 | 1.15                                              | 1.16                                              |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:10          | 10         | 1.81                                 | 1.74                                 | 1.39                                              | 1.40                                              |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:6           | 12         | 1.39                                 | 1.30                                 | 1.06                                              | 1.04                                              |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:11          | 14         | 1.48                                 | 1.32                                 | 1.13                                              | 1.06                                              |
| EXP-ANDge.Ubq1:1:12          | 16         | 1.61                                 | 1.40                                 | 1.23                                              | 1.12                                              |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:9           | 22         | 0.98                                 | 0.89                                 | 0.75                                              | 0.72                                              |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:10          | 25         | 1.31                                 | 1.13                                 | 1.00                                              | 0.91                                              |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8           | 27         | 1.27                                 | 1.00                                 | 0.98                                              | 0.80                                              |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:11          | 29         | 2.06                                 | 1.84                                 | 1.58                                              | 1.47                                              |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:12          | 31         | 1.76                                 | 1.70                                 | 1.35                                              | 1.36                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 1.43                                 | 1.22                                 | 1.10                                              | 0.98                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114        | 2.37                                 | 2.05                                 | 1.81                                              | 1.65                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115        | 2.53                                 | 2.21                                 | 1.94                                              | 1.77                                              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116        | 0.78                                 | 0.75                                 | 0.60                                              | 0.61                                              |

[0125] As can be seen in Table 29 above, the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) were all capable of driving transgene expression in sugarcane protoplasts. The EXP sequences, EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114) and EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) expressed GUS higher than EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) in this experiment.

**Example 6: Analysis of Regulatory Elements Driving CP4 in Corn Protoplasts.**

[0126] This example illustrates the ability of EXP-Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP-Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP-Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133), EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP-Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP-SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP-SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) and EXP-Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) in driving expression of glyphosate tolerance gene CP4 in corn protoplasts. These EXP sequences were cloned into plant binary transformation plasmid constructs using methods known in the art. The resulting plant expression vectors contained a right border region from *A. tumefaciens*, an ubiquitin EXP sequence operably linked 5' to a plastid targeted glyphosate tolerant EPSPS coding sequence (CP4, US RE39247), operably linked 5' to the T-AGRtu.nos-1:1:13 3' UTR and a left border region from *A. tumefaciens* (B-AGRtu.left border). The resulting plasmid constructs were used to transform corn leaf protoplasts cells using methods known in the art.

[0127] Plasmid constructs listed in Table 30, with EXP sequences as defined in Table 1, were utilized. Three control plasmids (pMON30098, pMON42410, and pMON30167), with known constitutive regulatory elements driving either CP4 or GFP, were constructed and used to compare the relative CP4 expression levels driven by these EXP sequences with CP4 expression driven by known constitutive expression elements. Two other plasmids (pMON19437 and pMON63934) were also used as described above to evaluate transformation efficiency and viability. Each plasmid contains a specific luciferase coding sequence driven by a constitutive EXP sequence.

[0128] Corn leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method, as described in Example 2 above. Measurements of both CP4 and luciferase were conducted similarly to Example 2 above. The average levels of CP4 protein expression expressed as part per million (ppm) is shown in Table 30 below.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 30. Average CP4 protein expression in corn leaf protoplasts.**

| Plasmid    | EXP sequence                          | SEQ ID NO: | CP4 Average ppm | CP4 STDEV ppm |
|------------|---------------------------------------|------------|-----------------|---------------|
| No DNA     | No DNA                                |            | 0               | 0             |
| pMON30098  | GFP                                   |            | 0               | 0             |
| pMON42410  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163        | 34.1            | 15.6          |
| pMON30167  | EXP-Os.Act1:1:1                       | 164        | 40.4            | 11.6          |
| pMON129203 | EXP-Sv.Ubq1:1:7                       | 128        | 45.2            | 6.2           |
| pMON129204 | EXP-Sv.Ubq1:1:8                       | 132        | 101.9           | 13.8          |
| pMON129205 | EXP-Sv.Ubq1:1:9                       | 133        | 71.1            | 8.7           |
| pMON129210 | EXP-Zm.UbqM1:1:6                      | 137        | 137.1           | 14.8          |
| pMON129211 | EXP-Zm.UbqM1:1:8                      | 145        | 136.5           | 12.3          |
| pMON129212 | EXP-Zm.UbqM1:1:7                      | 141        | 170.2           | 18.1          |
| pMON129200 | EXP-SETit.Ubq1:1:5                    | 117        | 44.3            | 9.5           |
| pMON129201 | EXP-SETit.Ubq1:1:7                    | 123        | 105.1           | 8.4           |
| pMON129202 | EXP-SETit.Ubq1:1:6                    | 124        | 124.9           | 33.7          |
| pMON129219 | EXP-Sb.Ubq4:1:2                       | 151        | 14.3            | 1             |
| pMON129218 | EXP-Sb.Ubq6:1:2                       | 153        | 75.7            | 8.9           |

[0129] As can be seen in Table 30, EXP-Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP-Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP-Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133), EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP-Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP-SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP-SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124) and EXP-Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) drove expression of the CP4 transgene at levels close to or higher than CP4 expression levels driven by EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 and EXP-Os.Act1:1:1. The EXP sequence, EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) demonstrated the ability to drive expression of CP4, but the level of expression was lower than that of the constitutive controls.

[0130] Similar data to that above may also be obtained from plants stably transformed with plasmid constructs described above, for instance, plants of progeny generation(s) R<sub>0</sub>, R<sub>1</sub> or F<sub>1</sub> or later. Likewise, expression from other plasmid constructs may be studied. For instance, pMON141619, comprises the EXP sequence EXP-ANDge.Ubq1:1:8, while pMON142862 is

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

comprised of the EXP sequence EXP-ERlra.Ubq1:1:8. These and other constructs may be analyzed in this manner.

**Example 7: Analysis of Regulatory Elements Driving CP4 in Corn Protoplasts using CP4 Transgene Cassette Amplicons.**

[0131] This example illustrates the ability of EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115), EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) in driving expression of glyphosate tolerance gene CP4 in corn protoplasts. These EXP sequences were cloned into plant binary transformation plasmid constructs. The resulting plant expression vectors were used as amplification templates to produce a transgene cassette amplicon comprised of an ubiquitin EXP sequence operably linked 5' to a plastid targeted glyphosate tolerant EPSPS coding sequence (CP4, US RE39247), operably linked 5' to the T-AGRtu.nos-1:1:13 3' UTR and a left border region from *A. tumefaciens*. The resulting amplicons were used to transform corn leaf protoplasts cells.

[0132] Corn leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method, as described in Example 2 above. Measurements of both CP4 were conducted using an ELISA-based assay. The average levels of CP4 protein expression expressed as part per million (ppm) is shown in Tables 31 and 32 below.

[0133] In a first series of experiments, expression of CP4 driven by amplicons comprised of the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

(SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) were assayed in transformed corn leaf protoplasts and compared to CP4 expression levels driven by the constitutive controls, EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) and EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). The average levels of CP4 protein expression expressed as part per million (ppm) is shown in Tables 31 below.

**Table 31. Average CP4 protein expression in corn leaf protoplasts.**

| Amplicon Template | Amplicon ID | EXP sequence                 | SEQ ID NO: | CP4 ng/mg total protein Average | CP4 ng/mg total protein STDEV |
|-------------------|-------------|------------------------------|------------|---------------------------------|-------------------------------|
|                   |             | no DNA                       |            | 0.0                             | 0.0                           |
| pMON30098         |             | GFP (negative control)       |            | 0.0                             | 0.0                           |
| pMON19469         | PCR24       | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 605.5                           | 27.6                          |
| pMON30167         | PCR25       | EXP-Os.Act1:1:1              | 164        | 50.6                            | 14.2                          |
| pMON140896        | PCR41       | EXP-ANDge.Ubq1:1:7           | 5          | 459.0                           | 60.9                          |
| pMON140917        | PCR42       | EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8          | 258.2                           | 38.4                          |
| pMON140897        | PCR43       | EXP-ANDge.Ubq1:1:10          | 10         | 324.8                           | 21.6                          |
| pMON140898        | PCR44       | EXP-ANDge.Ubq1:1:6           | 12         | 394.9                           | 66.4                          |
| pMON140899        | PCR45       | EXP-ANDge.Ubq1:1:11          | 14         | 508.7                           | 89.6                          |
| pMON140900        | PCR46       | EXP-ANDge.Ubq1:1:12          | 16         | 329.3                           | 14.5                          |
| pMON140904        | PCR50       | EXP-ERlra.Ubq1:1:9           | 22         | 148.6                           | 24.4                          |
| pMON140905        | PCR51       | EXP-ERlra.Ubq1:1:10          | 25         | 215.8                           | 22.6                          |
| pMON140906        | PCR52       | EXP-ERlra.Ubq1:1:8           | 27         | 376.6                           | 44.1                          |
| pMON140907        | PCR53       | EXP-ERlra.Ubq1:1:11          | 29         | 459.9                           | 104.7                         |
| pMON140908        | PCR54       | EXP-ERlra.Ubq1:1:12          | 31         | 221.6                           | 15.9                          |
| pMON140913        | PCR19       | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 287.8                           | 50.9                          |
| pMON140914        | PCR20       | EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114        | 585.8                           | 47.9                          |
| pMON140915        | PCR21       | EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115        | 557.5                           | 76.6                          |
| pMON140916        | PCR22       | EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116        | 33.2                            | 9.5                           |

[0134] As can be seen in Table 31 above, the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) were able to drive CP4 expression. All of the EXP sequences with the exception of one EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) drove CP4 expression levels at a much higher level than the constitutive control, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Expression levels were lower than that of EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170).

[0135] In a second series of experiments, expression of CP4 driven by amplicons comprised of the EXP sequences EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) were assayed in transformed corn leaf protoplasts and compared to CP4 expression levels driven by the constitutive control, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). The average levels of CP4 protein expression expressed as part per million (ppm) is shown in Tables 32 below.

**Table 32. Average CP4 protein expression in corn leaf protoplasts.**

| <b>Amplicon Template</b> | <b>Amplicon ID</b> | <b>EXP sequence</b> | <b>SEQ ID NO:</b> | <b>Maize Leaf CP4 mg/total protein Avg</b> | <b>Maize Leaf CP4 mg/total protein StdDev</b> |
|--------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| pMON30167                | PCR25              | EXP-Os.Act1:1:1     | 164               | 12.2                                       | 1.69                                          |
| pMON140913               | PCR19              | EXP-Cl.Ubq1:1:10    | 98                | 307.5                                      | 24.21                                         |
| pMON142748               | pMON142748         | EXP-Cl.Ubq1:1:16    | 93                | 245.95                                     | 30.14                                         |
| pMON142749               | pMON142749         | EXP-Cl.Ubq1:1:17    | 97                | 302.85                                     | 25.32                                         |

[0136] As can be seen in Table 32 above, the EXP sequences EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) were able to drive CP4 expression. Expression levels driven by all three EXP sequences were higher than that of the constitutive control, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164).

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Example 8: Analysis of Regulatory Elements Driving CP4 in Wheat Protoplasts.**

[0137] This example illustrates the ability of EXP-Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP-Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP-Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133), EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP-Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP-SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP-SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) and EXP-Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) to drive CP4 expression in wheat leaf protoplasts. These EXP sequences were cloned into plant binary transformation plasmid constructs using methods known in the art, and as described in Examples 2 and 5 above.

[0138] Three control plasmids (pMON30098, pMON42410, as previously described, and pMON43647 comprising a right border region from *Agrobacterium tumefaciens* with EXP-Os.Act1+CaMV.35S.2xAl-B3+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 138) operably linked 5' to a plastid targeted glyphosate tolerance coding sequence (CP4, US RE39247), operably linked 5' to T-AGRtu.nos-1:1:13, and a left border region (B-AGRtu.left border) with known constitutive regulatory elements driving either CP4 or GFP were constructed as outlined in Example 5.

[0139] Wheat leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method as described in the previous examples with the exception that  $1.5 \times 10^5$  protoplast cells per assay were used. Assays of luciferase and CP4 transgene expression were performed as described in Example 6 above. The mean CP4 expression levels determined by CP4 ELISA are presented in Table 34 below.

**Table 34. Mean CP4 Protein Expression in Wheat Leaf Protoplast Cells.**

| Plasmid    | EXP sequence                             | SEQ ID NO: | CP4 Average ppm | CP4 STDEV ppm |
|------------|------------------------------------------|------------|-----------------|---------------|
| No DNA     | No DNA                                   |            | 0               | 0             |
| pMON30098  | GFP                                      |            | 0               | 0             |
| pMON43647  | EXP-Os.Act1+CaMV.35S.2xAl-B3+Os.Act1:1:1 | 172        | 656.2           | 124.5         |
| pMON42410  | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1    | 163        | 438.3           | 78.9          |
| pMON30167  | EXP-Os.Act1:1:1                          | 164        | 583             | 107.4         |
| pMON129203 | EXP-Sv.Ubq1:1:7                          | 128        | 156.9           | 25.1          |
| pMON129204 | EXP-Sv.Ubq1:1:8                          | 132        | 39.5            | 7             |
| pMON129205 | EXP-Sv.Ubq1:1:9                          | 133        | 154.5           | 56.5          |
| pMON129210 | EXP-Zm.UbqM1:1:6                         | 137        | 1500            | 0             |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

|            |                    |     |       |       |
|------------|--------------------|-----|-------|-------|
| pMON129211 | EXP-Zm.UbqM1:1:8   | 145 | 199.7 | 64.9  |
| pMON129212 | EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141 | 234.6 | 66.9  |
| pMON129200 | EXP-SETit.Ubq1:1:5 | 117 | 725.7 | 149.7 |
| pMON129201 | EXP-SETit.Ubq1:1:7 | 123 | 64.9  | 14.5  |
| pMON129202 | EXP-SETit.Ubq1:1:6 | 124 | 122.9 | 48.7  |
| pMON129219 | EXP-Sb.Ubq4:1:2    | 151 | 113.1 | 32.8  |

[0140] The total amount of CP4 expression in wheat protoplasts driven by the EXP sequences and the known constitutive EXP sequence EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 demonstrated different levels of CP4 expression in wheat protoplasts when compared to corn protoplasts.

[0141] Several EXP sequences drove CP4 expression at lower levels in wheat protoplasts than the known constitutive EXP sequences EXP-Os.Act1+CaMV.35S.2xA1-B3+Os.Act1:1:1 and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1. Two EXP sequences, EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), and EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), provide higher levels of CP4 expression in wheat protoplasts than the known constitutive, EXP sequences in this assay. EXP-Zm.UbqM1:1:2 drove expression of CP4 at the highest level, with expression levels being 2.2 to 3.4 fold higher than EXP-Os.Act1+CaMV.35S.2xA1-B3+Os.Act1:1:1 and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1, respectively. All EXP sequences assayed demonstrated the capacity to drive expression of CP4 in wheat cells.

#### **Example 9: Analysis of Regulatory Elements Driving CP4 in Wheat Protoplasts using CP4 Transgene Cassette Amplicons.**

[0142] This example illustrates the ability of EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115), EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) in driving expression of glyphosate tolerance gene CP4 in wheat protoplasts. These EXP sequences were cloned into plant binary

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

transformation plasmid constructs. The resulting plant expression vectors were used as amplification templates to produce a transgene cassette amplicon comprised of an ubiquitin EXP sequence operably linked 5' to a plastid targeted glyphosate tolerant EPSPS coding sequence (CP4, US RE39247), operably linked 5' to the T-AGRtu.nos-1:1:13 3' UTR and a left border region from *A. tumefaciens*. The resulting amplicons were used to transform corn leaf protoplasts cells.

[0143] Wheat leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method, as described in Example 2 above. Measurements of both CP4 were conducted using an ELISA-based assay. The average levels of CP4 protein expression expressed as part per million (ppm) is shown in Tables 35 and 36 below.

[0144] In a first series of experiments, expression of CP4 driven by amplicons comprised of the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) were assayed in transformed wheat leaf protoplasts and compared to CP4 expression levels driven by the constitutive controls, EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) and EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). The average levels of CP4 protein expression expressed as part per million (ppm) is shown in Tables 35 below.

**Table 35. Average CP4 protein expression in wheat leaf protoplasts.**

| Amplicon Template | Amplicon ID | EXP sequence                 | SEQ ID NO: | CP4 ng/mg total protein Average | CP4 ng/mg total protein STDEV |
|-------------------|-------------|------------------------------|------------|---------------------------------|-------------------------------|
|                   |             | no DNA                       |            | 0.00                            | 0.00                          |
| pMON30098         |             | GFP (negative control)       |            | 0.00                            | 0.00                          |
| pMON19469         | PCR24       | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 76.11                           | 18.65                         |
| pMON30167         | PCR25       | EXP-Os.Act1:1:1              | 164        | 3.83                            | 0.73                          |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

|            |       |                     |     |        |       |
|------------|-------|---------------------|-----|--------|-------|
| pMON140896 | PCR41 | EXP-ANDge.Ubq1:1:7  | 5   | 103.46 | 16.31 |
| pMON140917 | PCR42 | EXP-ANDge.Ubq1:1:8  | 8   | 61.48  | 1.99  |
| pMON140897 | PCR43 | EXP-ANDge.Ubq1:1:10 | 10  | 62.65  | 4.58  |
| pMON140898 | PCR44 | EXP-ANDge.Ubq1:1:6  | 12  | 48.74  | 3.09  |
| pMON140899 | PCR45 | EXP-ANDge.Ubq1:1:11 | 14  | 54.91  | 3.50  |
| pMON140900 | PCR46 | EXP-ANDge.Ubq1:1:12 | 16  | 42.81  | 5.97  |
| pMON140904 | PCR50 | EXP-ERlra.Ubq1:1:9  | 22  | 31.26  | 1.69  |
| pMON140905 | PCR51 | EXP-ERlra.Ubq1:1:10 | 25  | 49.82  | 5.96  |
| pMON140906 | PCR52 | EXP-ERlra.Ubq1:1:8  | 27  | 37.43  | 4.52  |
| pMON140907 | PCR53 | EXP-ERlra.Ubq1:1:11 | 29  | 27.17  | 0.96  |
| pMON140908 | PCR54 | EXP-ERlra.Ubq1:1:12 | 31  | 17.41  | 4.13  |
| pMON140913 | PCR19 | EXP-Cl.Ubq1:1:10    | 98  | 66.66  | 13.45 |
| pMON140914 | PCR20 | EXP-Cl.Ubq1:1:13    | 114 | 79.42  | 10.74 |
| pMON140915 | PCR21 | EXP-Cl.Ubq1:1:14    | 115 | 75.53  | 9.32  |
| pMON140916 | PCR22 | EXP-Cl.Ubq1:1:15    | 116 | 0.00   | 0.00  |

[0145] As can be seen in Table 31 above, the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) were able to drive CP4 expression. All of the EXP sequences with the exception of one EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) drove CP4 expression levels at a much higher level than the constitutive control, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Expression levels were around the same level or lower than that of EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) for most of the EXP sequences.

[0146] In a second series of experiments, expression of CP4 driven by amplicons comprised of the EXP sequences EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) were assayed in transformed wheat leaf protoplasts and compared to CP4 expression levels driven by the constitutive control, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). The average levels of CP4 protein expression expressed as part per million (ppm) is shown in Tables 32 below.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 36. Average CP4 protein expression in wheat leaf protoplasts.**

| <b>Amplicon Template</b> | <b>Amplicon ID</b> | <b>EXP sequence</b> | <b>SEQ ID NO:</b> | <b>Maize Leaf CP4 mg/total protein Avg</b> | <b>Maize Leaf CP4 mg/total protein StdDev</b> |
|--------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| pMON30167                | PCR25              | EXP-Os.Act1:1:1     | 164               | 15.84                                      | 2.12                                          |
| pMON140913               | PCR19              | EXP-Cl.Ubq1:1:10    | 98                | 736.32                                     | 79.56                                         |
| pMON142748               | pMON142748         | EXP-Cl.Ubq1:1:16    | 93                | 593.72                                     | 80.22                                         |
| pMON142749               | pMON142749         | EXP-Cl.Ubq1:1:17    | 97                | 763.95                                     | 86.94                                         |

[0147] As can be seen in Table 36 above, the EXP sequences EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) and EXP-Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) were able to drive CP4 expression. Expression levels driven by all three EXP sequences were higher than that of the constitutive control, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164).

**Example 10: Analysis of Regulatory Elements Driving CP4 in Sugarcane Protoplasts.**

[0148] This example illustrates the ability of EXP-Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP-Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP-Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133), EXP-Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP-Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP-SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP-SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP-SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151), EXP-Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) and EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) in driving expression of CP4 in sugar cane leaf protoplasts. The EXP sequences were cloned into plant binary transformation plasmid constructs. The resulting vectors contained a right border region from *Agrobacterium tumefaciens*, an ubiquitin EXP sequence operably linked 5' to a plastid targeted glyphosate tolerant EPSPS coding sequence (CP4, US RE39247), operably linked 5' to the T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 127) or T-CaMV.35S-1:1:1 (SEQ ID NO: 140) 3' UTR and a left border region from *A. tumefaciens* (B-AGRtu.left border). The resulting plasmid constructs were used to transform sugarcane leaf protoplasts cells using PEG transformation method.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0149] Plasmid constructs pMON129203, pMON12904, pMON12905, pMON129210, pMON129211, pMON129212, pMON129200, pMON129201, pMON129202, pMON129219, and pMON129218 are as described in Table 12 above.

[0150] Three control plasmids (pMON30167 described above; pMON130803 also comprising EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164); and pMON132804 comprising EXP-P-CaMV.35S-enh-1:1:13/L-CaMV.35S-1:1:2/I-Os.Act1-1:1:19 (SEQ ID NO: 139), with known constitutive regulatory elements driving CP4 were constructed and used to compare the relative CP4 expression levels driven by the ubiquitin EXP sequences listed in Table 37 below.

[0151] Sugarcane leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method. The mean CP4 expression levels determined by CP4 ELISA are presented in Table 37 below.

**Table 37. Mean CP4 Protein Expression in Sugarcane Leaf Protoplast Cells.**

| Plasmid Construct | EXP sequence                                                | SEQ ID NO: | Experiment 1    |               | Experiment 2    |               |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
|                   |                                                             |            | CP4 Average ppm | CP4 STDEV ppm | CP4 Average ppm | CP4 STDEV ppm |
| pMON132804        | EXP-P-CaMV.35S-enh-1:1:13/L-CaMV.35S-1:1:2/I-Os.Act1-1:1:19 | 173        | 557.97          | 194.05        | 283.63          | 95.8          |
| pMON30167         | EXP-Os.Act1:1:1                                             | 164        | 57.15           | 20.99         | 18.36           | 5.41          |
| pMON130803        | EXP-Os.Act1:1:1                                             | 164        | 34.26           | 1.61          | 16.57           | 3.71          |
| pMON129203        | EXP-Sv.Ubq1:1:7                                             | 128        | 89.2            | 32.46         | 56.86           | 9.55          |
| pMON129204        | EXP-Sv.Ubq1:1:8                                             | 132        | 87.2            | 45.87         | 98.46           | 12.93         |
| pMON129205        | EXP-Sv.Ubq1:1:9                                             | 133        | 263.57          | 70.14         | 72.53           | 9.25          |
| pMON129210        | EXP-Zm.UbqM1:1:6                                            | 137        | 353.08          | 29.16         | 199.31          | 41.7          |
| pMON129211        | EXP-Zm.UbqM1:1:8                                            | 145        | 748.18          | 15.1          | 411.24          | 17.12         |
| pMON129212        | EXP-Zm.UbqM1:1:7                                            | 141        | 454.88          | 75.77         | 215.06          | 23.22         |
| pMON129200        | EXP-SETit.Ubq1:1:5                                          | 117        | 150.74          | 63.21         | 91.71           | 41.35         |
| pMON129201        | EXP-SETit.Ubq1:1:7                                          | 123        | 119.57          | 58.1          | 102.72          | 31.12         |
| pMON129202        | EXP-SETit.Ubq1:1:6                                          | 124        | 43.79           | 25.77         | 97.63           | 46.07         |
| pMON129219        | EXP-Sb.Ubq4:1:2                                             | 151        | 95.63           | 38.69         |                 |               |
| pMON129218        | EXP-Sb.Ubq6:1:2                                             | 153        | 343.34          | 119.2         | 179.75          | 51.16         |
| pMON129221        | EXP-Ct.Ubq1:1:10                                            | 98         | 374.8           | 205.28        | 258.93          | 38.03         |

[0152] As can be seen in Table 37 above, the EXP sequences demonstrated the ability to drive expression CP4 expression in sugarcane protoplasts. The levels of expression were similar to or greater than that of CP4 expression driven by EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). One EXP

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

sequence, EXP-Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), demonstrated higher levels of expression when compared to EXP-P-CaMV.35S-enh-1:1:13/L-CaMV.35S-1:1:2/I-Os.Act1-1:1:19 (SEQ ID NO: 139) in sugarcane protoplasts.

**Example 11: Analysis of Regulatory Elements Driving CP4 in Sugarcane Protoplasts using CP4 Transgene Cassette Amplicons.**

[0153] This example illustrates the ability of EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERIRA.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERIRA.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERIRA.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERIRA.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERIRA.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-CL.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-CL.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-CL.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-CL.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) in driving expression of the glyphosate tolerance gene CP4 in sugarcane protoplasts. These EXP sequences were cloned into plant binary transformation plasmid constructs. The resulting plant expression vectors were used as amplification templates to produce a transgene cassette amplicon comprised of an ubiquitin EXP sequence operably linked 5' to a plastid targeted glyphosate tolerant EPSPS coding sequence (CP4, US RE39247), operably linked 5' to the T-AGRtu.nos-1:1:13 3' UTR and a left border region from *A. tumefaciens*. The resulting amplicons were used to transform sugarcane leaf protoplasts cells.

[0154] Sugarcane leaf protoplasts were transformed using a PEG-based transformation method, as described in Example 2 above. Measurements of both CP4 were conducted using an ELISA-based assay.

[0155] Expression of CP4 driven by amplicons comprised of the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERIRA.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERIRA.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERIRA.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERIRA.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERIRA.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-CL.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-CL.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP-CL.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) and EXP-CL.Ubq1:1:15 (SEQ ID

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

NO: 116) were assayed in transformed wheat leaf protoplasts and compared to CP4 expression levels driven by the constitutive controls, EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) and EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). The average levels of CP4 protein expression expressed as part per million (ppm) is shown in Table 38 below.

**Table 38. Average CP4 protein expression in sugarcane leaf protoplasts.**

| Amplicon Template | Amplicon ID | EXP sequence                 | SEQ ID NO: | CP4 ng/mg total protein Average | CP4 ng/mg total protein STDEV |
|-------------------|-------------|------------------------------|------------|---------------------------------|-------------------------------|
| pMON19469         | PCR24       | EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 | 170        | 99.6                            | 7.2                           |
| pMON30167         | PCR25       | EXP-Os.Act1:1:1              | 164        | 0.0                             | 0.0                           |
| pMON140896        | PCR41       | EXP-ANDge.Ubq1:1:7           | 5          | 21.9                            | 3.3                           |
| pMON140917        | PCR42       | EXP-ANDge.Ubq1:1:8           | 8          | 15.4                            | 1.9                           |
| pMON140897        | PCR43       | EXP-ANDge.Ubq1:1:10          | 10         | 20.7                            | 2.2                           |
| pMON140898        | PCR44       | EXP-ANDge.Ubq1:1:6           | 12         | 21.8                            | 2.8                           |
| pMON140899        | PCR45       | EXP-ANDge.Ubq1:1:11          | 14         | 36.9                            | 7.2                           |
| pMON140900        | PCR46       | EXP-ANDge.Ubq1:1:12          | 16         | 51.7                            | 5.6                           |
| pMON140904        | PCR50       | EXP-ERlra.Ubq1:1:9           | 22         | 10.3                            | 1.1                           |
| pMON140905        | PCR51       | EXP-ERlra.Ubq1:1:10          | 25         | 25.3                            | 4.7                           |
| pMON140906        | PCR52       | EXP-ERlra.Ubq1:1:8           | 27         | 29.9                            | 4.6                           |
| pMON140907        | PCR53       | EXP-ERlra.Ubq1:1:11          | 29         | 44.0                            | 7.1                           |
| pMON140908        | PCR54       | EXP-ERlra.Ubq1:1:12          | 31         | 37.0                            | 5.4                           |
| pMON140913        | PCR19       | EXP-Cl.Ubq1:1:10             | 98         | 19.2                            | 1.3                           |
| pMON140914        | PCR20       | EXP-Cl.Ubq1:1:13             | 114        | 20.5                            | 2.1                           |
| pMON140915        | PCR21       | EXP-Cl.Ubq1:1:14             | 115        | 23.2                            | 1.6                           |
| pMON140916        | PCR22       | EXP-Cl.Ubq1:1:15             | 116        | 0.0                             | 0.0                           |

[0156] As can be seen in Table 38 above, the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP-ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP-ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP-ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP-ERlra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP-ERlra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-ERlra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP-ERlra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114) and EXP-Cl.Ubq1:1:14

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

(SEQ ID NO: 115) were able to drive CP4 expression. EXP-Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) did not appear to express CP4 expression in this assay.

**Example 12: Analysis of Regulatory Elements driving GUS in Transgenic Corn.**

[0157] Corn plants were transformed with plant expression vectors containing a EXP sequences driving expression of the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) transgene, and the resulting plants were analyzed for GUS protein expression. The ubiquitin EXP sequences were cloned into plant binary transformation plasmid constructs using methods known in the art.

[0158] The resulting plant expression vectors contain a right border region from *A. tumefaciens*, a first transgene cassette to assay the EXP sequence operably linked to a coding sequence for  $\beta$ -glucuronidase (GUS) that possesses the processable intron GUS-2, described above, operably linked 5' to the 3' UTR from the rice lipid transfer protein gene (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 141); a second transgene selection cassette used for selection of transformed plant cells that confers resistance to the herbicide glyphosate (driven by the rice Actin 1 promoter), and a left border region from *A. tumefaciens*. The resulting plasmids were used to transform corn plants. Table 39 lists the plasmid designations, the EXP sequences and the SEQ ID NOs, which are also described in Table I.

**Table 39. Binary plant transformation plasmids and the associated EXP sequences.**

| Plasmid Construct | EXP sequence        | SEQ ID NO: | Data                              |
|-------------------|---------------------|------------|-----------------------------------|
| pMON142865        | EXP-ANDge.Ubq1:1:8  | 8          | R <sub>0</sub> and R <sub>1</sub> |
| pMON142864        | EXP-ERlra.Ubq1:1:8  | 27         | R <sub>0</sub> and R <sub>1</sub> |
| pMON142729        | EXP-Cl.Ubq1:1:12    | 90         | R <sub>0</sub>                    |
| pMON142730        | EXP-Cl.Ubq1:1:11    | 95         | R <sub>0</sub>                    |
| pMON132047        | EXP-Cl.Ubq1:1:23    | 108        | R <sub>0</sub>                    |
| pMON132037        | EXP-SETit.Ubq1:1:10 | 119        | R <sub>0</sub> and F <sub>1</sub> |
| pMON131957        | EXP-SETit.Ubq1:1:11 | 125        | F <sub>1</sub>                    |
| pMON131958        | EXP-Sv.Ubq1:1:11    | 130        | R <sub>0</sub> and F <sub>1</sub> |
| pMON131959        | EXP-Sv.Ubq1:1:12    | 136        | R <sub>0</sub>                    |
| pMON131961        | EXP-Zm.UbqM1:1:10   | 139        | R <sub>0</sub>                    |
| pMON131963        | EXP-Zm.UbqM1:1:12   | 143        | R <sub>0</sub>                    |
| pMON131962        | EXP-Zm.UbqM1:1:11   | 149        | R <sub>0</sub>                    |
| pMON132932        | EXP-Sb.Ubq4:1:2     | 151        | R <sub>0</sub>                    |
| pMON132931        | EXP-Sb.Ubq6:1:3     | 155        | R <sub>0</sub>                    |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

|            |                 |     |                                   |
|------------|-----------------|-----|-----------------------------------|
| pMON132974 | EXP-Sb.Ubq7:1:2 | 157 | R <sub>0</sub> and F <sub>1</sub> |
|------------|-----------------|-----|-----------------------------------|

[0159] Plants were transformed using *Agrobacterium*-mediated transformations, for instance as described in U.S. Patent Application Publication 20090138985.

[0160] Histochemical GUS analysis was used for qualitative expression analysis of transformed plants. Whole tissue sections were incubated with GUS staining solution X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-glucuronide) (1 milligram/milliliter) for an appropriate length of time, rinsed, and visually inspected for blue coloration. GUS activity was qualitatively determined by direct visual inspection or inspection under a microscope using selected plant organs and tissues. The R<sub>0</sub> plants are inspected for expression in the roots and leaves as well as the anther, silk and developing seed and embryo 21 days after pollination (21 DAP).

[0161] For quantitative analysis, total protein was extracted from selected tissues of transformed corn plants. One microgram of total protein was used with the fluorogenic substrate 4-methyleumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) in a total reaction volume of 50 microliters. The reaction product, 4-methyleumbelliferone (4-MU), is maximally fluorescent at high pH, where the hydroxyl group is ionized. Addition of a basic solution of sodium carbonate simultaneously stops the assay and adjusts the pH for quantifying the fluorescent product. Fluorescence was measured with excitation at 365 nm, emission at 445 nm using a Fluoromax-3 (Horiba; Kyoto, Japan) with Micromax Reader, with slit width set at excitation 2 nm and emission 3nm.

[0162] The average R<sub>0</sub> GUS expression observed for each transformation is presented in Tables 40 and 41 below. The R<sub>0</sub> GUS assay performed on transformants transformed with pMON131957 (EXP-SETit.Ubq1:1:11, SEQ ID NO:125) did not pass quality standards. These transformants were assayed at F1 generation and are presented further below in this example.

**Table 40. Average R<sub>0</sub> GUS expression in root and leaf tissue.**

| EXP sequence        | SEQ ID NO: | V3 Root | V4 Root | V7 Root | VT Root | V3 Leaf | V4 Leaf | V7 Leaf | VT Leaf |
|---------------------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8  | 8          | nd      | 255     | 199     | 70      | nd      | 638     | 168     | 130     |
| EXP-ERtra.Ubq1:1:8  | 27         | nd      | 477     | 246     | 62      | nd      | 888     | 305     | 242     |
| EXP-Cl.Ubq1:1:12    | 90         | nd      | 27      | 147     | 52      | nd      | 75      | 189     | 199     |
| EXP-Cl.Ubq1:1:11    | 95         | nd      | 28      | 77      | 50      | nd      | 101     | 177     | 223     |
| EXP-Cl.Ubq1:1:23    | 108        | 0       | nd      | 75      | 34      | 201     | nd      | 194     | 200     |
| EXP-SETit.Ubq1:1:10 | 119        | 0       | nd      | 29      | 57      | 58      | nd      | 37      | 46      |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| EXP sequence      | SEQ ID NO: | V3 Root | V4 Root | V7 Root | VT Root | V3 Leaf | V4 Leaf | V7 Leaf | VT Leaf |
|-------------------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| EXP-Sv.Ubq1:1:11  | 130        | nd      | nd      | nd      | 9       | 20      | nd      | 55      | 29      |
| EXP-Sv.Ubq1:1:12  | 136        | 63      | nd      | 0       | 28      | 184     | nd      | 27      | 16      |
| EXP-Zm.UbqM1:1:10 | 139        | 0       | nd      | 237     | 18      | 221     | nd      | 272     | 272     |
| EXP-Zm.UbqM1:1:12 | 143        | 0       | nd      | 21      | 43      | 234     | nd      | 231     | 196     |
| EXP-Zm.UbqM1:1:11 | 149        | 124     | nd      | 103     | 112     | 311     | nd      | 369     | 297     |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2   | 151        | 125     | nd      | 0       | 95      | 233     | nd      | 150     | 88      |
| EXP-Sb.Ubq6:1:3   | 155        | 154     | nd      | 13      | 128     | 53      | nd      | 39      | 55      |
| EXP-Sb.Ubq7:1:2   | 157        | 37      | nd      | 22      | 18      | 165     | nd      | 89      | 177     |

**Table 41. Average R<sub>0</sub> GUS expression in corn reproductive organs (anther, silk) and developing seed (embryo and endosperm).**

| EXP sequence        | SEQ ID NO: | VT Anther | VT/R1 Silk | 21 DAP Embryo | 21 DAP Endosperm |
|---------------------|------------|-----------|------------|---------------|------------------|
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8  | 8          | 247       | 256        | 24            | 54               |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8  | 27         | 246       | 237        | 36            | 61               |
| EXP-Cl.Ubq1:1:12    | 90         | 420       | 121        | 26            | 220              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:11    | 95         | 326       | 227        | 41            | 221              |
| EXP-Cl.Ubq1:1:23    | 108        | 598       | 416        | 212           | 234              |
| EXP-SETit.Ubq1:1:10 | 119        | 132       | 85         | 50            | 63               |
| EXP-Sv.Ubq1:1:11    | 130        | 217       | 3          | 45            | 92               |
| EXP-Sv.Ubq1:1:12    | 136        | 120       | 21         | 49            | 112              |
| EXP-Zm.UbqM1:1:10   | 139        | 261       | 506        | 403           | 376              |
| EXP-Zm.UbqM1:1:12   | 143        | 775       | 362        | 253           | 247              |
| EXP-Zm.UbqM1:1:11   | 149        | 551       | 452        | 234           | 302              |
| EXP-Sb.Ubq4:1:2     | 151        | 213       | 0          | 25            | 79               |
| EXP-Sb.Ubq6:1:3     | 155        | 295       | 87         | 51            | 61               |
| EXP-Sb.Ubq7:1:2     | 157        | 423       | 229        | 274           | 90               |

[0163] In R<sub>0</sub> corn plants, GUS expression levels in the leaf and root differed amongst the ubiquitin EXP sequences. While all of the EXP sequences demonstrated the ability to drive GUS transgene expression in stably transformed plants, each EXP sequence demonstrated a unique pattern of expression relative to the others. For example, high levels of GUS expression were observed in early stages of root development (V4 and V7) for EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) and EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) and declined by VT stage. Root expression

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

driven by EXP-Zm.UbqM1:1:10 (SEQ ID NO: 139) demonstrated no expression at V3 but was high at V7 and then dropped by VT stage. Root expression driven by EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) was maintained to a similar level throughout development from stages V3, V7 through VT. Root expression was observed to increase from early development (V3/V4) to V7 stage and then drop from V7 to V8 stage in plants transformed with EXP-Cl.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 90), EXP-Cl.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 95) and EXP-Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108). GUS expression levels showed dramatic differences in leaf tissue as well. The highest levels of leaf expression were conferred in early development (V3/V4) with EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) and EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) which decline at V7 through VT stage. GUS expression is retained from V3 through VT stage using EXP-Zm.UbqM1:1:10 (SEQ ID NO: 139), EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149), EXP-Zm.UbqM1:1:12 (SEQ ID NO: 143) and EXP-Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108); and to a lower extent using EXP-SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119) and EXP-Sb.Ubq6:1:3 (SEQ ID NO: 155). Expression in the leaf increased from V3 to V7 to VT stage using EXP-Cl.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 90), EXP-Cl.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 95) and EXP-Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108) while expression declined from V3 to VT stage using EXP-Sv.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 136) and EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151).

[0164] Likewise, with respect to reproductive tissue (anther and silk) and developing seed (21DAP embryo and endosperm) different patterns of expression were observed unique to each EXP sequence. For example, High levels of expression were observed in anther and silk as well as the developing seed using EXP-Zm.UbqM1:1:10 (SEQ ID NO: 139), EXP-Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149), EXP-Zm.UbqM1:1:12 (SEQ ID NO: 143) and EXP-Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108). Expression was high in the anther and silk but low in the developing seed using EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) and EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27). Expression driven by EXP-Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157) was high in reproductive tissue and high in the developing embryo but was lower in the developing endosperm. The EXP sequence, EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) only demonstrated expression in the anther but not in the silk and expressed much lower in the developing seed. EXP-Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) demonstrated a similar pattern as EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) with respect to reproductive tissue and developing seed, but whereas EXP-Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151)

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

showed expression in root and leaf tissues, EXP-Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) expressed much lower in these same tissues.

[0165] R<sub>0</sub> generation transformants, selected for single copy insertions were crossed with a non-transgenic LH244 line (resulting in F<sub>1</sub>) or were self-pollinated (resulting in R<sub>1</sub>) in order to produce an F<sub>1</sub> or R<sub>1</sub> population of seeds. In either case, heterozygous F<sub>1</sub> or R<sub>1</sub> plants were selected for study. GUS expression levels were measured in selected tissues over the course of development as previously described. The F<sub>1</sub> or R<sub>1</sub> tissues used for this study included: imbibed seed embryo, imbibed seed endosperm, root and coleoptide at 4 days after germination (DAG); leaf and root at V3 stage; root and mature leaf at V8 stage; root, mature leaves, VT stage (at tasseling, prior to reproduction) anther, pollen, leaf and senescing leaf; R<sub>1</sub> cob, silk, root and internode; kernel 12 days after pollination (DAP) and; embryo and endosperm 21 and 38 DAP. Selected tissue samples were also analyzed for F<sub>1</sub> plants exposed to conditions of drought and cold stress for transformants comprising pMON132037 (EXP-SETit.Ubq1:1:10, SEQ ID NO: 119), pMON131957 (EXP-SETit.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 125), pMON131958 (EXP-Sv.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 130) and pMON132974 (EXP-Sb.Ubq7:1:2, SEQ ID NO: 157). V3 root and leaf tissue was sampled after cold and drought exposure.

[0166] Drought stress was induced in F<sub>1</sub>, V3 plants transformed with pMON132037 (EXP-SETit.Ubq1:1:10, SEQ ID NO: 119), pMON131957 (EXP-SETit.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 125), pMON131958 (EXP-Sv.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 130) and pMON132974 (EXP-Sb.Ubq7:1:2, SEQ ID NO: 157) by withholding watering for 4 days allowing the water content to be reduced by at least 50% of the original water content of the fully watered plant. The drought protocol was comprised essentially of the following steps. V3 stage plants were deprived of water. As a corn plant experiences drought, the shape of the leaf will change from the usual healthy and unfolded appearance to a leaf demonstrating folding at the mid-rib vascular bundle and appearing V-shaped when viewed from the leaf tip to the stem. This change in morphology usually began to occur by about 2 days after the cessation of watering and was shown in earlier experiments to be associated with water loss of around 50% as measured by weight of pots prior to cessation of watering and weight of pots when the leaf curl morphology was observed in un-watered plants. Plants were considered to be under drought conditions, when the leaves showed wilting as evidenced by an inward curling (V-shape) of the leaf. This level of stress is considered to be a

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

form of sub-lethal stress. Once each plant demonstrated drought induction as defined above, the plant was destroyed to acquire both root and leaf samples.

[0167] In addition to drought, F<sub>1</sub> V3 stage plants transformed with pMON132037 (EXP-SETit.Ubq1:1:10, SEQ ID NO: 119), pMON131957 (EXP-SETit.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 125), pMON131958 (EXP-Sv.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 130) and pMON132974 (EXP-Sb.Ubq7:1:2, SEQ ID NO: 157) were also exposed to conditions of cold to determine if the regulatory elements demonstrated cold-induced expression of GUS. Whole plants were assayed for induction of GUS expression under cold stress at V3 stage. V3 stage corn plants were exposed to a temperature of 12°C in a growth chamber for 24 hours. Plants in the growth chamber were grown under a white light fluence of 800 micro moles per meter squared per second with a light cycle of ten hours of white light and fourteen hours of darkness. After cold exposure, leaf and root tissues were sampled for quantitative GUS expression.

[0168] GUS expression was measured as described above. The average F<sub>1</sub> GUS expression determined for each tissue sample is presented in Tables 42 and 43 below.

**Table 42. Average F<sub>1</sub> GUS expression in plants transformed with pMON142864 and pMON142865.**

| Organ                   | pMON142864 | pMON142865 |
|-------------------------|------------|------------|
| V3 Leaf                 | 86         | 74         |
| V3 Root                 | 41         | 52         |
| V8 Leaf                 | 109        | 123        |
| V8 Root                 | 241        | 252        |
| VT Flower, anthers      | 168        | 208        |
| VT Leaf                 | 158        | 104        |
| R1 Cob                  | 171        | 224        |
| R1 silk                 | 314        | 274        |
| R1 Root                 | 721        | 308        |
| R1 internode            | 428        | 364        |
| R2 Seed-12DAP           | 109        | 72         |
| R3 Seed-21DAP-Embryo    | 45         | 32         |
| R3 Seed-21DAP-Endosperm | 175        | 196        |
| R5 Seed-38DAP-Embryo    | 163        | 58         |
| R5 Seed-38DAP-Endosperm | 90         | 69         |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 43. Average F<sub>1</sub> GUS expression in plants transformed with pMON132037, pMON131957, pMON131958 and pMON132974.**

| <b>Organ</b>             | <b>pMON132037</b> | <b>pMON131957</b> | <b>pMON131958</b> | <b>pMON132974</b> |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Imbibed Seed Embryo      | 536               | 285               | 288               | 1190              |
| Imbibed Seed Endosperm   | 95                | 71                | 73                | 316               |
| Coleoptile-4 DAG         | 218               | 60                | 143               | 136               |
| Root-4 DAG               | 74                | 33                | 101               | 48                |
| V3 Leaf                  | 104               | 120               | 66                | 52                |
| V3 Root                  | 74                | 71                | 81                | 194               |
| V3 Leaf-cold             | 73                | 15                | 72                | N/A               |
| V3 Root-cold             | 113               | 44                | 89                | 49                |
| V3 Leaf-drought          | 97                | 344               | 103               | 157               |
| V3 Root-drought          | 205               | 153               | 129               | 236               |
| V8 Leaf                  | 185               | 142               | 77                | 282               |
| V8 Root                  | 33                | 16                | 61                | 28                |
| VT Flower-anthers        | 968               | 625               | 619               | 888               |
| VT Leaf                  | 138               | 89                | 132               | 268               |
| VT Leaf-senescing        | 121               | 100               | 156               | 345               |
| VT Pollen                | 610               | 1119              | 332               | 4249              |
| R1 Cob                   | 291               | 70                | 168               | 127               |
| R1 silk                  | 164               | 124               | 167               | 101               |
| R1 Root                  | 36                | 39                | 39                | 21                |
| R1 internode             | 255               | 89                | 232               | 141               |
| R2 Seed-12DAP            | 138               | 170               | 165               | 169               |
| R3 Seed-21 DAP-Embryo    | 94                | 97                | 489               | 389               |
| R3 Seed-21 DAP-Endosperm | 57                | 118               | 52                | 217               |
| R5 Seed-38 DAP-Embryo    | 600               | 147               | 377               | 527               |
| R5 Seed-38 DAP-Endosperm | 58                | 36                | 57                | 106               |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0169] In F<sub>1</sub> corn plants, GUS expression levels in the various tissues sampled differed amongst the ubiquitin EXP sequences. While all of the EXP sequences demonstrated the ability to drive GUS transgene expression in stably transformed F<sub>1</sub> corn plants, each EXP sequence demonstrated a unique pattern of expression relative to the others. For example, R1 root expression is about twice that for EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) than

[0170] EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8). GUS expression in the developing seed embryo at 38 DAP is almost three fold higher for EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) than EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8). In contrast leaf and root expression at V3 and V8 stage is about the same for EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) than EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8).

[0171] The F<sub>1</sub> GUS expression in imbibed seeds (embryo and endosperm tissues) was much higher in plants transformed with EXP-Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157) than in those transformed with EXP-SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119), EXP-SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125) and EXP-Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130). Drought caused an increase in V3 root expression in plants transformed with EXP-SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119), EXP-SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125), EXP-Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) and EXP-Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157), but only increased leaf expression in plants transformed with EXP-SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125), EXP-Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) and EXP-Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157). The drought enhanced V3 expression was greatest using EXP-SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125). Pollen expression was also much higher in plants transformed with EXP-Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157) than in those transformed with EXP-SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119), EXP-SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125) and EXP-Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130). Expression in the R1 internode was greatest with EXP-SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119) and EXP-Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) and least in plants transformed with EXP-SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125).

[0172] Each EXP sequence demonstrated the ability to drive transgene expression in stably transformed corn plants. However, each EXP sequence had a pattern of expression for each tissue that was unique and offers an opportunity to select the EXP sequence which will best provide expression of a specific transgene depending upon the tissue expression strategy needed to achieve the desired results. This example demonstrates EXP sequences isolated from homologous genes do not necessarily behave equivalently in the transformed plant and that

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

expression can only be determined through empirical investigation of the properties for each EXP sequence and cannot be predicted based upon the gene homology from which the promoter was derived.

**Example 13: Analysis of Regulatory Elements driving CP4 in Transgenic Corn.**

[0173] Corn plants were transformed with plant expression vectors containing EXP sequences driving expression of the CP4 transgene, and the resulting plants were analyzed for CP4 protein expression.

[0174] The EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133) and EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) were cloned into plant binary transformation plasmid constructs. The resulting vectors contained a right border region from *Agrobacterium tumefaciens*, an ubiquitin EXP sequence operably linked 5' to a plastid targeted glyphosate tolerant EPSPS coding sequence (CP4, US RE39247), operably linked 5' to the T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 127) 3' UTR and a left border region from *A. tumefaciens*. Table 44 below shows the plasmid constructs used to transform corn and the corresponding EXP sequences.

**Table 44. CP4 plasmid constructs and corresponding EXP sequences used to transform corn.**

| Plasmid Construct | EXP sequence       | SEQ ID NO: | Data                              |
|-------------------|--------------------|------------|-----------------------------------|
| pMON141619        | EXP-ANDge.Ubq1:1:8 | 8          | R <sub>0</sub> and F <sub>1</sub> |
| pMON142862        | EXP-ERlra.Ubq1:1:8 | 27         | R <sub>0</sub> and F <sub>1</sub> |
| pMON129221        | EXP-Cl.Ubq1:1:10   | 98         | R <sub>0</sub> and F <sub>1</sub> |
| pMON129205        | EXP-Sv.Ubq1:1:9    | 133        | R <sub>0</sub> and F <sub>1</sub> |
| pMON129212        | EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141        | R <sub>0</sub>                    |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0175] The resulting plasmids were used to transform corn plants. Transformed plants were selected for one or two copies of the inserted T-DNA and grown in the greenhouse. Selected tissues were sampled from the R<sub>0</sub> transformed plants at specific stages of development and CP4 protein levels were measured in those tissues using an CP4 ELISA assay. The average CP4 expression observed for each transformation is presented in Tables 45 and 46 below and graphically in figure 7.

**Table 45. Average leaf and root CP4 expression in R<sub>0</sub> transformed corn plants.**

| EXP sequence       | SEQ ID NO: | V4 Leaf | V7 Leaf | VT Leaf | V4 Root | V7 Root | VT Root |
|--------------------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8 | 8          | 20.90   | 18.53   | 25.49   | 11.50   | 26.54   | 17.20   |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8 | 27         | 19.92   | 16.60   | 25.58   | 9.92    | 26.31   | 13.33   |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10   | 98         | 10.70   | 12.49   | 17.42   | 7.56    | 13.95   | 6.68    |
| EXP-Sv.Ubq1:1:9    | 133        | 3.72    | 4.34    | 4.48    | 2.90    | 6.99    | 2.78    |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141        | 13.42   | 21.89   | 38.78   | 9.56    | 16.69   | 11.15   |

**Table 46. Average CP4 expression in reproductive tissue and developing seed in R<sub>0</sub> transformed corn plants.**

| EXP sequence       | SEQ ID NO: | VT Tassel | R1 Silk | R3 Embryo | R3 Endosperm |
|--------------------|------------|-----------|---------|-----------|--------------|
| EXP-ANDge.Ubq1:1:8 | 8          | 24.14     | 5.55    | 7.29      | 4.91         |
| EXP-ERlra.Ubq1:1:8 | 27         | 19.20     | 10.27   | 12.60     | 4.70         |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10   | 98         | 18.70     | 16.21   | 8.26      | 8.82         |
| EXP-Sv.Ubq1:1:9    | 133        | 7.10      | 4.72    | 3.13      | 1.74         |
| EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141        | 67.25     | 11.21   | 7.85      | 10.69        |

[0176] As can be seen in Tables 45 and 46, each of the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133) and EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) was able to drive CP4 expression in all tissues sampled from the R<sub>0</sub> transformed plants. Higher expression of CP4 in the root and leaf of transformants comprising EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) and EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) driving CP4 than EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO:

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

98) driving CP4 may be related to the level of vegetative tolerance to glyphosate application as observed for these populations of transformants (see Example 14 below).

[0177] Each EXP sequence exhibited a unique expression pattern with respect to the level of expression for each tissue sampled. For example, while CP4 expression in leaf, root and tassel were similar for the EXP sequences, EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) and EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), expression in silk using EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) was half that of expression driven by ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 21). This might be advantageous for expression of transgenes in which constitutive expression is desired but less expression in silk tissue would be preferred. The EXP sequences demonstrate unique patterns of CP4 constitutive expression in R<sub>0</sub> transformed corn plants.

[0178] The R<sub>0</sub> transformed corn plants were crossed with a non-transgenic LH244 variety to produce F<sub>1</sub> seed. The resulting F<sub>1</sub> generation seed was analyzed for segregation of the transgene cassette and plants heterozygous for the CP4 cassette were selected for analysis of CP4 expression. Seed was grown in the greenhouse and two groups of plants were produced, one group was sprayed with glyphosate while the other was left unsprayed. Expression of CP4 was analyzed in selected tissues using a standard ELISA based assay. The average CP4 expression is shown in Tables 47 and 48 below.

**Table 47. Average CP4 expression in F<sub>1</sub> transformed corn plants.**

| Organ                    | pMON141619 | pMON142862 | pMON129221 |
|--------------------------|------------|------------|------------|
| V4 Leaf                  | 11.50      | 13.51      | 7.68       |
| V4 Root                  | 12.48      | 12.60      | 10.29      |
| V7 Leaf                  | 16.59      | 20.21      | 12.01      |
| V7 Root                  | 11.00      | 13.62      | 8.15       |
| VT Leaf                  | 39.88      | 44.85      | 29.42      |
| VT Root                  | 17.43      | 21.83      | 13.43      |
| VT Flower, anthers       | 52.74      | 55.72      | 53.62      |
| R1 Silk                  | 16.01      | 23.81      | 14.42      |
| R3 Seed-21 DAP-Embryo    | 33.29      | 57.96      | 51.64      |
| R3 Seed-21 DAP-Endosperm | 2.99       | 3.20       | 6.44       |

[0179] As can be seen in Table 47 above, CP4 expression in leaf and root was higher in F<sub>1</sub> transformants transformed with pMON141619 (EXP-ANDge.Ubq1:1:8, SEQ ID NO: 5) and

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

pMON142862 (EXP-ERlra.Ubql:1:8, SEQ ID NO: 27) than in those transformed with pMON129221 (EXP-Cl.Ubql:1:10, SEQ ID NO: 98). Expression in the anther tissue was similar for all three EXP sequences while expression in the silk was highest using EXP-ERlra.Ubql:1:8 (SEQ ID NO: 27). Expression in the developing embryo (21 DAP) was highest in transformants comprising EXP-ERlra.Ubql:1:8 (SEQ ID NO: 27) and EXP-Cl.Ubql:1:10 (SEQ ID NO: 98) driving CP4. Expression in the developing endosperm was higher in transformants comprising EXP-Cl.Ubql:1:10 (SEQ ID NO: 98) driving CP4.

**Table 48. Average CP4 expression in F<sub>1</sub> transformed corn plants.**

| Organ                    | pMON129205 |
|--------------------------|------------|
| V4 Leaf                  | 1.73       |
| V4 Root                  | 2.44       |
| V7 Leaf                  | 2.84       |
| V7 Root                  | 1.51       |
| VT Leaf                  | 3.29       |
| VT Root                  | 2.63       |
| VT Flower, anthers       | 7.52       |
| R1 Silk                  | 1.99       |
| R3 Seed-21 DAP-Embryo    | 3.40       |
| R3 Seed-21 DAP-Endosperm | 1.79       |

[0180] As can be seen in Tables 47-48 above, CP4 expression was lower in all tissues of F<sub>1</sub> transformants transformed with pMON129205 (EXP-Sv.Ubql:1:9, SEQ ID NO: 133) than those transformed with pMON141619 (EXP-ANDge.Ubql:1:8, SEQ ID NO: 8), pMON142862 (EXP-ERlra.Ubql:1:8, SEQ ID NO: 27) and pMON129221 (EXP-Cl.Ubql:1:10, SEQ ID NO: 98).

[0181] The unique patterns of expression conferred by each of the EXP sequences assayed provide an opportunity to produce a transgenic plant in which expression can be fine-tuned to make small adjustments in transgene expression for optimal performance or effectiveness. In addition, empirical testing of these EXP sequences driving different transgene expression may produce results in which one particular EXP sequence is most suitable for expression of a specific transgene or class of transgenes while another EXP sequence is found to be best for a different transgene or class of transgenes.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Example 14: Analysis of Vegetative Glyphosate Tolerance in R<sub>0</sub> Transgenic Corn Plants.**

[0182] Corn plants were transformed with plant expression vectors containing EXP sequences driving expression of the CP4 transgene, and the resulting plants were assessed for vegetative and reproductive tolerance to glyphosate application.

[0183] F<sub>1</sub> transformed corn plants described in Example 13 above transformed with pMON141619, pMON142862, pMON129221, pMON129205 and pMON129212 and comprised of the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP-Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133) and EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), respectively driving CP4 were assessed for both vegetative and reproductive tolerance when sprayed with glyphosate. Ten F<sub>1</sub> plants for each event were divided into two groups, the first group consisting of five plants that received glyphosate spray and V4 and V8 stage of development; and a second group of five plants that were left unsprayed (*i.e.* control). Glyphosate was applied by broadcast foliar spray application using Roundup WeatherMax® at an application rate of 1.5 a.e./acre (a.e. acid equivalent). After seven to ten days, the leaves of each plant were assessed for damage. Vegetative tolerance (Veg Tol in Table 49) was assessed comparing the unsprayed and sprayed plants for each event and a damage rating scale was used to provide a final rating for vegetative tolerance (T = tolerant, NT = not tolerant). In addition seed set was assayed for all of the plants in each event. Seed set measures between control plants and sprayed plants was compared and an assignment of reproductive tolerance (Repro Tol in Table 49) was given for each event based upon the percent seed set of sprayed plants relative to the controls (T = tolerant, NT = not tolerant). Table 49 below shows the vegetative and reproductive tolerance ratings for each event sprayed at V4 and V8 stage. The letter “T” denotes tolerant and “NT” denotes not tolerant.

**Table 49. Leaf damage ratings of individual transformed corn events at V4 and V8 stage.**

| Plasmid Construct | EXP sequence       | SEQ ID NO: | Event   | Veg Tol V4 | Veg Tol V8 | Repro Tol |
|-------------------|--------------------|------------|---------|------------|------------|-----------|
| pMON141619        | EXP-ANDge.Ubq1:1:8 | 8          | Event 1 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 2 | T          | T          | T         |
|                   |                    |            | Event 3 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 4 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 5 | T          | T          | T         |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Plasmid Construct | EXP sequence       | SEQ ID NO: | Event   | Veg Tol V4 | Veg Tol V8 | Repro Tol |
|-------------------|--------------------|------------|---------|------------|------------|-----------|
|                   |                    |            | Event 6 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 7 | T          | T          | T         |
|                   |                    |            | Event 8 | T          | T          | T         |
|                   |                    |            | Event 9 | T          | T          | NT        |
| pMON142862        | EXP-ERlra.Ubq1:1:8 | 27         | Event 1 | T          | T          | T         |
|                   |                    |            | Event 2 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 3 | T          | T          | T         |
|                   |                    |            | Event 4 | T          | T          | T         |
|                   |                    |            | Event 5 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 6 | T          | T          | T         |
|                   |                    |            | Event 7 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 8 | T          | T          | T         |
|                   |                    |            | Event 9 | T          | T          | T         |
| pMON129221        | EXP-Cl.Ubq1:1:10   | 98         | Event 1 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 2 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 3 | NT         | NT         | T         |
|                   |                    |            | Event 4 | NT         | NT         | T         |
|                   |                    |            | Event 5 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 6 | NT         | NT         | T         |
|                   |                    |            | Event 7 | T          | T          | T         |
| pMON129205        | EXP-Sv.Ubq1:1:9    | 133        | Event 1 | NT         | NT         |           |
|                   |                    |            | Event 2 | NT         | NT         | NT        |
|                   |                    |            | Event 3 | T          | T          | NT        |
|                   |                    |            | Event 4 | NT         | NT         |           |
|                   |                    |            | Event 5 | NT         | NT         | NT        |
|                   |                    |            | Event 6 | NT         | NT         | NT        |
|                   |                    |            | Event 7 | NT         | NT         | NT        |
| pMON129212        | EXP-Zm.UbqM1:1:7   | 141        | Event 1 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event 2 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event 3 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event 4 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event 5 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event 6 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event 7 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event 8 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event 9 | T          | T          |           |
|                   |                    |            | Event   | T          | T          |           |

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

| Plasmid Construct | EXP sequence | SEQ ID NO: | Event | Veg Tol V4 | Veg Tol V8 | Repro Tol |
|-------------------|--------------|------------|-------|------------|------------|-----------|
|                   |              |            | 10    |            |            |           |

[0184] From Table 49 above, all transformed events assayed comprising CP4 transgene cassettes comprising the EXP sequences EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) and EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) demonstrated full vegetative tolerance based upon damage ratings that did not exceed a score of ten. Four events of nine comprising EXP-ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) and six events of nine comprising EXP-ERlra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) were both vegetatively and reproductively tolerant to glyphosate application. In contrast, events comprising EXP-Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) were either vegetatively tolerant or reproductively tolerant but not both. Only one event comprising EXP-Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133) demonstrated vegetative tolerance and none of the events tested were reproductive tolerant. All events comprising EXP-Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) demonstrated vegetative tolerance but an assessment of reproductive tolerance is still in progress.

**Example 15: Analysis of Expression Using Different 3' End Intron/Exon Splice Junction Sequences.**

[0185] Corn and Wheat leaf protoplast cells were transformed with plant expression constructs comprising EXP sequences driving GUS expression that comprise the same promoter and leader but have different 3' end nucleotides following the intron/exon splice junction sequence, 5'-AG-3' to see if expression is affected by the slight change in sequence. Expression was also compared to that of two constitutive control plasmids.

[0186] Plant expression constructs are built comprising a GUS expression cassette. The resulting vectors are comprised of the *Coix lacryma-jobi* ubiquitin promoter, P-Cl.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 80) operably linked 5' to the leader sequence, L-Cl.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 81), operably linked 5' to an intron element shown in Table 50 below which each comprise different nucleotides at the very 3' end just after the intron/exon splice junction 5'-AG-3' sequence, operably linked 5' to a GUS coding sequence which is operably linked 5' to T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 127) 3' UTR. Table 50 below shows the plant expression constructs and the corresponding 3' end sequence.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 50. Plant expression constructs, introns and 3' end sequence following the intron/exon splice junction sequence 5'-AG-3'.**

| <b>Plasmid construct</b> | <b>EXP sequence</b>                   | <b>SEQ ID NO:</b> | <b>Intron Variant</b>                | <b>Intron 3' end nucleotides immediately following 3' splice site AG</b> |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| pMON140889               | EXP-Cl.Ubq1:1:10                      | 98                | I-Cl.Ubq1-1:1:6<br>(SEQ ID NO: 94)   | GTC                                                                      |
| pMON146795               | EXP-Cl.Ubq1:1:18                      | 99                | I-Cl.Ubq1-1:1:7<br>(SEQ ID NO: 92)   | GTG                                                                      |
| pMON146796               | EXP-Cl.Ubq1:1:19                      | 100               | I-Cl.Ubq1-1:1:8<br>(SEQ ID NO: 101)  | GCG                                                                      |
| pMON146797               | EXP-Cl.Ubq1:1:20                      | 102               | I-Cl.Ubq1-1:1:9<br>(SEQ ID NO: 103)  | GAC                                                                      |
| pMON146798               | EXP-Cl.Ubq1:1:21                      | 104               | I-Cl.Ubq1-1:1:10<br>(SEQ ID NO: 105) | ACC                                                                      |
| pMON146799               | EXP-Cl.Ubq1:1:22                      | 106               | I-Cl.Ubq1-1:1:11<br>(SEQ ID NO: 107) | GGG                                                                      |
| pMON146800               | EXP-Cl.Ubq1:1:23                      | 108               | I-Cl.Ubq1-1:1:12<br>(SEQ ID NO: 109) | GGT                                                                      |
| pMON146801               | EXP-Cl.Ubq1:1:24                      | 110               | I-Cl.Ubq1-1:1:13<br>(SEQ ID NO: 111) | CGT                                                                      |
| pMON146802               | EXP-Cl.Ubq1:1:25                      | 112               | I-Cl.Ubq1-1:1:14<br>(SEQ ID NO: 113) | TGT                                                                      |
| pMON25455                | EXP-Os.Act1:1:9                       | 179               |                                      | Constitutive Control                                                     |
| pMON65328                | EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | 163               |                                      | Constitutive Control                                                     |

[0187] Corn and Wheat protoplasts were transformed as previously described and assayed for GUS and luciferase expression. Table 51 below shows the average GUS and RLuc values for both corn and wheat protoplast expression.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 51. Average GUS and RLuc values for corn and wheat protoplast cells.**

| EXP sequence                          | Intron 3' end nucleotides immed. following 3' splice site AG | Corn        |              |            | Wheat    |           |            |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------|--------------|------------|----------|-----------|------------|
|                                       |                                                              | Average GUS | Average RLuc | GUS / RLuc | Ave. GUS | Ave. RLuc | GUS / RLuc |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10                      | GTC                                                          | 140343.0    | 93870.75     | 1.50       | 40906.25 | 17381.75  | 2.35       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:18                      | GTG                                                          | 143106.25   | 60565.25     | 2.36       | 56709.00 | 17898.75  | 3.17       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:19                      | GCG                                                          | 136326.83   | 88589.75     | 1.54       | 43211.00 | 17352.50  | 2.49       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:20                      | GAC                                                          | 138110.83   | 104751.42    | 1.32       | 31711.50 | 17953.75  | 1.77       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:21                      | ACC                                                          | 137906.75   | 72519.50     | 1.90       | 54164.17 | 17772.83  | 3.05       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:22                      | GGG                                                          | 137306.83   | 92643.42     | 1.48       | 55198.25 | 14476.75  | 3.81       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:23                      | GGT                                                          | 144085.50   | 64351.25     | 2.24       | 43008.83 | 13911.50  | 3.09       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:24                      | CGT                                                          | 142061.50   | 65884.00     | 2.16       | 51210.50 | 15041.00  | 3.40       |
| EXP-Cl.Ubq1:1:25                      | TGT                                                          | 140353.00   | 61249.50     | 2.29       | 49577.75 | 15348.25  | 3.23       |
| EXP-Os.Act1:1:9                       | Constitutive Control                                         | 37665.25    | 65835.50     | 0.57       | 10830.25 | 17716.50  | 0.61       |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | Constitutive Control                                         | 49833.75    | 41268.75     | 1.21       | 15598.83 | 14877.50  | 1.05       |

[0188] The GUS/RLuc values for each *Coix lacryma-jobi* ubiquitin EXP sequence from Table 46 above were used to normalize the expression relative to the two constitutive controls EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) and are presented in Table 52 below.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**Table 52.** Normalized expression values of the *Coix lacryma-jobi* ubiquitin EXP sequences relative to EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163).

| EXP sequence                          | Intron 3' end nucleotides immediately following 3' splice site AG | Corn                                                |                                                                           | Wheat                                               |                                                                           |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|                                       |                                                                   | GUS/RLuc Normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc Normalized with respect to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | GUS/RLuc Normalized with respect to EXP-Os.Act1:1:9 | GUS/RLuc Normalized with respect to EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 |
| EXP-Cl.Ubq1:1:10                      | GTC                                                               | 2.61                                                | 1.24                                                                      | 3.85                                                | 2.24                                                                      |
| EXP-Cl.Ubq1:1:18                      | GTG                                                               | 4.13                                                | 1.96                                                                      | 5.18                                                | 3.02                                                                      |
| EXP-Cl.Ubq1:1:19                      | GCG                                                               | 2.69                                                | 1.27                                                                      | 4.07                                                | 2.38                                                                      |
| EXP-Cl.Ubq1:1:20                      | GAC                                                               | 2.30                                                | 1.09                                                                      | 2.89                                                | 1.68                                                                      |
| EXP-Cl.Ubq1:1:21                      | ACC                                                               | 3.32                                                | 1.57                                                                      | 4.99                                                | 2.91                                                                      |
| EXP-Cl.Ubq1:1:22                      | GGG                                                               | 2.59                                                | 1.23                                                                      | 6.24                                                | 3.64                                                                      |
| EXP-Cl.Ubq1:1:23                      | GGT                                                               | 3.91                                                | 1.85                                                                      | 5.06                                                | 2.95                                                                      |
| EXP-Cl.Ubq1:1:24                      | CGT                                                               | 3.77                                                | 1.79                                                                      | 5.57                                                | 3.25                                                                      |
| EXP-Cl.Ubq1:1:25                      | TGT                                                               | 4.01                                                | 1.90                                                                      | 5.28                                                | 3.08                                                                      |
| EXP-Os.Act1:1:9                       | Constitutive Control                                              | 1.00                                                | 0.47                                                                      | 1.00                                                | 0.58                                                                      |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 | Constitutive Control                                              | 2.11                                                | 1.00                                                                      | 1.72                                                | 1.00                                                                      |

[0189] As is shown in Table 52 above, each of the *Coix lacryma-jobi* ubiquitin EXP sequences provided expression that was greater than either constitutive control in both corn and wheat. Expression in corn protoplasts was relatively similar for all of the *Coix* ubiquitin EXP sequences. Expression in wheat was a little more variable. The use of different 3' end nucleotides following the intron/exon splice junction sequence, 5'-AG-3' did not appear to dramatically affect expression of GUS with the exception of GUS driven by EXP-Cl.Ubq1:1:20 (SEQ ID NO: 102). EXP-Cl.Ubq1:1:20 comprises the 3' end nucleotide sequences, 5'-GAC-3' following the intron/exon splice junction 5'-AG-3' sequence and caused expression to drop slightly relative to the other *Coix* ubiquitin EXP sequences. Assessment of the resulting spliced messenger RNA showed that approximately 10% of the mRNA expressed using EXP-Cl.Ubq1:1:20 (SEQ ID NO: 102) to drive GUS expression was improperly spliced. The mRNA resulting from GUS expression using the other *Coix* ubiquitin EXP sequences appeared to process properly. This experiment provides evidence that any of the 3' end nucleotides for any of the intron variants

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

presented in Table 2 of Example 1 with the exception of the 3' end sequence 5'-GAC-3' which is found associated only with the intron element, I-Cl.Ubq1-1:1:9 (SEQ ID NO: 103) should be suitable for use in transgene expression cassettes without significant loss of activity and processing.

**Example 16: Enhancers Derived from the Regulatory Elements.**

[0190] Enhancers are derived from the promoter elements provided herein, such as those presented as SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 and 135. The enhancer element may be comprised of one or more cis regulatory elements that, when operably linked 5' or 3' to a promoter element, or operably linked 5' or 3' to additional enhancer elements that are operably linked to a promoter, can enhance or modulate expression of a transgene, or provide expression of a transgene in a specific cell type or plant organ or at a particular time point in development or circadian rhythm. Enhancers are made by removing the TATA box or functionally similar elements and any downstream sequence from the promoters that allow transcription to be initiated from the promoters provided herein as described above, including fragments thereof, in which the TATA box or functionally similar elements and sequence downstream of the TATA box are removed. The enhancer element, E-Cl.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 89) which is derived from the promoter element, P-Cl.Ubq1-1:1:1 is provided herein to demonstrate enhancers derived from a promoter element.

[0191] Enhancer elements may be derived from the promoter elements provided herein and cloned using methods known in the art to be operably linked 5' or 3' to a promoter element, or operably linked 5' or 3' to additional enhancer elements that are operably linked to a promoter. Alternatively, enhancer elements are cloned, using methods known in the art, to be operably linked to one or more copies of the enhancer element which are operably linked 5' or 3' to a promoter element, or operably linked 5' or 3' to additional enhancer elements that are operably linked to a promoter. Enhancer elements can also be cloned to be operably linked 5' or 3' to a promoter element derived from a different genus organism, or operably linked 5' or 3' to additional enhancer elements derived from other genus organisms or the same genus organism that are operably linked to a promoter derived from either the same or different genus organism, resulting in a chimeric regulatory element. A GUS expression plant transformation vector is constructed using methods known in the art similar to the constructs described in the previous

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

examples in which the resulting plant expression vectors contain a right border region from *A. tumefaciens*, a first transgene cassette to test the regulatory or a chimeric regulatory element comprised of, a regulatory or chimeric regulatory element, operably linked to an intron derived from the HSP70 heat shock protein of *Z. mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1 SEQ ID NO: 144) or any of the introns presented herein or any other intron, operably linked to a coding sequence for  $\beta$ -glucuronidase (GUS) that either possesses a processable intron (GUS-2, SEQ ID NO: 160) or no intron (GUS-1, SEQ ID NO: 159), operably linked to the Nopaline synthase 3' UTR from *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 161) or the 3' UTR from the rice lipid transfer protein gene (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 175); a second transgene selection cassette used for selection of transformed plant cells that confers resistance to the herbicide glyphosate (driven by the rice Actin 1 promoter), or alternatively, the antibiotic kanamycin (driven by the rice Actin 1 promoter) and a left border region from *A. tumefaciens*. The resulting plasmids are used to transform corn plants or other genus plants by the methods described above or by other *Agrobacterium*-mediated or particle bombardment methods known in the art. Alternatively, protoplast cells derived from corn or other genus plants are transformed using methods known in the art to perform transient assays

[0192] GUS expression driven by the regulatory element comprising one or more enhancers is evaluated in stable or transient plant assays to determine the effects of the enhancer element on expression of a transgene. Modifications to one or more enhancer elements or duplication of one or more enhancer elements is performed based upon empirical experimentation and the resulting gene expression regulation that is observed using each regulatory element composition. Altering the relative positions of one or more enhancers in the resulting regulatory or chimeric regulatory element may affect the transcriptional activity or specificity of the regulatory or chimeric regulatory element and is determined empirically to identify the best enhancers for the desired transgene expression profile within the corn plant or other genus plant.

**Example 17: Analysis of Intron Enhancement of GUS Activity Using Plant Derived Protoplasts.**

[0193] An intron is selected based upon experimentation and comparison with an intronless expression vector control to empirically select an intron and configuration within the vector T-DNA element arrangement for optimal expression of a transgene. For example, in the expression of an herbicide resistance gene, such as CP4 which confers tolerance to glyphosate, it is desirable

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

to have transgene expression within the reproductive tissues as well as the vegetative tissues, to prevent the loss of yield when applying the herbicide. An intron in this instance would be selected upon its ability when operably linked to a constitutive promoter, to enhance expression of the herbicide resistance conferring transgene, particularly within the reproductive cells and tissues of the transgenic plant and thus providing both vegetative and reproductive tolerance to the transgenic plant, when sprayed with the herbicide. In most ubiquitin genes, the 5' UTR is comprised of a leader, which has an intron sequence embedded within it. The expression elements derived from such genes are therefore assayed using the entire 5' UTR comprising the promoter, leader, and intron. To achieve different expression profiles or to modulate the level of transgene expression, the intron from such an expression element may be removed or substituted with a heterologous intron.

[0194] Introns presented herein as SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182 are identified using genomic DNA contigs in comparison to expressed sequence tag clusters or cDNA contigs to identify exon and intron sequences within the genomic DNA. In addition, 5' UTR or leader sequences are also used to define the intron/exon splice junction of one or more introns under conditions when the gene sequence encodes a leader sequence that is interrupted by one or more introns. Introns are cloned using methods known in the art into a plant transformation vector to be operably linked 3' to a transcriptional regulatory element and leader fragment and operably linked 5' to either a second leader fragment or to coding sequences, for instance as depicted in the two transgene cassettes presented in FIG. 1.

[0195] Thus, for instance, a first possible transgene cassette (Transgene Cassette Configuration 1 in FIG. 8) is comprised of a promoter or chimeric promoter element [A], operably linked 5' to a leader element [B], operably linked 5' to a test intron element [C], operably linked to a coding region [D], which is operably linked to a 3' UTR element [E]. Alternatively, a second possible transgene cassette (Transgene Cassette Configuration 2 in FIG. 8) is comprised of a promoter or chimeric promoter element [F], operably linked 5' to a first leader element or first leader element fragment [G], operably linked 5' to a test intron element [H], operably linked 5' to a second leader element or first leader element second fragment [I], operably linked to a coding region [J], which is operably linked to a 3' UTR element [K]. Further, a third possible transgene cassette

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

(Transgene Cassette Configuration 3 in FIG. 8) is comprised of a promoter or chimeric promoter element [L], operably linked 5' to a leader element [M], operably linked 5' to a first fragment of the coding sequence element [N], operably linked 5' to an intron element [O] element, operably linked 5' to a second fragment of the coding sequence element [P], which is operably linked to a 3' UTR element [Q]. Transgene Cassette Configuration 3 is designed to allow splicing of the intron in such a manner as to produce a complete open reading frame without a frame shift between the first and second fragment of the coding sequence.

[0196] The first 6 nucleotides on the 5' end and the last 6 nucleotides on the 3' end of the introns presented as SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182 represent nucleotides before and after the intron/exon splice junction, respectively. These short 6 nucleotide sequences, for example, can be modified by having additional sequence appended (*i.e.* native or artificial) to facilitate cloning of the intron into a plant transformation vector, so long as the first and second nucleotides from the 5' end (GT) and the fourth and fifth nucleotide from the 3' end (AG) of SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182 are preserved, thus preserving the intron/exon splice junction of the intron. As discussed above, it may be preferable to avoid using the nucleotide sequence AT or the nucleotide A just prior to the 5' end of the splice site (GT) and the nucleotide G or the nucleotide sequence TG, respectively just after 3' end of the splice site (AG) to eliminate the potential of unwanted start codons from being formed during processing of the messenger RNA into the final transcript. The sequence around the 5' or 3' end splice junction sites of the intron can thus be modified.

[0197] The introns are assayed for an enhancement effect through the ability to enhance expression in transient assay or stable plant assay. For transient assay of intron enhancement, a base plant vector is constructed using methods known in the art. The intron is cloned into a base plant vector which comprises an expression cassette comprised of a constitutive promoter such as the Cauliflower mosaic virus promoter, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 176), operably linked 5' to a leader element, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 177), operably linked 5' to a test intron element (*e.g.* one of SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146,

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182), operably linked to a coding sequence for  $\beta$ -glucuronidase (GUS) that either possesses a processable intron (GUS-2, SEQ ID NO: 160) or no intron (GUS-1, SEQ ID NO: 159), operably linked to the Nopaline synthase 3' UTR from *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 161). Protoplast cells derived from corn or other genus plant tissue are transformed with the base plant vector and luciferase control vectors as described previously in Example 2 above and assayed for activity. To compare the relative ability of the intron to enhance expression, GUS values are expressed as a ratio of GUS to luciferase activity and compared with those levels imparted by a construct comprising the constitutive promoter operably linked to a known intron standard such as that as the intron derived from the HSP70 heat shock protein of *Zea mays*, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 178) as well as a construct comprising the constitutive promoter but without an intron operably linked to the promoter.

[0198] For stable plant assay of the introns presented as SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182, a GUS expression plant transformation vector is constructed similar to the constructs described in the previous examples in which the resulting plant expression vectors contains a right border region from *A. tumefaciens*, a first transgene cassette to test the intron comprised of a constitutive promoter such as the Cauliflower mosaic virus promoter, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 176), operably linked 5' to a leader element, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 177), operably linked 5' to a test intron element provided herein, operably linked to a coding sequence for  $\beta$ -glucuronidase (GUS) that either possesses a processable intron (GUS-2, SEQ ID NO: 160) or no intron (GUS-1, SEQ ID NO: 158), operably linked to the Nopaline synthase 3' UTR from *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 161); a second transgene selection cassette used for selection of transformed plant cells that confers resistance to glyphosate (driven by the rice Actin 1 promoter), or alternatively, the antibiotic kanamycin (driven by the rice Actin 1 promoter) and a left border region from *A. tumefaciens*. The resulting plasmids are used to transform corn plants or other genus plants by the methods described above or by *Agrobacterium*-mediated methods known in the art. Single-copy or low copy number transformants are selected for comparison to single-copy or low copy number transformed plants, transformed with a plant transformation vector identical to the test vector but without the test intron to determine if the test intron provides an intron mediated enhancement effect.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

[0199] Any of the introns presented as SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 and 182 can be modified in a number of ways, such as deleting fragments within the intron sequence, which may reduce expression or duplication of fragments with the intron that may enhance expression. In addition, sequences within the intron that may affect the specificity of expression to either particular cells types or tissues and organs can be duplicated or altered or deleted to affect expression and patterns of expression of the transgene. In addition, the introns provided herein can be modified to remove any potential start codons (ATG) that may cause unintentional transcripts from being expressed from improperly spliced introns as different, longer or truncated proteins. Once the intron has been empirically tested, or it has been altered based upon experimentation, the intron is used to enhance expression of a transgene in stably transformed plants that can be of any genus monocot or dicot plant, so long as the intron provides enhancement of the transgene. The intron can also be used to enhance expression in other organisms, such as algae, fungi or animal cells, so long as the intron provides enhancement or attenuation or specificity of expression of the transgene to which it is operably linked.

\* \* \* \* \*

[0200] Having illustrated and described the principles of the present invention, it should be apparent to persons skilled in the art that the invention can be modified in arrangement and detail without departing from such principles. We claim all modifications that are within the spirit and scope of the claims. All publications and published patent documents cited herein are hereby incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application is specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

**CLAIMS**

Claim 1. A DNA molecule comprising a DNA sequence selected from the group consisting of:

- a) a sequence with at least 85 percent sequence identity to any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183;
  - b) a sequence comprising any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183; and
  - c) a fragment of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183, wherein the fragment has gene-regulatory activity;
- wherein said sequence is operably linked to a heterologous transcribable polynucleotide molecule.

Claim 2. The DNA molecule of claim 1, wherein said sequence has at least 90 percent sequence identity to the DNA sequence of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183.

Claim 3. The DNA molecule of claim 1, wherein said sequence has at least 95 percent sequence identity to the DNA sequence of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183.

Claim 4. The DNA molecule of claim 1, wherein the DNA sequence comprises gene regulatory activity.

Claim 5. The DNA molecule of claim 1, wherein the heterologous transcribable polynucleotide molecule comprises a gene of agronomic interest.

Claim 6. The DNA molecule of claim 5, wherein the gene of agronomic interest confers herbicide tolerance in plants.

Claim 7. The DNA molecule of claim 5, wherein the gene of agronomic interest confers pest resistance in plants.

Claim 8. A transgenic plant cell comprising a heterologous DNA molecule comprising a sequence selected from the group consisting of:

- a) a sequence with at least 85 percent sequence identity to any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183;
- b) a sequence comprising any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183; and
- c) a fragment of any of SEQ ID NOs: 1-158 and 180-183, wherein the fragment has gene-regulatory activity;

WO 2012/134921

PCT/US2012/029990

wherein said sequence is operably linked to a heterologous transcribable polynucleotide molecule.

Claim 9. The transgenic plant cell of claim 8, wherein said transgenic plant cell is a monocotyledonous plant cell.

Claim 10. The transgenic plant cell of claim 8, wherein said transgenic plant cell is a dicotyledonous plant cell.

Claim 11. A transgenic plant, or part thereof, comprising the DNA molecule of claim 1.

Claim 12. A progeny plant of the transgenic plant of claim 11, or a part thereof, wherein the progeny plant or part thereof comprises said DNA molecule.

Claim 13. A transgenic seed, wherein the seed comprises the DNA molecule of claim 1.

Claim 14. A method of producing a commodity product comprising obtaining a transgenic plant or part thereof according to claim 11 and producing the commodity product therefrom.

Claim 15. The method of claim 14, wherein the commodity product is protein concentrate, protein isolate, grain, starch, seeds, meal, flour, biomass, or seed oil.

Claim 16. A commodity product comprising the DNA molecule of claim 1.

Claim 17. The commodity product of claim 16, wherein the commodity product is protein concentrate, protein isolate, grain, starch, seeds, meal, flour, biomass, or seed oil.

Claim 18. A method of expressing a transcribable polynucleotide molecule comprising obtaining a transgenic plant according to claim 11 and cultivating plant, wherein the transcribable polynucleotide is expressed.

**(57) Abstract:** The present invention provides novel DNA molecules and constructs, including their nucleotide sequences, useful for modulating gene expression in plants and plant cells. The invention also provides transgenic plants, plant cells, plant parts, seeds, and commodity products comprising the DNA molecules operably linked to heterologous transcribable polynucleotides, along with methods of their use.

WO 2012/134921

1 / 31

PCT/US2012/029990

```

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 AGCAGACTCGCATTATCGATGGAGGGGTGGGTTTAGAACCCCTGAAACCTGGTACTGTTTC
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 GAACGAAAAACACTGATGACACTTTTCGTTTGGTAAATATTCTTACTATGGT
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 CTAACTAGGCTCAAAAGATCGTCTCGAATGTACATCTAAATTATGCAATTAGTATT
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 TGTTTACCTGCATTTCATACCTCGAGCATGCGCTTTTGGTACATTAAATGCTTCGATGT
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 GATGGGAATTTTAAAAATTTGGAGAAAAGTTGGTTTCTAAACACCCCGAGGAGGAAAT
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 TGGATTGGTCTTTGACGCGGATGACAGCACTGCGAGTGGCAGGATACCATCTTAGCCGT
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

```

FIG. 1a

WO 2012/134921

2 / 31

PCT/US2012/029990

```

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 TCGGTGGAAGTTCGCTTTGCTAACGTTTGGAGAAATTAACACGCTTGGACCAACGTGA
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 GACGAGCGCTTACGTGGCAGTGTAAATGGACCGGCGACGCAAGTTTGAAGCTGTAGT
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 TTAGCCGCTCTCGTTACGTTTGGCACAACCTAGTTGAATCCGGCTTCCGGCAACATATAT
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 TTAGCCGCTCTCGTTACGTTTGGCACAACCTAGTTGAATCCGGCTTCCGGCAACATATAT
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 GGCAGTTAGACCAAGTGTGAGCCGCGCCACCGCAAGTATTGGGACATTATACGTAGGA
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 AGCAAGTGTATAATAAGAATATGAGATAATGTAGCAGCTATATGAATCATCAGTCTATA
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

P-ANDge.Ubql-1:1:9 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:8 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:11 TTTATGTTAAGATGAAGAGGATAGAATAAACGGTATGTAATTTATACGAGGTGATAGAC
P-ANDge.Ubql-1:1:12 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:13 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:14 -----
P-ANDge.Ubql-1:1:10 -----

```

FIG. 1b

**FIG. 1e**

**FIG. 1f**

**FIG. 1h**

FIG. 2b

WO 2012/134221
 12 / 31
PCT/US2012/029990

P-ERISA.Ubql:1:1:9  
 P-ERISA.Ubql:1:1:10  
 P-ERISA.Ubql:1:1:18  
 P-ERISA.Ubql:1:1:11  
 P-ERISA.Ubql:1:1:12  
 P-ERISA.Ubql:1:1:13

TGTGGAAATTCATCTAAATTTTGGAGTGAACATCAAACTAAATTTAAAAAAGGCAAT  
 TGTGGAAATTCATCTAAATTTTGGAGTGAACATCAAACTAAATTTAAAAAAGGCAAT  
 TGTGGAAATTCATCTAAATTTTGGAGTGAACATCAAACTAAATTTAAAAAAGGCAAT  
 TGTGGAAATTCATCTAAATTTTGGAGTGAACATCAAACTAAATTTAAAAAAGGCAAT  
 TGTGGAAATTCATCTAAATTTTGGAGTGAACATCAAACTAAATTTAAAAAAGGCAAT

P-ERISA.Ubql:1:1:9  
 P-ERISA.Ubql:1:1:10  
 P-ERISA.Ubql:1:1:18  
 P-ERISA.Ubql:1:1:11  
 P-ERISA.Ubql:1:1:12  
 P-ERISA.Ubql:1:1:13

ATTTTGTGGAGGACATGCGAAGAACTGTAATTTGGCGGGCACAACCGCCAAACGGGAG  
 ATTTTGTGGAGGACATGCGAAGAACTGTAATTTGGCGGGCACAACCGCCAAACGGGAG  
 ATTTTGTGGAGGACATGCGAAGAACTGTAATTTGGCGGGCACAACCGCCAAACGGGAG  
 ATTTTGTGGAGGACATGCGAAGAACTGTAATTTGGCGGGCACAACCGCCAAACGGGAG  
 ATTTTGTGGAGGACATGCGAAGAACTGTAATTTGGCGGGCACAACCGCCAAACGGGAG

P-ERISA.Ubql:1:1:9  
 P-ERISA.Ubql:1:1:10  
 P-ERISA.Ubql:1:1:18  
 P-ERISA.Ubql:1:1:11  
 P-ERISA.Ubql:1:1:12  
 P-ERISA.Ubql:1:1:13

ATTTGCCAGTACCATTAATAAATTCATGATAAATTCATGGTTGTTGCCAGTGGGGCTAG  
 ATTTGCCAGTACCATTAATAAATTCATGATAAATTCATGGTTGTTGCCAGTGGGGCTAG  
 ATTTGCCAGTACCATTAATAAATTCATGATAAATTCATGGTTGTTGCCAGTGGGGCTAG  
 ATTTGCCAGTACCATTAATAAATTCATGATAAATTCATGGTTGTTGCCAGTGGGGCTAG  
 ATTTGCCAGTACCATTAATAAATTCATGATAAATTCATGGTTGTTGCCAGTGGGGCTAG

P-ERISA.Ubql:1:1:9  
 P-ERISA.Ubql:1:1:10  
 P-ERISA.Ubql:1:1:18  
 P-ERISA.Ubql:1:1:11  
 P-ERISA.Ubql:1:1:12  
 P-ERISA.Ubql:1:1:13

GGTTCTCTCGGATGGTGGGGAATGGTTGGTTGGTCGACCACTGCAACTCAATCCGATG  
 GGTTCTCTCGGATGGTGGGGAATGGTTGGTTGGTCGACCACTGCAACTCAATCCGATG  
 GGTTCTCTCGGATGGTGGGGAATGGTTGGTTGGTCGACCACTGCAACTCAATCCGATG  
 GGTTCTCTCGGATGGTGGGGAATGGTTGGTTGGTCGACCACTGCAACTCAATCCGATG  
 GGTTCTCTCGGATGGTGGGGAATGGTTGGTTGGTCGACCACTGCAACTCAATCCGATG

P-ERISA.Ubql:1:1:9  
 P-ERISA.Ubql:1:1:10  
 P-ERISA.Ubql:1:1:18  
 P-ERISA.Ubql:1:1:11  
 P-ERISA.Ubql:1:1:12  
 P-ERISA.Ubql:1:1:13

CAAAGGGGCATCAATAGTCATTTTAGAAAGTTCTCTCCCGAGCAGTGGAAATGATTA  
 CAAAGGGGCATCAATAGTCATTTTAGAAAGTTCTCTCCCGAGCAGTGGAAATGATTA  
 CAAAGGGGCATCAATAGTCATTTTAGAAAGTTCTCTCCCGAGCAGTGGAAATGATTA  
 CAAAGGGGCATCAATAGTCATTTTAGAAAGTTCTCTCCCGAGCAGTGGAAATGATTA  
 CAAAGGGGCATCAATAGTCATTTTAGAAAGTTCTCTCCCGAGCAGTGGAAATGATTA

P-ERISA.Ubql:1:1:9  
 P-ERISA.Ubql:1:1:10  
 P-ERISA.Ubql:1:1:18  
 P-ERISA.Ubql:1:1:11  
 P-ERISA.Ubql:1:1:12  
 P-ERISA.Ubql:1:1:13

TTCTATTGGCGGATGTCACCGGCAACACCAACGAATTTGAATGGTACTAGGCAAA  
 TTCTATTGGCGGATGTCACCGGCAACACCAACGAATTTGAATGGTACTAGGCAAA  
 TTCTATTGGCGGATGTCACCGGCAACACCAACGAATTTGAATGGTACTAGGCAAA  
 TTCTATTGGCGGATGTCACCGGCAACACCAACGAATTTGAATGGTACTAGGCAAA  
 TTCTATTGGCGGATGTCACCGGCAACACCAACGAATTTGAATGGTACTAGGCAAA

FIG. 2d

WO 2012/134921 14 / 31 PCT/US2012/029990

P-Err1a.Usbl-1:1:9  
 P-Err1a.Usbl-1:1:10  
 P-Err1a.Usbl-1:1:11  
 P-Err1a.Usbl-1:1:11  
 P-Err1a.Usbl-1:1:12  
 P-Err1a.Usbl-1:1:13

TTTCAGAGTCCTTATTATATGTGCAGTGTTCGACAGCTAAATAGCTTGAGAGAGG  
 TTTCAGAGTCCTTATTATATGTGCAGTGTTCGACAGCTAAATAGCTTGAGAGAGG  
 TTTCAGAGTCCTTATTATATGTGCAGTGTTCGACAGCTAAATAGCTTGAGAGAGG  
 TTTCAGAGTCCTTATTATATGTGCAGTGTTCGACAGCTAAATAGCTTGAGAGAGG  
 TTTCAGAGTCCTTATTATATGTGCAGTGTTCGACAGCTAAATAGCTTGAGAGAGG

P-Err1a.Usbl-1:1:9  
 P-Err1a.Usbl-1:1:10  
 P-Err1a.Usbl-1:1:11  
 P-Err1a.Usbl-1:1:11  
 P-Err1a.Usbl-1:1:12  
 P-Err1a.Usbl-1:1:13

CTTAAACAAAAGCCTTTTCAAACGACCTTGAGCCAGTGTGGTGTATGGCCAAAATTTGAT  
 CTTAAACAAAAGCCTTTTCAAACGACCTTGAGCCAGTGTGGTGTATGGCCAAAATTTGAT  
 CTTAAACAAAAGCCTTTTCAAACGACCTTGAGCCAGTGTGGTGTATGGCCAAAATTTGAT  
 CTTAAACAAAAGCCTTTTCAAACGACCTTGAGCCAGTGTGGTGTATGGCCAAAATTTGAT  
 CTTAAACAAAAGCCTTTTCAAACGACCTTGAGCCAGTGTGGTGTATGGCCAAAATTTGAT

P-Err1a.Usbl-1:1:9  
 P-Err1a.Usbl-1:1:10  
 P-Err1a.Usbl-1:1:11  
 P-Err1a.Usbl-1:1:12  
 P-Err1a.Usbl-1:1:13

TGTCAAACTTAGGCAGCAGAAATTATAGCAGTATTGGTTGTGTACCAAAATTTGGC  
 TGTCAAACTTAGGCAGCAGAAATTATAGCAGTATTGGTTGTGTACCAAAATTTGGC  
 TGTCAAACTTAGGCAGCAGAAATTATAGCAGTATTGGTTGTGTACCAAAATTTGGC  
 TGTCAAACTTAGGCAGCAGAAATTATAGCAGTATTGGTTGTGTACCAAAATTTGGC  
 TGTCAAACTTAGGCAGCAGAAATTATAGCAGTATTGGTTGTGTACCAAAATTTGGC

\*\*\*\*\*  
 AATGATCTGTTCTTTGGCTTTCAACCGGTTTATCAGCGGTATCTACGATTATTCTCTC  
 AATGATCTGTTCTTTGGCTTTCAACCGGTTTATCAGCGGTATCTACGATTATTCTCTC  
 AATGATCTGTTCTTTGGCTTTCAACCGGTTTATCAGCGGTATCTACGATTATTCTCTC  
 AATGATCTGTTCTTTGGCTTTCAACCGGTTTATCAGCGGTATCTACGATTATTCTCTC  
 AATGATCTGTTCTTTGGCTTTCAACCGGTTTATCAGCGGTATCTACGATTATTCTCTC

P-Err1a.Usbl-1:1:9  
 P-Err1a.Usbl-1:1:10  
 P-Err1a.Usbl-1:1:11  
 P-Err1a.Usbl-1:1:12  
 P-Err1a.Usbl-1:1:13

TCACAGAACACTTATGTAATCAGGCAAAAGCCACCGCAGAGACAGGACAGTATTCTCACAA  
 TCACAGAACACTTATGTAATCAGGCAAAAGCCACCGCAGAGACAGGACAGTATTCTCACAA  
 TCACAGAACACTTATGTAATCAGGCAAAAGCCACCGCAGAGACAGGACAGTATTCTCACAA  
 TCACAGAACACTTATGTAATCAGGCAAAAGCCACCGCAGAGACAGGACAGTATTCTCACAA  
 TCACAGAACACTTATGTAATCAGGCAAAAGCCACCGCAGAGACAGGACAGTATTCTCACAA

P-Err1a.Usbl-1:1:9  
 P-Err1a.Usbl-1:1:10  
 P-Err1a.Usbl-1:1:11  
 P-Err1a.Usbl-1:1:12  
 P-Err1a.Usbl-1:1:13

ATGGCATGCCAAATATACTACCGTCAGTGAAGCCGTTTAACGGCGTCGACAAAGTCAAG  
 ATGGCATGCCAAATATACTACCGTCAGTGAAGCCGTTTAACGGCGTCGACAAAGTCAAG  
 ATGGCATGCCAAATATACTACCGTCAGTGAAGCCGTTTAACGGCGTCGACAAAGTCAAG  
 ATGGCATGCCAAATATACTACCGTCAGTGAAGCCGTTTAACGGCGTCGACAAAGTCAAG  
 ATGGCATGCCAAATATACTACCGTCAGTGAAGCCGTTTAACGGCGTCGACAAAGTCAAG

FIG. 2f

| WO 2012/134921                                                                                                                       | 15 / 31                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | PCT/US2012/029990 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| P-ER1ra.Ubql-1:1:9<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:10<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:8<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:11<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:12<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:13 | GGCCACCAACCCAGCAACCAACGGCTCAAGCTAGCCAGCAAGCAGACAGCGCCGAGACG<br>GGCCACCAACCCAGCAACCAACGGCTCAAGCTAGCCAGCAAGCAGACAGCGCCGAGACG<br>GGCCACCAACCCAGCAACCAACGGCTCAAGCTAGCCAGCAAGCAGACAGCGCCGAGACG<br>GGCCACCAACCCAGCAACCAACGGCTCAAGCTAGCCAGCAAGCAGACAGCGCCGAGACG<br>GGCCACCAACCCAGCAACCAACGGCTCAAGCTAGCCAGCAAGCAGACAGCGCCGAGACG<br>GGCCACCAACCCAGCAACCAACGGCTCAAGCTAGCCAGCAAGCAGACAGCGCCGAGACG<br>***** |                   |
| P-ER1ra.Ubql-1:1:9<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:10<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:8<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:11<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:12<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:13 | TTGACACCTTGGCGGGGATCTCTCTGGCCCCCTCGAGAGTTCCGCTCCACTCCAC<br>TTGACACCTTGGCGGGGATCTCTCTGGCCCCCTCGAGAGTTCCGCTCCACTCCAC<br>TTGACACCTTGGCGGGGATCTCTCTGGCCCCCTCGAGAGTTCCGCTCCACTCCAC<br>TTGACACCTTGGCGGGGATCTCTCTGGCCCCCTCGAGAGTTCCGCTCCACTCCAC<br>TTGACACCTTGGCGGGGATCTCTCTGGCCCCCTCGAGAGTTCCGCTCCACTCCAC<br>TTGACACCTTGGCGGGGATCTCTCTGGCCCCCTCGAGAGTTCCGCTCCACTCCAC<br>*****                         |                   |
| P-ER1ra.Ubql-1:1:9<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:10<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:8<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:11<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:12<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:13 | TGTTGGCGGTTTCCAAGTCGCTTCGCGCTCTGCTCTCTCACAGGCACGAACCGTC<br>TGTTGGCGGTTTCCAAGTCGCTTCGCGCTCTGCTCTCTCACAGGCACGAACCGTC<br>TGTTGGCGGTTTCCAAGTCGCTTCGCGCTCTGCTCTCTCACAGGCACGAACCGTC<br>TGTTGGCGGTTTCCAAGTCGCTTCGCGCTCTGCTCTCTCACAGGCACGAACCGTC<br>TGTTGGCGGTTTCCAAGTCGCTTCGCGCTCTGCTCTCTCACAGGCACGAACCGTC<br>TGTTGGCGGTTTCCAAGTCGCTTCGCGCTCTGCTCTCTCACAGGCACGAACCGTC<br>*****                         |                   |
| P-ER1ra.Ubql-1:1:9<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:10<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:8<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:11<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:12<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:13 | ACGGACCGGCAGCAGCGGGGATTCTTTCCCAACGCTCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCC<br>ACGGACCGGCAGCAGCGGGGATTCTTTCCCAACGCTCTTCCTTTCCCTTCCTCGCC<br>ACGGACCGGCAGCAGCGGGGATTCTTTCCCAACGCTCTTCCTTTCCCTTCCTCGCC<br>ACGGACCGGCAGCAGCGGGGATTCTTTCCCAACGCTCTTCCTTTCCCTTCCTCGCC<br>ACGGACCGGCAGCAGCGGGGATTCTTTCCCAACGCTCTTCCTTTCCCTTCCTCGCC<br>ACGGACCGGCAGCAGCGGGGATTCTTTCCCAACGCTCTTCCTTTCCCTTCCTCGCC<br>*****                  |                   |
| P-ER1ra.Ubql-1:1:9<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:10<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:8<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:11<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:12<br>P-ER1ra.Ubql-1:1:13 | CGCCGTTTAAATAGCCAGCCCATCCCAAGCTTCTCTCCCC<br>CGCCGTTTAAATAGCCAGCCCATCCCAAGCTTCTCTCCCC<br>CGCCGTTTAAATAGCCAGCCCATCCCAAGCTTCTCTCCCC<br>CGCCGTTTAAATAGCCAGCCCATCCCAAGCTTCTCTCCCC<br>CGCCGTTTAAATAGCCAGCCCATCCCAAGCTTCTCTCCCC<br>CGCCGTTTAAATAGCCAGCCCATCCCAAGCTTCTCTCCCC<br>*****                                                                                                                   |                   |

FIG. 2g

| WO 2012/134921                                        | 16 / 31                                                                      | PCT/US2012/029990 |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>ACTGCCGGACACGCTCACTGCGGGAGGCTCCGAGCGCTCTCTCCCGGCGCGCGC<br>-----     |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGGAATAGAGAAAGAGAGGAAAGAGAGAGATAGCG<br>-----    |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>CAAGAGCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGCTGTGTGATTAGAGACCACTAATCCCTC<br>-----   |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>CATCTCTTAATGACGGGTGCCAAGACCACTGCCGGGCACACAGCGCTCAAGTGAAC<br>-----   |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>TTCGCTAACCTTCGCGTCATTGCGCTGAAGAATGTCTATGTGGGAGGCGCCCTCTCA<br>-----  |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>GTAGATTGCCAATGCTACGCTGCGCACTCTTCATGATGATGCTCCGCTCATCCCG<br>-----    |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>TTTCTCACACAGATAGACACAGTAAAGCTCACTAAAGCAGCATGTGTAGAACCTTAA<br>-----  |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>-----GCCGTTTTGAAGTATCCAGGA<br>-----                                 |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>TTAGAACTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCTGTGGTAACTTTCTCTTT<br>----- |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>TGGCGCTTCTTAATCTCGCGCGTCTGTCATGCTTAGGCCTAGGCAGAGATAGAGC<br>-----    |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>CGGGGTGAATGGGCTAAAGCTCAGCTGCTGAGGGGCGTGGGCTGGTTTCACTAGC<br>-----    |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | -----<br>CTACAGCTGTGCCAGTGTGCGCGCGCAAGCCGAAGCAAGCAGCTGAGCGTGTGACAG<br>-----  |                   |

FIG. 3a

| WO 2012/134921                                        | 17 / 31                                                                                                                           | PCT/US2012/029990 |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | CTTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACAGGTAACGCGCCTGTAACTACTCGTGGCC<br>CTTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACAGGTAACGCGCCTGTAACTACTCGTGGCC<br>-----   |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | ATCATCAACGAGACGCTCCGCTAGGCGAGACACGGGTAATGACACGACGACCCAGGC<br>ATCATCAACGAGACGCTCCGCTAGGCGAGACACGGGTAATGACACGACGACCCAGGC<br>-----   |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | GCGCGCGCTAGCGGAGCACGCTAGGTGACACGGGCTGTGTAGCGTTCCGAGTTGAAGG<br>GCGCGCGCTAGCGGAGCACGCTAGGTGACACGGGCTGTGTAGCGTTCCGAGTTGAAGG<br>----- |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | GGTTAAGCGCAGAAACAGTGTGTGGCGAGGTTATGAACATACAAAATATTACACAGA<br>GGTTAAGCGCAGAAACAGTGTGTGGCGAGGTTATGAACATACAAAATATTACACAGA<br>-----   |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | AAGAATGGAAGTATGGAGTGTCTAGTGTAAATGCCAAGCAGGAACCTACGCGCGCTA<br>AAGAATGGAAGTATGGAGTGTCTAGTGTAAATGCCAAGCAGGAACCTACGCGCGCTA<br>-----   |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | ACATCCACAGGCAACAGCTGACGCTGCGCGTACGAGAGACATCGAACAACCTGTGATT<br>ACATCCACAGGCAACAGCTGACGCTGCGCGTACGAGAGACATCGAACAACCTGTGATT<br>----- |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | GGTGGAGCGGCGAGTATGCGCCCCAGCACGCGCGAGGTGGTGGTGGCGGCTGGCTGCT<br>GGTGGAGCGGCGAGTATGCGCCCCAGCACGCGCGAGGTGGTGGTGGCGGCTGGCTGCT<br>----- |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | GCTTCGCGGCTCGGGCAACTTGAACCTGGGCGCACGCGCTGTGCAACTGCAACCGG<br>GCTTCGCGGCTCGGGCAACTTGAACCTGGGCGCACGCGCTGTGCAACTGCAACCGG<br>-----     |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | TTGGCGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCGCGGTAGATCCAGAATGTTGCGCTGG<br>TTGGCGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCGCGGTAGATCCAGAATGTTGCGCTGG<br>-----   |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | GCTTGATTACATAACATGGGCTGAAGCTCTAAACGACGCGCGGTACCGGGCGAT<br>GCTTGATTACATAACATGGGCTGAAGCTCTAAACGACGCGCGGTACCGGGCGAT<br>-----         |                   |

FIG. 3b

| WO 2012/134921                                        | 18 / 31                                                                                                                                                                             | PCT/US2012/029990 |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | GGAAAGAGACGGATCTCTCTGTGAATTTGAAAGCCACAGAGAGGACCCACACC<br>GGAAAGAGACGGATCTCTCTGTGAATTTGAAAGCCACAGAGAGGACCCACACC<br>GGAAAGAGACGGATCTCTCTGTGAATTTGAAAGCCACAGAGAGGACCCACACC<br>-----    |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | GACGCGGAGAGTCTGCGTGTCCAAACAGGCGCGCGGCTGGGCTGACCTTAACCA<br>GACGCGGAGAGTCTGCGTGTCCAAACAGGCGCGCGGCTGGGCTGACCTTAACCA<br>GACGCGGAGAGTCTGCGTGTCCAAACAGGCGCGCGGCTGGGCTGACCTTAACCA<br>----- |                   |
| P-Sv.Ubql-1:1:2<br>P-Sv.Ubql-1:1:1<br>P-Sv.Ubql-1:1:3 | GCAAGGACGCGCAGACCGCGCTCGCCTCGAGGCATAAATACCTCCATCC<br>GCAAGGACGCGCAGACCGCGCTCGCCTCGAGGCATAAATACCTCCATCC<br>GCAAGGACGCGCAGACCGCGCTCGCCTCGAGGCATAAATACCTCCATCC<br>-----                |                   |

FIG. 3c

| WO 2012/134921                                                                   | 19 / 31                                                                                                                                                                                                                                                                        | PCT/US2012/029990 |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | GTGCTGCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCAITGCACTGTCTAAAGTATAAAAAATTACACA<br>GTGCTGCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCAITGCACTGTCTAAAGTATAAAAAATTACACA<br>GTGCTGCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCAITGCACTGTCTAAAGTATAAAAAATTACACA<br>*****                                                                             |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TA-----TTTTTGTGCACACT--TATTGAAGTGTAGTTTATCTATCTCTATACATATATTT<br>TA-----TTTTTGTGCACACT--TATTGAAGTGTAGTTTATCTATCTCTATACATATATTT<br>TATTTTTTTTTGTGCACACTGTGTGTTGAAGTGCAGTTATCTATCTCTATACATATATTT<br>TA-----TTTTTGTGCACACT--TGTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATACATATATTT<br>* * *****   |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | AAACTTTCACCTCTACAAATAATATAGTCTATAATCTAAAAATAATTAGTGTTTAGAGG<br>AAACTTTCACCTCTACAAATAATATAGTCTATAATCTAAAAATAATTAGTGTTTAGAGG<br>AAACTTTCATATATGAATAATATAGTCTATAGTATAAAAATAATCAATGTTTATGATG<br>AAACTTTCATCTACGAATAATATATCTATAGTACTACAAATAATATCATGTGTTTAGAGA<br>*****              |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | ATCATATAAATAAAGTCTAGACATGGTCTAAAGGATAATTGAATATTTTGACAA-----<br>ATCATATAAATAAAGTCTAGACATGGTCTAAAGGATAATTGAATATTTTGACAA-----<br>ATTATATAAGTCAAGTCTAGACATGGTCTAAAGGACAACGAGATTTTTCACAAACATGA<br>ATCATATAAAGTCAAGTCTAGACATGGTCTAAAGGACAATAGATATTTTGACAAACGGA<br>* * *****          |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | -TCTACAGTTTATCTTTTATGTGTGCATGTGATCTCTGTGTTTTTTTGCAAATAGCTT<br>-TCTACAGTTTATCTTTTATGTGTGCATGTGATCTCTGTGTTTTTTTGCAAATAGCTT<br>CTCTACAGTTTATCTTTTATGTGTGCATGTGATCTCTGTGTTTTTTTGCAAATAGCTT<br>CTCTACAGTTTATCTTTTATGTGTGCATGTGATCTCTGTGTTTTTTTGCAAATAGCTT<br>*****                  |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | GACCTATATATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTGATGG<br>GACCTATATATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTGATGG<br>GACCTATATATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTT<br>GACCTATATATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTAATGG<br>*****                                |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TTTTCTATAGATCAA-----TTTTTAGTACATCAITTTATCT--TTTTAGTCTCTAAATTTT<br>TTTTCTATAGATCAA-----TTTTTAGTACATCAITTTATCT--TTTTAGTCTCTAAATTTT<br>-----ACTAAA-----TTTTTAGTACATCAITTTATCTATTTAGCTCTCTAAA--TTAA<br>TTTTTATAGATCAA-----TTTTTAGTACATCAITTTATCTATTTAGCTCTCTAAA--TTAA<br>* * ***** |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TAAACTTAAACTCTATTTTAG--TTTTTATTTTAAATAATTAGATATAAAATGAATAAAA<br>TAAACTTAAACTCTATTTTAG--TTTTTATTTTAAATAATTAGATATAAAATGAATAAAA<br>GAAACTTAAACTCTATTTTAG--TTTTTATTTTAAATAATTAGATATAAAATGAATAAAA<br>GAAACTTAAACTCTATTTTAGTTTTTATTTTAAATAATTAGATATAAAATGAATAAAA<br>*****            |                   |

FIG. 4a

| WO 2012/134921                                                                   | 20 / 31                                                                                                                                                                                                                                                           | PCT/US2012/029990 |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | ATAAATTGACTACAAATAAAACAATACCCCTTAAGAAA--TAAAAAACTAAGCAAAACAT<br>ATAAATTGACTACAAATAAAACAATACCCCTTAAGAAA--TAAAAAACTAAGCAAAACAT<br>ATAAAGTGACTAAAAAATACTAAATACCTTTTAAGAAA--TAAAAAACTAAGGAACAT<br>ATAAAGTGACTAAAAAATAAACAATACCCCTTAAGAAA--TAAAAAACTAAGGAACAT<br>***** |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCGCTGACGAGTCTAACGGAC<br>TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCGCTGACGAGTCTAACGGAC<br>TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCGCTGACGAGTCTAACGGAC<br>TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCGCTGACGAGTCTAACGGAC<br>***** |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | ACCAACACAGCGAACACAGCGCTCGCTCGGGCAGCGAAGCAGACGGCAGCGCATCTC<br>ACCAACACAGCGAACACAGCGCTCGCTCGGGCAGCGAAGCAGACGGCAGCGCATCTC<br>ACCAACACAGCGAACACAGCGCTCGCTCGGGCAGCGAAGCAGACGGCAGCGCATCTC<br>ACCAACACAGCGAACACAGCGCTCGCTCGGGCAGCGAAGCAGACGGCAGCGCATCTC<br>*****         |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TGTAGCTGCCCTTGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTGCTCCGCTGT<br>TGTAGCTGCCCTTGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTGCTCCGCTGT<br>TGTAGCTGCCCTTGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTGCTCCGCTGT<br>TGTAGCTGCCCTTGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTGCTCCGCTGT<br>* * ***** |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | CGGATCCAGAAATTCGTGGCGGACGGCAGACGTGAGCGGCGACGGCAGCGGCCCTCT<br>CGGATCCAGAAATTCGTGGCGGACGGCAGACGTGAGCGGCGACGGCAGCGGCCCTCT<br>CGGATCCAGAAATTCGTGGCGGACGGCAGACGTGAGCGGCGACGGCAGCGGCCCTCT<br>CGGATCCAGAAATTCGTGGCGGACGGCAGACGTGAGCGGCGACGGCAGCGGCCCTCT<br>*****         |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TCCTCCTCTCACGGCACCGCACTACGGGGATTTCCTTCCACCGCTCTTCGCTTTC<br>TCCTCCTCTCACGGCACCGCACTACGGGGATTTCCTTCCACCGCTCTTCGCTTTC<br>-CTCCTCTCTCACGGCACCGCACTACGGGGATTTCCTTCCACCGCTCTTCGCTTTC<br>TCCTCCTCTCACGGCACCGCACTACGGGGATTTCCTTCCACCGCTCTTCGCTTTC<br>*****                |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | CTTCTCTCGCCCGCTAATAATAGACACCTCTCCACACCTCTTCTCCCAACTGT<br>CTTCTCTCGCCCGCTAATAATAGACACCTCTCCACACCTCTTCTCCCAACTGT<br>CTTCTCTCGCCCGCTAATAATAGACACCTCTCCACACCTCTTCTCCCAACTGT<br>CTTCTCTCGCCCGCTAATAATAGACACCTCTCCACACCTCTTCTCCCAACTGT<br>*****                         |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | GTTCGTTTCGAGGCGCACACACGCAACAGATCTCCCCCAATCCAGCGCTGGACACT<br>GTTCGTTTCGAGGCGCACACACGCAACAGATCTCCCCCAATCCAGCGCTGGACACT<br>GTTCGTTTCGAGGCGCACACACGCAACAGATCTCCCCCAATCCAGCGCTGGACACT<br>GTTCGTTTCGAGGCGCACACACGCAACAGATCTCCCCCAATCCAGCGCTGGACACT<br>*****             |                   |

FIG. 4b

| WO 2012/134921                                                                   | 21 / 31                                                                                                                                                                                                                                                       | PCT/US2012/029990 |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | CGGCTCAAGGTACGGCGCTCATCTCCCGCCCCCTCTCTCTACCTCTCTAGATCGG<br>CGGCTCAAGGTACGGCGCTCATCTCCCGCCCCCTCTCTCTACCTCTCTAGATCGG<br>CGGCTCAAGGTACGGCGCTCATCTCCCGCCCCCTCTCTCTACCTCTCTAGATCGG<br>CGGCTCAAGGTACGGCGCTCATCTCCCGCCCCCTCTCTCTACCTCTCTAGATCGG<br>*****             |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | CGATCGGCTCATGGTTAGGGCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTAGACGA<br>CGATCGGCTCATGGTTAGGGCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTAGACGA<br>CGTTCGTGCTCATGGTTAGGGCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTAGACG<br>CGTTCGTGCTCATGGTTAGGGCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTAGACG<br>* * ***** |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | AACAAGTTCATGTT-----CATGTTTGTGAT<br>AACAAGTTCATGTT-----CATGTTTGTGAT<br>--CGTGTGTTGTGTAGATCGGTGCTGATAGTTCTGACAGGATCGGACCTGATCATCA<br>--CGTGTGTTGTGTAGATCGGTGCTGATAGTTCTGACAGGATCGGACCTGATCATCA<br>* * * * *                                                     |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | GATGTGCTCTGTTG-----GGCGTCTGTTCTAGATCGAG-----TAGGATACGTGTT<br>GATGTGCTCTGTTG-----GGCGTCTGTTCTAGATCGAG-----TAGGATACGTGTT<br>GATGTGCTCTGATGCTAACTGCGAGTGTCTCTTGTGGGAATCTGGGA--TGGCT<br>GACAGCTTCTGATGCTAACTGCGAGTGTCTCTTGTGGGAATCTGGGA--TGGCT<br>* * * * *       |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | CAAGCT-----ACCTGGTGGATT-----ATTAAATTTGTATCTGTATGT-----<br>CAAGCT-----ACCTGGTGGATT-----ATTAAATTTGTATCTGTATGT-----<br>CTAGCGGTTCCGAGAGCGGATCGATTTCTAGATTTTGTGTTCTGCTAGAGGTT<br>CTAGCGGTTCCGAGAGCGGATCGATTTCTAGT-ATTTTTGTGTTCTGCTAGAGGTT<br>* * * * *            |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | --GTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAAGATGATGGATGGAATATCGATCA<br>--GTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAAGATGATGGATGGAATATCGATCA<br>TGGTTTGGCTTTTCCTTTAT-----TTCAATAT-----ATGC-----<br>TGGTTTGGCTTTTCCTTTAT-----TTCAATAT-----ATGC-----<br>* * * * *                 |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | GGATAGGTATACATGTTGATGGGGT--TTTACTGATGATATACAGAGATGCTTTTTTT<br>GGATAGGTATACATGTTGATGGGGT--TTTACTGATGATATACAGAGATGCTTTTTTT<br>-----GTGACATGTTTGT--CGGGTCACTGTTTCAAG-----TTTTTT<br>-----GTGACATGTTTGT--CGGGTCACTGTTTCAAG-----TTTTTT<br>* * * * *                 |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | CTCCCTTGTTGTTGATGATGTTGTTGGTGGGCTGCTCTAGATCGGAGTAGAATAC<br>CTCCCTTGTTGTTGATGATGTTGTTGGTGGGCTGCTCTAGATCGGAGTAGAATAC<br>TTGGCTTGTTGTTGATGATGTTGTTGGTGGGCTGCTCTAGATCGGAGTAGAATAC<br>TTGCTTGTTGTTGATGATGTTGTTGGTGGGCTGCTCTAGATCGGAGTAGAATAC<br>* * *****          |                   |

FIG. 4c

| WO 2012/134921                                                                   | 22 / 31                                                                                                                                                                                                                                                                 | PCT/US2012/029990 |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TGTTTCAAACCTACCTGGTGAATTTATTAAGGATTAAGGCGTCTCTAGATCGGAGTAGA<br>TGTTTCAAACCTACCTGGTGAATTTATTAAGGATTAAGGCGTCTCTAGATCGGAGTAGA<br>TGTTTCAAACCTACCTGGTGAATTTATTA-----<br>TGTTTCAAACCTACCTGGTGAATTTATCT-----<br>*****                                                         |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | ATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGAATTTATTAAGGATCTGTATGTATGTC--TACATC<br>ATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGAATTTATTAAGGATCTGTATGTATGTC--TACATC<br>-----AGATCTGTATGTATGTCATATC<br>-----TTTGGATCTGTATGTATGTCATACATA<br>*****                                                                  |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TTCATAGTTACGAGTTTAAAGATGATGATGGAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT<br>TTCATAGTTACGAGTTTAAAGATGATGATGGAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT<br>TTCATAGTTACGAGTTTAAAGATGATGATGGAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT<br>TTCATAGTTACGAGTTTAAAGATGATGATGGAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT<br>*****       |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TGATCGGGGTTTACTGATGATATACAGAGATGCTTTT--TTCCGTTGTTGTGATGAT<br>TGATCGGGGTTTACTGATGATATACAGAGATGCTTTT--TTCCGTTGTTGTGATGAT<br>TGATCGGGGTTTACTGATGATATACAGAGATGCTTTT--TTCCGTTGTTGTGATGAT<br>TGATCGGGGTTTACTGATGATATACAGAGATGCTTTT--TTCCGTTGTTGTGATGAT<br>*****               |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | GTGTTCTGTTTGGGCG-----TCGTTCTAGATCGGATAGAACTGTTTCAAACCT<br>GTGTTCTGTTTGGGCG-----TCGTTCTAGATCGGATAGAACTGTTTCAAACCT<br>GTGTTCTGTTTGGGCG-----TCGTTCTAGATCGGATAGAACTGTTTCAAACCT<br>GTGTTCTGTTTGGGCG-----TCGTTCTAGATCGGATAGAACTGTTTCAAACCT<br>*****                           |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | ACCTGGTGGATTTATTAATTTTGTATCTTTATGTTGTGCTACATACCTCTCATAGTTACG<br>ACCTGGTGGATTTATTAATTTTGTATCTTTATGTTGTGCTACATACCTCTCATAGTTACG<br>ACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTTGT--CATACCTCTCATAGTTACG<br>ACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTTGTGCTACATACCTCTCATAGTTACG<br>*****     |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | AGTTTAAAGATGATGATGGAATATGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGGGTTT<br>AGTTTAAAGATGATGATGGAATATGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGGGTTT<br>-----GATGATGGAATATGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGGGTTT<br>AGTTTAA--GATGATGGAATATGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGGGTTT<br>*****                           |                   |
| EXP-2m. UbqM1:1:2<br>EXP-2m. UbqM1:1:5<br>EXP-2m. UbqM1:1:1<br>EXP-2m. UbqM1:1:4 | TACGATGATATACATGATGGCATATGCGGATCTATTCTATGCTCTAACCTTACGTTAGTA<br>TACGATGATATACATGATGGCATATGCGGATCTATTCTATGCTCTAACCTTACGTTAGTA<br>TACTGATGATATACATGATGGCATATGCGGATCTATTCTATGCTCTAACCTTACGTTAGTA<br>TACTGATGATATACATGATGGCATATGCGGATCTATTCTATGCTCTAACCTTACGTTAGTA<br>***** |                   |

FIG. 4d

| WO 2012/134921                                                                   | PCT/US2012/029990                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 23 / 31                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| EXP-2m, UbqM1:1:2<br>EXP-2m, UbqM1:1:5<br>EXP-2m, UbqM1:1:1<br>EXP-2m, UbqM1:1:4 | CCTATCTATTATAATAACAAGTAGTGTITTTATAAATTATTTGATCTTGATATACTTGGAT<br>CCTATCTATTATAATAACAAGTAGTGTITTTATAAATTATTTGATCTTGATATACTTGGAT<br>CCTATCTATTATAATAACAAGTAGTGTITTTATAAATTATTTGATCTTGATATACTTGGAT<br>CCTATCTATTATAATAACAAGTAGTGTITTTATAAATTATTTGATCTTGATATACTTGGAT<br>***** |
| EXP-2m, UbqM1:1:2<br>EXP-2m, UbqM1:1:5<br>EXP-2m, UbqM1:1:1<br>EXP-2m, UbqM1:1:4 | GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGA-TTTTTAGCCCTGCCCTTCATACGCATTATTAT<br>GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGA-TTTTTAGCCCTGCCCTTCATACGCATTATTAT<br>GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTITTTAGCCCTGCCCTTCATACGCATTATTAT<br>GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTITTTAGCCCTGCCCTTCATACGCATTATTAT<br>***** |
| EXP-2m, UbqM1:1:2<br>EXP-2m, UbqM1:1:5<br>EXP-2m, UbqM1:1:1<br>EXP-2m, UbqM1:1:4 | TTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTCCGATGCTACCCGTGTTGTGGTGATACCTTCTGCGAG<br>TTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTCCGATGCTACCCGTGTTGTGGTGATACCTTCTGCGAG<br>TTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGT-CGATGCTACCCGTGTTGTGGTGATACCTTCTGCGAG<br>TTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGT-CGATGCTACCCGTGTTGTGGTGATACCTTCTGCGAG<br>*****     |

FIG. 4e

| WO 2012/134921                       | PCT/US2012/029990                                                                                                                           |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 24 / 31                              |                                                                                                                                             |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | -----<br>CATTAAGAAGTCATTATGTGCATGCGTCGTAACATACATGGATAATGTTCGTCACATCTC<br>-----                                                              |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | -----CACTAGCTGGCGATGATAAAGCCACAAGCCAAATTAATTATTATGGGTGAGAATA<br>CTCGCACTAGCTGGCGATGATAAAGCCACAAGCCAAATTAATTATTATGGGTGAGAATA<br>*****        |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | AATACGTACCGACACCGGCCATAGAAAAGTACATTATTAAGGTCTAATTGGGAACAG<br>AATACGTACCGACACCGGCCATAGAAAAGTACATTATTAAGGTCTAATTGGGAACAG<br>*****             |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | TCGAAAAACGAGTGGCTCGAGAGTAAATGTAATTTTGGCCACTAAACCATTAATCAA<br>TCGAAAAACGAGTGGCTCGAGAGTAAATGTAATTTTGGCCACTAAACCATTAATCAA<br>*****             |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | CTAATTCATTCAATAACAGTATTATTAGAAAAATGATAGCTGCTCTAAAAAACAGTTTA<br>CTAATTCATTCAATAACAGTATTATTAGAAAAATGATAGCTGCTCTAAAAAACAGTTTA<br>*****         |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | GA AAAACAGTCAAAAATAATTCGACCAACAAACAGTTTAATAAGGTTCATTAAATATATAAT<br>GA AAAACAGTCAAAAATAATTCGACCAACAAACAGTTTAATAAGGTTCATTAAATATATAAT<br>***** |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | GCACGGTGCTATTGTATCTTTTAAAGGAAAAAGAGGAATAGTCGTGGGCGCCAGCGGGGA<br>GCACGGTGCTATTGTATCTTTTAAAGGAAAAAGAGGAATAGTCGTGGGCGCCAGCGGGGA<br>*****       |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | ATTGGGCGCGGGAGTCTGCGCGAGCAGCGCTTCCGCTCGAACGGCGGACCGGAGCAGG<br>ATTGGGCGCGGGAGTCTGCGCGAGCAGCGCTTCCGCTCGAACGGCGGACCGGAGCAGG<br>*****           |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | CCCCCGCGCCCGCCAGCTCAGCAAGCCGCTCGGTGGTGGTAATCTGGCGGGTACACCA<br>CCCCCGCGCCCGCCAGCTCAGCAAGCCGCTCGGTGGTGGTAATCTGGCGGGTACACCA<br>*****           |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | GCCGTCCCTTGGGCGGCCCTCACAGCACTGGGCTCACAGTGAGTTTGTCTGGGCTTC<br>GCCGTCCCTTGGGCGGCCCTCACAGCACTGGGCTCACAGTGAGTTTGTCTGGGCTTC<br>*****             |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | GGATCGACCATATGGGCTCGGCATCAGAAAGACGGGCGCGTCTGGGATAGAAAGAC<br>GGATCGACCATATGGGCTCGGCATCAGAAAGACGGGCGCGTCTGGGATAGAAAGAC<br>*****               |

FIG. 5a

| WO 2012/134921                       | PCT/US2012/029990                                                                                                               |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 25 / 31                              |                                                                                                                                 |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | AGGAACCTCCTCGTGATTCCAGAAGCCAGCCAGCAGCGACCCAGCGCGGAGGATACT<br>AGGAACCTCCTCGTGATTCCAGAAGCCAGCCAGCAGCGACCCAGCGCGGAGGATACT<br>***** |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | CGTCGTCCAAAGTCCAAACAGCGCGGCGGCGGCGGAGCGCTGTGGCTTAACTGGCT<br>CGTCGTCCAAAGTCCAAACAGCGCGGCGGCGGCGGAGCGCTGTGGCTTAACTGGCT<br>*****   |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | AACCTTAACCTCCAAGGCAAGCCAAAGCCCGCTTCCACCCCGACATAAATATCCCCC<br>AACCTTAACCTCCAAGGCAAGCCAAAGCCCGCTTCCACCCCGACATAAATATCCCCC<br>***** |
| P-Sb, Ubq6-1:1:2<br>P-Sb, Ubq6-1:1:1 | ATCCAGGCAAGGCGC<br>ATCCAGGCAAGGCGC<br>*****                                                                                     |

FIG. 5b

| WO 2012/134921                                                                           | PCT/US2012/029990                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 26 / 31                                                                                  |                                                                                                                                                |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | ACTGCCCGGACACGCCCTCACTGGCGGGAGGGCTCGGAGCGCTCTCTCCCGGCGGCCGC<br>-----<br>ACTGCCCGGACACGCCCTCACTGGCGGGAGGGCTCGGAGCGCTCTCTCCCGGCGGCCGC<br>-----   |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGAGAATAGAGGAAGAGGAGGAAAAAGGAGAGATAGCG<br>-----<br>GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGAGAATAGAGGAAGAGGAGGAAAAAGGAGAGATAGCG<br>-----     |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | CAAAAGSCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGCGTGGTGGATTAGAGGACCACTAATCCCTC<br>-----<br>CAAAAGSCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGCGTGGTGGATTAGAGGACCACTAATCCCTC<br>-----   |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | CATCTCCTAATGACCGGTCGCCAAGACAGTCGCGCGGACACACAGCTCTAAGTGAAC<br>-----<br>CATCTCCTAATGACCGGTCGCCAAGACAGTCGCGCGGACACACAGCTCTAAGTGAAC<br>-----       |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | TTCCGCTAACCTTCCGGTCAATTGCGGCTGAAAGATGTCATGTGGCGAGGCCCTCTCA<br>-----<br>TTCCGCTAACCTTCCGGTCAATTGCGGCTGAAAGATGTCATGTGGCGAGGCCCTCTCA<br>-----     |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | GTAGATTGCCAACTGCCTACCGTGCACCTTCCATGCATGATTGCTCCGCTATCCCG<br>-----<br>GTAGATTGCCAACTGCCTACCGTGCACCTTCCATGCATGATTGCTCCGCTATCCCG<br>-----         |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | TTTCTCACACAGATAGACAAAGATAAGCATCACTAAGCAAGCATGTGTAGAACCTTAA<br>-----<br>TTTCTCACACAGATAGACAAAGATAAGCATCACTAAGCAAGCATGTGTAGAACCTTAA<br>-----     |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | AAAAAGGCTTATACCTACCGATACCTATCAACCAGCATGCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA<br>-----<br>AAAAAGGCTTATACCTACCGATACCTATCAACCAGCATGCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA<br>----- |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCGGTGAACCTTTCTCTTT<br>-----<br>TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCGGTGAACCTTTCTCTTT<br>-----     |
| P-SET1t, Ubq1-1:1:4<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:3<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:1<br>P-SET1t, Ubq1-1:1:2 | TGCGCTTGCTTAATCTCGGCGGTGCTGCTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC<br>-----<br>TGCGCTTGCTTAATCTCGGCGGTGCTGCTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC<br>-----   |

FIG. 6a

| WO 2012/134921                                                                           | 27 / 31                                                                                                                                                                                               | PCT/US2012/029990 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC<br>CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC<br>CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC             |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | CTACAGCTGTGCGACGTGCGGGCGCGCAAGCGGAAGCAGCAGCTGAGCGTTTGGACAG<br>CTACAGCTGTGCGACGTGCGGGCGCGCAAGCGGAAGCAGCAGCTGAGCGTTTGGACAG<br>CTACAGCTGTGCGACGTGCGGGCGCGCAAGCGGAAGCAGCAGCTGAGCGTTTGGACAG                |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | CTTGTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACAGCTAACTGGCCCTGTAACCTACTGTTTGAGCC<br>CTTGTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACAGCTAACTGGCCCTGTAACCTACTGTTTGAGCC<br>CTTGTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACAGCTAACTGGCCCTGTAACCTACTGTTTGAGCC |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | ATCATCAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACAGGGTAAATGCAGCGACGCCACCGAGC<br>ATCATCAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACAGGGTAAATGCAGCGACGCCACCGAGC<br>ATCATCAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACAGGGTAAATGCAGCGACGCCACCGAGC             |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | GC CGCGCGCTAGCGGAGCAGGGTCAGGTGACAGCGGCTCGTGTACGCTTCCGAGTTGAAGG<br>GC CGCGCGCTAGCGGAGCAGGGTCAGGTGACAGCGGCTCGTGTACGCTTCCGAGTTGAAGG<br>GC CGCGCGCTAGCGGAGCAGGGTCAGGTGACAGCGGCTCGTGTACGCTTCCGAGTTGAAGG    |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | GGTTAACGCCAGAAACAGTGTGTCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTACACAGA<br>GGTTAACGCCAGAAACAGTGTGTCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTACACAGA<br>GGTTAACGCCAGAAACAGTGTGTCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTACACAGA                   |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | AAGAATGGAAGTATGGAAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAACCTCACGCCGCTA<br>AAGAATGGAAGTATGGAAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAACCTCACGCCGCTA<br>AAGAATGGAAGTATGGAAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAACCTCACGCCGCTA          |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | ACATCCAAAGGCCAACAGCTGCGAGTGGCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGTATTG<br>ACATCCAAAGGCCAACAGCTGCGAGTGGCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGTATTG<br>ACATCCAAAGGCCAACAGCTGCGAGTGGCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGTATTG       |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | GTGGAGCGCGAGTATGCGGCCAGCAGCGCGGAGGTGGTGGCGCCGTGGCCCTGCTCTG<br>GTGGAGCGCGAGTATGCGGCCAGCAGCGCGGAGGTGGTGGCGCCGTGGCCCTGCTCTG<br>GTGGAGCGCGAGTATGCGGCCAGCAGCGCGGAGGTGGTGGCGCCGTGGCCCTGCTCTG                |                   |

FIG. 6b

| WO 2012/134921                                                                           | 28 / 31                                                                                                                                                                                                                                                  | PCT/US2012/029990 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | TCCTGCGGGCTCGGGACAACTTGAACATGGGCGACCGCTGTGTGCAACTGCAACCCGCT<br>TCCTGCGGGCTCGGGACAACTTGAACATGGGCGACCGCTGTGTGCAACTGCAACCCGCT<br>TCCTGCGGGCTCGGGACAACTTGAACATGGGCGACCGCTGTGTGCAACTGCAACCCGCT<br>TCCTGCGGGCTCGGGACAACTTGAACATGGGCGACCGCTGTGTGCAACTGCAACCCGCT |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTGTAGGGGCGCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG<br>TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTGTAGGGGCGCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG<br>TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTGTAGGGGCGCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG<br>TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTGTAGGGGCGCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | CTTCGATTACATAAATGGGCTGAAGCTCTAAACGACGCGCGGTCGCGCGCGGATG<br>CTTCGATTACATAAATGGGCTGAAGCTCTAAACGACGCGCGGTCGCGCGCGGATG<br>CTTCGATTACATAAATGGGCTGAAGCTCTAAACGACGCGCGGTCGCGCGCGGATG<br>CTTCGATTACATAAATGGGCTGAAGCTCTAAACGACGCGCGGTCGCGCGCGGATG                 |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | GAAAGAGACCGGATCTCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACAGAGAGCGACCCACCGG<br>GAAAGAGACCGGATCTCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACAGAGAGCGACCCACCGG<br>GAAAGAGACCGGATCTCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACAGAGAGCGACCCACCGG<br>GAAAGAGACCGGATCTCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACAGAGAGCGACCCACCGG                 |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | ACGCGGAGAGTCTGCTGCTGCTCAACAGCGCGCGGCGTGGGCTGCGACCTTAACAG<br>ACGCGGAGAGTCTGCTGCTGCTCAACAGCGCGCGGCGTGGGCTGCGACCTTAACAG<br>ACGCGGAGAGTCTGCTGCTGCTCAACAGCGCGCGGCGTGGGCTGCGACCTTAACAG<br>ACGCGGAGAGTCTGCTGCTGCTCAACAGCGCGCGGCGTGGGCTGCGACCTTAACAG             |                   |
| P-SETit. Ubql-1:1:4<br>P-SETit. Ubql-1:1:3<br>P-SETit. Ubql-1:1:1<br>P-SETit. Ubql-1:1:2 | CAAGGACGCCACGAGCGCGCGCGCTCGAGGCAATAAATCCCTCCATCC<br>CAAGGACGCCACGAGCGCGCGCGCTCGAGGCAATAAATCCCTCCATCC<br>CAAGGACGCCACGAGCGCGCGCGCTCGAGGCAATAAATCCCTCCATCC<br>CAAGGACGCCACGAGCGCGCGCGCTCGAGGCAATAAATCCCTCCATCC                                             |                   |

FIG. 6c

| WO 2012/134921                                                                                   | 29 / 31                                                                                                                                                                                                                                              | PCT/US2012/029990 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | AGCAGACTCGCATTATCGATGGAGCTCTACAACTGGCCCTAGGCAATTAACCTACCATG<br>AGCAGACTCGCATTATCGATGGAGCTCTACAACTGGCCCTAGGCAATTAACCTACCATG<br>-----<br>-----<br>-----                                                                                                |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | GATCACATCGTAAAAAAAACCTACCATGATCTCTATCTGTTTCTTTTGGCCCTGAA<br>GATCACATCGTAAAAAAAACCTACCATGATCTCTATCTGTTTCTTTTGGCCCTGAA<br>-----<br>-----<br>-----                                                                                                      |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | AGMTGAGTCAATCATATATTACATGCGCGCGGTAGGAGCGCTTGTGCGAAGACCCA<br>AGMTGAGTCAATCATATATTACATGCGCGCGGTAGGAGCGCTTGTGCGAAGACCCA<br>AGMTGAGTCAATCATATATTACATGCGCGCGGTAGGAGCGCTTGTGCGAAGACCCA<br>AGMTGAGTCAATCATATATTACATGCGCGCGGTAGGAGCGCTTGTGCGAAGACCCA         |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | TAGGGGGCGGGTACTCGCACGTGGTGTGTTCTCTGTTATGTAATATCGATGGGGAGCA<br>TAGGGGGCGGGTACTCGCACGTGGTGTGTTCTCTGTTATGTAATATCGATGGGGAGCA<br>TAGGGGGCGGGTACTCGCACGTGGTGTGTTCTCTGTTATGTAATATCGATGGGGAGCA<br>TAGGGGGCGGGTACTCGCACGTGGTGTGTTCTCTGTTATGTAATATCGATGGGGAGCA |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | GTCGGCTAGGTTGGTCCATCGGTACTGGTGTGCCCTAGTGCGCTAGATGCGCGATGTT<br>GTCGGCTAGGTTGGTCCATCGGTACTGGTGTGCCCTAGTGCGCTAGATGCGCGATGTT<br>-----<br>-----<br>-----                                                                                                  |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | TGTCCTCAAAAACCTTTTCTCTTAATAAACAATCATACGCAAAATTTTTCGGATTGGA<br>TGTCCTCAAAAACCTTTTCTCTTAATAAACAATCATACGCAAAATTTTTCGGATTGGA<br>-----<br>-----<br>-----                                                                                                  |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | GAAAAAGAGAGATTCTATCTGTTTTTTTTTGAATGGCTCCAATTTATAGAGAGGAGCC<br>GAAAAAGAGAGATTCTATCTGTTTTTTTTTGAATGGCTCCAATTTATAGAGAGGAGCC<br>GAAAAAGAGAGATTCTATCTGTTTTTTTTTGAATGGCTCCAATTTATAGAGAGGAGCC<br>GAAAAAGAGAGATTCTATCTGTTTTTTTTTGAATGGCTCCAATTTATAGAGAGGAGCC |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | CGTTTAAAGCGGTGACAAATCTAAGCGACACCAACAGCGAATGAGCGAACCCACAGC<br>CGTTTAAAGCGGTGACAAATCTAAGCGACACCAACAGCGAATGAGCGAACCCACAGC<br>-----<br>-----<br>-----                                                                                                    |                   |

FIG. 7a

| WO 2012/134921                                                                                   | 30 / 31                                                                                                                                                                                                                                          | PCT/US2012/029990 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | GCCAAAGCTAGCAAGCAAGCAGCAGCGCGGAGCGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA<br>GCCAAAGCTAGCAAGCAAGCAGCAGCGCGGAGCGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA<br>GCCAAAGCTAGCAAGCAAGCAGCAGCGCGGAGCGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA<br>GCCAAAGCTAGCAAGCAAGCAGCAGCGCGGAGCGCTGACACCTTGGCTTGGCGGGCA |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | TCTCGTGTGCTGGCTGCTGGCTGCGGCCCTGCGGAGAGTTCCGGTCCACCTCCACCT<br>TCTCGTGTGCTGGCTGCTGGCTGCGGCCCTGCGGAGAGTTCCGGTCCACCTCCACCT<br>TCTCGTGTGCTGGCTGCTGGCTGCGGCCCTGCGGAGAGTTCCGGTCCACCTCCACCT<br>TCTCGTGTGCTGGCTGCTGGCTGCGGCCCTGCGGAGAGTTCCGGTCCACCTCCACCT |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | GTGTGCGTTTCCAACTCCGTTCCGCTTCCGCTGGGAGTTGTTCCGTTATCGGTTGGG<br>GTGTGCGTTTCCAACTCCGTTCCGCTTCCGCTGGGAGTTGTTCCGTTATCGGTTGGG<br>GTGTGCGTTTCCAACTCCGTTCCGCTTCCGCTGGGAGTTGTTCCGTTATCGGTTGGG<br>GTGTGCGTTTCCAACTCCGTTCCGCTTCCGCTGGGAGTTGTTCCGTTATCGGTTGGG |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | GCATCCGGAATTTGCTGGGCTAGAGCAGCGGGCCCTCTCTCACAGGCAAGCAACCGT<br>GCATCCGGAATTTGCTGGGCTAGAGCAGCGGGCCCTCTCTCACAGGCAAGCAACCGT<br>GCATCCGGAATTTGCTGGGCTAGAGCAGCGGGCCCTCTCTCACAGGCAAGCAACCGT<br>GCATCCGGAATTTGCTGGGCTAGAGCAGCGGGCCCTCTCTCACAGGCAAGCAACCGT |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | CACGAGCTCAGGCGACCGGACGACGCGGGGATTCCTTCCACACAGCGCTCTTCCCT<br>CACGAGCTCAGGCGACCGGACGACGCGGGGATTCCTTCCACACAGCGCTCTTCCCT<br>CACGAGCTCAGGCGACCGGACGACGCGGGGATTCCTTCCACACAGCGCTCTTCCCT<br>CACGAGCTCAGGCGACCGGACGACGCGGGGATTCCTTCCACACAGCGCTCTTCCCT     |                   |
| E-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:1<br>P-C1. Ubql-1:1:3<br>P-C1. Ubql-1:1:4<br>P-C1. Ubql-1:1:5 | TTCCCTTCTCGCCCGCC-----<br>TTCCCTTCTCGCCCGCCATATAAATAGCAGCCCTCCAGTTCTTCTCGGACAT<br>TTCCCTTCTCGCCCGCCATATAAATAGCAGCCCTCCAGTTCTTCTCGGACAT<br>TTCCCTTCTCGCCCGCCATATAAATAGCAGCCCTCCAGTTCTTCTCGGACAT<br>-----<br>-----                                 |                   |

FIG. 7b

【配列表】  
2016165295000002.app

WO 2012/134921 31 / 31 PCT/US2012/029990

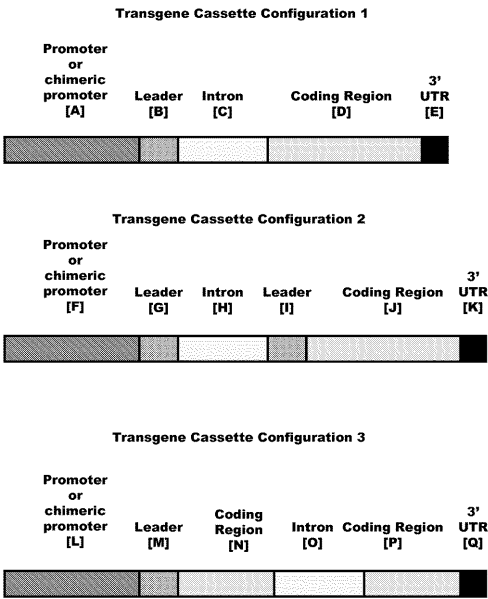


FIG. 8