

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-506437
(P2007-506437A)

(43) 公表日 平成19年3月22日(2007.3.22)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 2 B 0 3 0
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00	A 4 B 0 2 4
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	C 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2006-528283 (P2006-528283)	(71) 出願人	501231613 モンサント テクノロジー エルエルシー アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス ノース リンドバーグ ブールバード 800
(86) (22) 出願日	平成16年9月24日 (2004.9.24)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月9日 (2006.5.9)	(74) 代理人	100106231 弁理士 矢野 正樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/031605	(72) 発明者	アリソン・バン・エーネナーム アメリカ合衆国 95616 カリフォルニア 州デイビス、バー・ストリート856番
(87) 國際公開番号	W02005/030982		
(87) 國際公開日	平成17年4月7日 (2005.4.7)		
(31) 優先権主張番号	10/668,240		
(32) 優先日	平成15年9月24日 (2003.9.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニック構築体を用いる 1 を超える遺伝子の遺伝子発現の協調した低下および増加

(57) 【要約】

本発明は、RNA の発現の同時の上方および下方調節と関連した核酸分子および核酸構築体ならびに他の剤に指向される。特に、それは、第 2 の RNA の発現を抑制すると同時に、第 1 の RNA の発現を同時に増強する方法を含む。また、本発明は、同時に第 2 の RNA の発現を抑制しつつ、第 1 の RNA の発現を同時に増強できる構築体、かかる剤を利用する方法、ならびにかかる剤を含む植物を特に提供する。また、本発明は、多シストロン性構築体を含む他の構築体を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントならびに遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含む核酸分子であって、該第1の核酸セグメントおよび該第2の核酸セグメントが、单一プロモーターに作動可能に連結し、宿主細胞中の該核酸分子の転写の結果、該宿主細胞内で該ポリペプチドコード配列によりポリペプチドを発現し、遺伝子を抑制する該核酸分子。

【請求項 2】

該第2の核酸セグメントがdsRNA分子として発現される請求項1記載の核酸分子。

【請求項 3】

該第2の核酸セグメントが、mRNAに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有する請求項2記載の核酸分子。

【請求項 4】

該第2の核酸セグメントが、該mRNAからのイントロンに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有する請求項3記載の核酸分子。

【請求項 5】

該第2の核酸セグメントが、該mRNAからのエキソンに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有する請求項3記載の核酸分子。

【請求項 6】

該第2の核酸セグメントが、該mRNAからの3'UTRに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有する請求項3記載の核酸分子。

【請求項 7】

該第2の核酸セグメントが、該mRNAからの5'UTRに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有する請求項3記載の核酸分子。

【請求項 8】

遺伝子の該抑制が、該宿主細胞に対する内因性遺伝子の抑制である請求項1記載の核酸分子。

【請求項 9】

植物のゲノム中に、ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントならびに遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含む核酸分子を有する形質転換された植物であって、該第1の核酸セグメントおよび該第2の核酸セグメントが、单一プロモーターに作動可能に連結し、宿主細胞中の該核酸分子の転写の結果、該宿主細胞内で該ポリペプチドコード配列によりポリペプチドを発現し、遺伝子を抑制する該植物。

【請求項 10】

植物中の1を超えるRNA分子の発現を同時に改変する方法であって、該植物のゲノムに、ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントならびに遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含む核酸分子を導入し、該第1の核酸セグメントおよび該第2の核酸セグメントが、单一プロモーターに作動可能に連結し、宿主細胞中の該核酸分子の転写の結果、該宿主細胞内で該ポリペプチドコード配列によりポリペプチドを発現し、遺伝子を抑制することを特徴とする該方法。

【請求項 11】

該第2の核酸セグメントが、dsRNA分子として発現されることを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項 12】

該第2の核酸セグメントが、mRNAに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有することを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項 13】

該第2の核酸セグメントが、該mRNAからのイントロンに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有することを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

該第2の核酸セグメントが、該mRNAからのエキソンに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有することを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項15】

該第2の核酸セグメントが、該mRNAからの3'UTRに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有することを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項16】

該第2の核酸セグメントが、該mRNAからの5'UTRに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有することを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項17】

該1を超えるRNA分子の少なくとも1つの発現のレベルが、少なくとも部分的に低下することを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項18】

該1を超えるRNA分子の少なくとも1つの該発現のレベルが、実質的に低下することを特徴とする請求項17記載の方法。

【請求項19】

該1を超えるRNA分子の少なくとも1つの発現のレベルが、有効に消失する請求項18記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、RNAの発現の上方または下方の同時調節に関連する核酸分子および核酸構築体、ならびに他の剤に指向される。特に、それは、単一構築体を用いて第2のRNAの発現を抑制すると同時に、第1のRNAの発現を共に増強する方法を含む。また、本発明は、特に、第1のRNAの発現を共に増強でき、一方、同時に第2のRNAの発現を抑制できる構築体、かかる構築体を利用する方法ならびにかかる構築体を含む植物を提供する。また、本発明は、多シストロン性構築体を含めた他の構築体を提供する。

【0002】

発明の背景

多数の複雑な生化学的経路が、通常、単一の遺伝子の抑制または過剰発現により、今や遺伝子操作されている。植物遺伝子操作の可能性のさらなる発展は、経路における複数の遺伝子操作の協調を必要とするであろう。多数のアプローチが、性的交配、再形質転換、共形質転換および連結した導入遺伝子の使用を含めて、1つの植物において導入遺伝子を組み合わせるために用いられてきた。連結した部分的な遺伝子配列を持つキメラ導入遺伝子を用いて、多数の植物の内因性遺伝子を協調的に抑制できる。ウイルスのポリタンパク質に基づいて作成された構築体を用いて、複数のコード遺伝子を植物細胞に同時に導入できる(概説について、Halpinら, Plant Mol. Biol. 47:295-310 (2001)参照)。

【0003】

植物における形質発現の増強は、植物細胞への遺伝子のコード配列の特別なコピーの導入を介して、好ましくは、植物ゲノムへの遺伝子のコード配列の特別なコピーの取り込みを介して生じ得る。また、過剰発現は、遺伝子の発現を調節する調節機構の活性を増加させること(すなわち、遺伝子発現の上方調節)により生じ得る。

【0004】

また、植物において遺伝子のサイレンシングとして知られる形質発現の抑制は、転写レベルおよび転写後のレベルの双方に生じる。宿主細胞において内因的な配列の発現の抑制のための様々な方法がある。かかる方法は、限定されるものではないが、アンチセンス抑制(Smithら, Nature 334:724-726 (1988))、共抑制(Napoliら, Plant Cell 2:279-289 (1989))、リボザイム(Kohlerら, J. Mol. Biol. 285:1935-1950 (1999))、センスおよびアンチセンスの組合せ(Waterhouseら, PNAS USA 95:13959-13964 (1998))、プロモーター-サイレンシング(Parkら, Plant J. 9(2):183-194 (1996))ならびにDNA結合蛋白(Be

10

20

30

40

50

erliら, PNAS USA 95:14628-14633 (1997); Liuら, PNAS USA 94:5525-5530 (1998))を含む。

【0005】

ある種のこれらのメカニズムは、DNAまたはRNAのレベルにて核酸相同性に関係している (Matzkeら, Current Opinion in Genetics and Development 11:221-227 (2001))。植物において、二本鎖RNA分子は配列に特異的なサイレンシングを誘導できる。この現象は、植物において、しばしば二本鎖RNA(「dsRNA」)と呼ばれる。また、この現象はCaenorhabditis elegansにおいて報告され、この遺伝子特異的なサイレンシングは、RNA干渉またはRNAiと呼ばれる (Fireら, Nature 391:806-811 (1988))。他は、植物、菌類および動物においてこの現象が報告されている (Sharp, Genes and Development 13:139-141 (1999); Matzkeら, Curr. Opin. Genet. Dev., 11:221-227 (2001); Cogoni and Macino, Curr. Opin. Genet. Dev., 10:638-643 (2000); Sharp, Genes and Development 15:485-490 (2001); Waterhouseら, PNAS USA 95:13959-13964 (1988); Wesleyら, Plant J. 27:581-590 (2001); Grierson, WO 98/53083)。Wesleyらは、遺伝子サイレンシングベクターとして用いることができる2つのベクター、pHANNIBALおよびpHELLSGATEの設計および使用を報告した (Wesleyら、前記)。これらのベクターは、センスおよびアンチセンスの配列が、標的コード配列、5'UTRまたは3'UTRに対応するセンスおよびアンチセンスの配列間のイントロン配列を含むことが報告されている。標的センスおよびアンチセンスの配列間の非標的イントロンの利用により、より高率のサイレンシングされた形質転換体が得られた (Wesleyら、前記)。dsRNAでの遺伝子サイレンシングのもう一つの戦略は、イントロンスペーサーを持つヘアピン構築体を含む (Smithら, Nature 407:319-320 (2000))。

【0006】

他の抑制戦略は、限定なくして、アンチセンスおよびセンスの抑制を含む。例えば、FillattiのPCT WO 01/14538参照。

【0007】

所望の植物発現型は、1つの遺伝子の発現、およびもう一つの遺伝子の発現の同時低下を必要し得る。かくして、単一のトランスジェニック構築体を用いる植物において、ポリペプチドを過剰発現し、同時に、第2のポリペプチドの発現を抑制または下方調節する必要性が存在する。さらに、単一構築体を用いて、1を超えるポリペプチドの発現を同時に抑制または下方調節する必要性が存在する。

【0008】

発明の概要

本発明は、ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントおよび遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含み、宿主細胞内の核酸分子の転写の結果、宿主細胞においてそのポリヌクレオチドコード配列によりコード化されたポリペプチドを発現し、遺伝子を抑制する核酸分子を含みかつ提供する。

【0009】

本発明は、ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントおよび遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含む核酸分子を有し、宿主細胞内の核酸分子の転写の結果、その宿主細胞においてそのポリヌクレオチドコード配列によりコード化されたポリペプチドを発現し、遺伝子を抑制し、該第1の核酸セグメントおよび第2の核酸セグメントは、単一プロモーター配列に作動可能に連結する植物を含みかつ提供する。

【0010】

また、本発明は、ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントおよび遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含む核酸分子を植物細胞に導入し、宿主細胞における核酸分子の転写の結果、宿主細胞においてそのポリヌクレオチドコード配列によりコード化されたポリペプチドを発現し、遺伝子を抑制し、該第1の核酸セグメントおよび第2の核酸セグメントは、単一プロモーター配列に作動可能に連結し、該第1の核酸セグメントおよび該第2の核酸セグメントが発現されることを特徴とする、1を超えるRNA分子

10

20

30

40

50

を同時に改変する方法を含みかつ提供する。

【0011】

発明の詳細な記載

核酸配列の説明

配列番号：1は、*Gossypium hirsutum*ガンマ-トコフェロールメチルトランスフェラーゼをコードするDNA分子の核酸配列を記載する。

配列番号：2および3は、*Gossypium hirsutum*ガンマメチルトランスフェラーゼの増幅に用いるプライマーの核酸配列を記載する。

配列番号：4は、pMON75565の塩基3345-4947にて判明したRNAi操作エレメントの1405のヌクレオチド長のDNA配列である。配列番号：4は、5'から3'方向に、*Arabidopsis thaliana* FAD2(塩基1-135)からのセンス配向した3'UTR、それに連結した*Arabidopsis thaliana* FAD2(塩基144-1275)から取り出したスプライス部位を持つセンス配向したイントロン配列、それに連結した*Arabidopsis thaliana* FAD2(塩基1281-1405)からのアンチセンス配向した3'UTR配列を含む。配列番号：4において必須なFAD2イントロンエレメントは、塩基3687-4818にてpMON75565内に、および塩基3396-4515にて配列番号：5内に見出される。

10

【0012】

配列番号：5は、ベクターpMON75565からの*Agrobacterium tumefaciens*境界エレメント、すなわち、RNAiによりGMTの発現を増加させ、同時に12デサチュラーゼの発現を減少させるための第1の転写ユニットならびにBARマークー用の第2の転写ユニットのエレメント間の8179のヌクレオチド長のDNA配列の形質転換挿入エレメントである。

20

【0013】

配列番号：6は、ベクターpMON75571からの*Agrobacterium tumefaciens*境界エレメント、すなわち、イントロンセンス抑制によりGMTの発現を増加させ、同時に12デサチュラーゼの発現を減少させるための第1の転写ユニットならびにBARマークー用の第2の転写ユニットのエレメント間の7713のヌクレオチド長の形質転換挿入エレメントである。

【0014】

定義：

30

本明細書に用いた「遺伝子」とは、遺伝子産物の発現と関連する5'プロモーター領域、いずれかのイントロンおよびエキソン領域、ならびに遺伝子産物の発現に関連する3'非翻訳領域(「UTR」)を包含する核酸配列をいう。

【0015】

本明細書に用いた「トランスジェニック植物」とは、いずれかの性または無性の方法により植物からのその導入遺伝子の伝達を促すように安定的に導入遺伝子を組み入れたいずれかの植物である。

40

【0016】

本明細書に用いた「導入遺伝子」とは、生物体の細胞に導入された遺伝子の発現に関連した核酸配列をいう。導入遺伝子は、限定されるものではないが、生物体に内因性の遺伝子、または生物体において自然発生しない遺伝子を含む。

【0017】

本明細書に用いた「遺伝子サイレンシング」または「抑制」とは、限定なくして、アンチセンス抑制、センス抑制およびセンスイントロン抑制を含めたいずれかの方法による遺伝子発現の下方調節をいう。かかる下方調節は、部分的な下方調節で有り得る。

【0018】

本明細書に用いた「遺伝子抑制配列」は、転写される場合に、遺伝子発現を下方調節できるいずれかの核酸配列である。かかる方法は、限定されるものではないが、アンチセンス抑制、センス抑制およびセンスイントロン抑制を含む。

【0019】

50

本明細書に用いた「アンチセンス抑制」とは、アンチセンスRNA分子の導入により誘導された遺伝子サイレンシングをいう。

【0020】

本明細書に用いた「センス抑制」とは、限定なくして、コード配列またはその断片を含めたセンス配向での遺伝子の断片の導入により誘導された遺伝子サイレンシングをいう。

【0021】

本明細書に用いた「センスイントロン抑制」とは、センス配向での遺伝子のイントロンまたはその断片の導入により誘導された遺伝子サイレンシングをいう。センスイントロン抑制は、FillattiのPCT WO 01/14538 A2に記載されている。

【0022】

本明細書において蛋白質および核酸を言及する場合、単純な大文字、例えば「G M T」「F A D 2」の使用は、酵素、蛋白質、ポリペプチドまたはペプチドへの言及を示し、イタリック体の大文字、例えば「G M T」または「F A D 2」の使用は、限定なくして、遺伝子、cDNAおよびmRNAを含めた核酸をいう。

【0023】

本明細書において蛋白質および核酸のごとき剤を言及する場合に、「誘導された」は、(例えば、公知の蛋白質または核酸の配列を調べて、その公知の蛋白質または核酸の配列に、少なくとも部分的に類似する配列を有する蛋白質または核酸を調製することにより)直接的に、あるいは(例えば、公知の蛋白質または核酸に関連した生物体からの蛋白質または核酸を得ることにより)間接的に、公知の蛋白質または核酸から蛋白質または核酸を得ることをいう。公知の蛋白質または核酸から蛋白質または核酸を「誘導する」他の方法は、当業者に知られている。

【0024】

本明細書において核酸構築体を言及する場合に、その構築体は、線形または環状の形態であり得ると理解される。

【0025】

本明細書に用いた「核酸セグメント」は、より大きな核酸分子の一部分である。かかる核酸セグメントは、例えば、限定なくして、ポリペプチドコード配列もしくは遺伝子抑制配列またはその双方を含むことができる。

【0026】

本明細書に用いた「RNAi」および「dsRNA」とは、二本鎖RNA分子の導入により誘導された遺伝子サイレンシングをいう。

【0027】

本明細書に用いた「dsRNA分子」および「RNAi分子」の双方は、細胞または生物体へ導入された場合に、細胞または生物体の細胞に存在するmRNA種のレベルを少なくとも部分的に低下できる二本鎖RNA分子をいう。

【0028】

本明細書に用いた「イントロンdsRNA分子」および「イントロンRNAi分子」の双方は、細胞または生物体に導入された場合に、二本鎖RNAが、そのイントロン配列を含むmRNAのレベルを低下させるために細胞または生物体に存在する遺伝子のイントロンに十分な同一性を示す1以上の細胞内に存在するmRNA種のレベルを少なくとも部分的に低下できる二本鎖RNA分子をいう。

【0029】

「非コード」なる用語とは、発現した蛋白質の一部分または全てをコードしない核酸分子の配列をいう。非コード配列は、限定されるものではないが、イントロン、プロモーター領域、3'非翻訳領域(「3'UTR」)および5'非翻訳領域(「5'UTR」)を含む。

【0030】

本明細書に用いた「イントロン」なる用語は、発現した蛋白質の一部分または全てをコードしなく、内因性条件下、RNA分子に転写されるが、該RNAが蛋白質に翻訳される前に内因性RNAを切り出す核酸分子、通常、DNAのセグメントを意味する通常の意味

10

20

30

40

50

の用語をいう。

【0031】

本明細書に用いた「エキソン」なる用語は、発現した蛋白質の一部分または全てをコードする核酸分子、通常、DNAのセグメントを意味する通常の意味の用語をいう。

【0032】

本明細書に用いた、1以上の核酸配列に「作動可能に連結した」プロモーターは、多シストロン性配置または構築体において配列した複数のコード化または非コードの核酸配列を含めた1以上の核酸配列の発現を駆動できる。

【0033】

本明細書に用いた「植物プロモーター」は、限定なくして、植物のウイルスプロモーター、および合成、キメラまたはハイブリッドのプロモーターを含み、それは、植物細胞中で機能してmRNAの発現を促進できる単一の転写ユニットである。 10

【0034】

「多シストロン性配置」または「多シストロン性構築」は、1を超える遺伝子の核酸配列を含む配置である。「多シストロン性配置」内では、エキソン、イントロンまたは双方に対応する配列が存在してもよく、「多シストロン性配置」は、例えば、限定なくして、1つの遺伝子からの1以上のエキソンおよび第2の遺伝子からの1以上のイントロンに対応する配列を含むが得ると理解される。

【0035】

本明細書に用いた「多シストロン性遺伝子」または「ポリシストロン性mRNA」は、1を超える遺伝子の核酸配列に対応する核酸配列を含むいずれかの遺伝子またはmRNAである。かかる多シストロン性遺伝子またはmRNAは、エキソン、イントロンまたは双方に対応する配列を含み、組み換え多シストロン性遺伝子またはmRNAは、例えば、限定なくして、1つの遺伝子からの1以上のエキソンおよび第2の遺伝子からの1以上のイントロンに対応する配列を含むと理解される。 20

【0036】

本明細書に用いた「物理的に連結した」核酸配列は、単一の核酸分子に見出された核酸配列である。

本明細書に用いた「発現」は転写および翻訳のプロセスをいう。

【0037】

本明細書に用いた、mRNAまたは蛋白質のごとき1を超える剤の「同時の発現」とは、もう一つの剤と同時でのある剤の発現をいう。かかる発現は、単に一部分重複し、異なった組織またはレベルでも生じ得る。 30

【0038】

本明細書に用いた、mRNAまたは蛋白質のごとき1を超える剤の「発現を同時に改変する」は、もう一つの剤の発現を改変すると同時にある剤の発現を改変することをいう。1を超える剤のかかる発現は、異なる組織においてまたは異なるレベルにて改変し得る。

【0039】

本明細書に用いた、mRNAまたは蛋白質のごとき1を超える剤の「共発現」は、もう一つの剤と同時に、および同一細胞または組織におけるある剤の同時の発現をいう。 40

【0040】

本明細書に用いた、1を超える剤の「協調した発現」とは、かかる剤の発現が共通または同一のプロモーターを利用して行なわれる場合に、1を超える剤の共発現をいう。

【0041】

本明細書に用いた、蛋白質またはmRNAのごとき剤の「少なくとも部分的に増強された」または「増加した」レベルは、その剤が、類似する遺伝的背景を持つが、蛋白質またはmRNAをコードする導入核酸分子を欠く細胞、組織、植物または生物体に存在するレベルに対してその剤のレベルが増加するならば、少なくとも部分的に増強または増加する。

【0042】

10

20

30

40

50

本明細書に用いた「ポリペプチド」は15個以上のアミノ酸残基を含む。

本明細書に用いた「ペプチド」は14個以下のアミノ酸残基を含む。

【0043】

その剤のレベルが、類似する遺伝的背景を持つが、蛋白質またはmRNAをコードする導入核酸分子を欠く細胞、組織、植物または生物体に存在するレベルに対して少なくとも25%増加するならば、蛋白質、ポリペプチド、ペプチドまたはmRNAのごとき剤の「増強された」レベルは増強される。

【0044】

本明細書に用いた、その剤のレベルが類似する遺伝的背景を持つが、蛋白質またはmRNAをコードする導入核酸分子を欠く細胞、組織、植物または生物体に存在するレベルに対して少なくとも75%増加するならば、蛋白質、ポリペプチド、ペプチドまたはmRNAのごとき剤のレベルは「実質的に増強される」。

10

【0045】

本明細書に用いた、蛋白質、ポリペプチド、ペプチドまたはmRNAのごとき剤のレベルの「低下」は、類似する遺伝的背景を持つが、その剤を低下できる核酸配列を欠く細胞、組織、植物または生物体に対してそのレベルが減少することを意味する。

【0046】

本明細書に用いた、蛋白質、ポリペプチド、ペプチドまたはmRNAのごとき剤のレベルの「少なくとも部分的な低下」は、類似する遺伝的背景を持つが、その剤を低下できる核酸配列を欠く細胞、組織、植物または生物体に対してそのレベルが、少なくとも25%減少することを意味する。

20

【0047】

本明細書に用いた、蛋白質、ポリペプチド、ペプチドまたはmRNAのごとき剤のレベルの「実質的な低下」は、類似する遺伝的背景を持つが、その剤を低下できる核酸配列を欠く細胞、組織、植物または生物体に対してそのレベルが減少し、その剤のレベルにおける低下が少なくとも75%であることを意味する。

30

【0048】

本明細書に用いた、蛋白質、ポリペプチド、ペプチドまたはmRNAのごとき剤の「有効な消失」は、類似する遺伝的背景を持つが、その剤を低下できる核酸配列を欠く細胞、組織、植物または生物体に関連し、その剤のレベルにおける減少が、95%を超える。

30

【0049】

本明細書に用いた「異種の」は、一緒に自然発生しないことを意味する。

本明細書に用いた「内因性遺伝子」は、形質転換またはトランスフェクションにより宿主に導入されないいずれかの遺伝子である。

本明細書に用いた「合計油レベル」とは、脂肪酸のタイプを考慮せずに、脂肪酸の合計の総量をいう。

【0050】

本明細書に用いた「改変された種子油組成物」とは、脂肪酸のタイプの相対的パーセンテージが改変された種子組成物をいう。

本明細書に用いた、前記のいずれの範囲も、特記しない限りは、その範囲の終点を含む。

40

【0051】

本発明の剤は、もう一つの核酸分子にハイブリダイズさせる核酸分子の能力のごとき構造的特性、あるいは抗体により結合される(またはかかる結合についてもう一つの分子と競争する)蛋白質の能力のいずれかに関して、好ましくは、「生物学的に活性」である。あるいは、かかる生物学的活性は、触媒的であり得、かくして、化学的反応または応答を媒介する剤の能力を含み得る。

【0052】

剤は、好ましくは「実質的に精製された」ものであろう。本明細書に用いた「実質的に精製された」なる用語は、その本来の環境条件下においてそれと通常関連する他の実質的

50

にすべての分子から単離された分子をいう。より好ましくは、実質的に精製された分子は、調製物中に存在した優位な種である。実質的に精製された分子は、天然の混合物中に存在する他の分子（溶媒を除いて）が60%を超えて無く、75%を超えて無く、好ましくは90%を超えて無く、最も好ましくは95%を超えて無いものであり得る。「実質的に精製された」なる用語は、それらの本来の環境条件下で存在する分子を包含することは意図されない。

【0053】

また、本発明の剤は組み換えることができる。本明細書に用いた、「組換えの」なる用語は、核酸分子またはペプチドのヒト操作からのものであるか、またはそのヒト操作から如何に間接的であろうとも生じるいずれかの剤（例えば、限定されるものではないが、DNA、RNA、ペプチドを含む）を意味する。

【0054】

本発明の剤は、その剤の検出を促す試薬で標識し得る（例えば、蛍光標識、Proberら、*Science* 238:336-340 (1987); Albarellaら、EP 144914; 化学標識、Sheldonら、米国特許第4,582,789号; Albarellaら、米国特許第4,563,417号；修飾塩基、Miyoshiら、EP 119448）。

【0055】

本明細書に用いた「%同一性」は、以下のパラメーターおよびアルゴリズムを用いて決定される：スミスウォーターマンアルゴリズムを用いて、同一性を決定する。ポリペプチド配列比較用パラメーターは典型的には以下のものを含む：アルゴリズム：Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970)。比較マトリックス：Hentikoff and Hentikoff, *PNAS USA* 89:10915-10919 (1992) からのBLOSUM62。ギャップペナルティー：12；ギャップ長ペナルティー：4。これらのパラメーターで用いることができるプログラムは、Genetics Computer Group（「GCG」），Madison, Wisconsinからのギャッププログラムとして公的に入手可能である。エンドギャップに対するペナルティーなしと同様に上記のパラメーターは、ペプチド比較用のデフォルトパラメーターである。核酸分子配列比較用パラメーターは以下のものである：アルゴリズム：Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970)。比較マトリックス：マッチ- + 10、ミスマッチ=0；ギャップペナルティー：50；ギャップ長ペナルティー：3。「%同一性」は、核酸分子配列比較用のデフォルトパラメーターとしての前記パラメーター、およびGCG、バージョン10.2からの「ギャップ」プログラムを用いて決定される。

【0056】

本明細書に用いた、ガンマ-トコフェロールメチルトランスフェラーゼ(GMT、-GMT、-MT、-TMTまたはガンマメチルトランスフェラーゼともいう)は、-トコフェロールへのガンマ-トコフェロールの転換を特に触媒できるいずれかのポリペプチドである。また、ダイズのごときある種の植物では、GMTは、-トコフェロールへの-トコフェロールの転換を触媒できる。また、他の植物では、GMTは、-トコトリエノールへの-トコトリエノールの転換を触媒できる。

【0057】

本明細書に用いた「FAD2」、「12デサチュラーゼ」または「オメガ-6デサチュラーゼ」遺伝子は、カルボキシル末端から数えて第12番目の位置で脂肪アシル部位への二重結合の挿入を触媒できる酵素をコードする遺伝子である。

【0058】

核酸分子、構築体およびベクター

宿主植物細胞へのDNAの形質転換を導入するのに適したベクター系は、限定されるものではないが、二成分の細菌人工染色体(BIBAC)ベクター(Hamiltonら、*Gene* 200:107-116 (1997)); RNAウイルスベクター(Della-Cioppaら、*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 792 (Engineering Plants for Commercial Products and Applications):57-61 (1996)); 植物選択YAC(酵母人工染色体)ベクター、例えば、Mullenら、*Molecular Breeding* 4:449-457 (1988)に記載されるもの；コスミド；および細菌人工染色体(BAC)を含み、かかるベクター系

10

20

30

40

50

は、本発明の核酸分子で利用できる。本発明の1つの態様において、かかるベクターは、ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントおよび第2の核酸セグメントを含む核酸分子を含み、宿主細胞内の該核酸分子の転写の結果、宿主細胞においてポリペプチドコード配列によりコードされたポリペプチドを発現し、遺伝子を抑制する。1つの態様において、第1の核酸および第2の核酸のセグメントは、単一のプロモーター配列に作動可能に連結している。第2の核酸セグメントは、例えば、限定なくして、dsRNA分子、RNAi分子、イントロンdsRNA分子またはイントロンRNAi分子として、発現され得る。本発明の態様において、かかる第1の核酸セグメントおよび第2の核酸セグメントは、宿主細胞内で発現、共発現または協調的に発現でき、発現に際して、第2の核酸によりコードされたRNAは抑制される。

10

【0059】

A. プロモーター

本発明の態様において、核酸分子、構築体またはベクターは、1以上の核酸配列に作動可能に連結したプロモーターを含む。本明細書に記載されたそれらのプロモーターのごときmRNAの分子の産生を引き起こす植物細胞中で機能するいずれのプロモーターも、限定なくして、用いることができる。好ましい具体例において、そのプロモーターは植物プロモーターである。

【0060】

植物細胞において活性である多数のプロモーターが文献に記載されている。これらには、限定されるものではないが、ノパリン合成酵素(NOS)プロモーター(Ebertら, PNAS USA 84:5745-5749 (1987))、オクトピン合成酵素(OCS)プロモーター(Agrobacterium tumefaciensの腫瘍誘導プラスミドで運ばれる)、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)19Sプロモーターのごときカウリモウイルス(caulimovirus)プロモーター(Lawtonら, Plant Mol. Biol. 9:315-324 (1987))、ならびにCaMV 35Sプロモーター(Odellら, Nature 313:8 10-812 (1985))、ゴマノハグサ(figwort)モザイクウイルス35S-プロモーター(米国特許第5,378,619号)、リブロース-1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ(ssRUBISCO)、Adhプロモーター(Walkerら, PNAS USA 84:6624-6628 (1987))、スクロースシンターゼプロモーター(Yangら, PNAS USA 87:4144-4148 (1990))、R遺伝子複合プロモーター(Chandlerら, Plant Cell 1:1175-1183 (1989))およびクロロフィルa/b結合蛋白質遺伝子プロモーターが含まれる。植物中で発現されるDNA構築体を創製するためのこれらのプロモーターが用いられた(例えば、PCT WO 84/02913参照)。CaMV 35Sプロモーターは植物で使用するのに好ましい。また、トウモロコシRS81プロモーターを開示する米国特許第6,437,217号;コメアクチンプロモーターを開示する米国特許第5,641,876号;トウモロコシRS324プロモーターを開示する米国特許第6,426,446号;トウモロコシPR-1プロモーターを開示する米国特許第6,429,362号;トウモロコシA3プロモーターを開示する米国特許第6,232,526号;および構成的トウモロコシプロモーターを開示する米国特許第6,177,611参照。コメアクチントントロンを持つコメアクチン1プロモーターは、本発明の実施に特に有用である。

20

【0061】

また、特に好ましいプロモーターを用いて、種子または果物において本発明の核酸分子を発現できる。事実、好ましい具体例において、用いたプロモーターは種子特異的なプロモーターである。かかるプロモーターの例は、ナピン(Kridlら, Seed Sci. Res. 1:209:2 19 (1991))、ファゼオリン(Bustosら, Plant Cell 1(9):839-853 (1989))、大豆トリプシンインヒビター(Riggsら, Plant Cell 1(6):609-621 (1989))、ACP(Baersonら, Plant Mol. Biol. 22(2):255-267 (1993))、ステアロイル-ACPデサチュラーゼ(Slocombeら, Plant Physiol. 104(4):167-176 (1994))、b-コングリシニンのダイズa'サブユニット(ダイズ7sプロモーター, (Chenら, PNAS USA 83:8560-8564 (1986)))、脂肪酸伸長(FAE1)プロモーター(PCT WO 01/11061)ならびにオレオシン(例えば、Hongら, Plant Mol. Biol. 34(3):549-555 (1997)参照)のごとき遺伝子からの5'制御領域を含む。さらなる例は、-コングリシニン用のプロモーターを含む(Chenら, Dev. Genet. 10: 11 50

30

40

2-122 (1989))。種子における発現用の好ましいプロモーターは、7 S およびナピンプロモーターである。

【0062】

また、トウモロコシ胚乳で判明したある群の貯蔵蛋白質であるゼインプロモーターが含まれる。ゼイン遺伝子用ゲノムクローンが単離され (Pedersenら, *Cell* 29:1015-1026 (1982); Russellら, *Transgenic Res.* 6(2):157-168 (1997))、15 kD、16 kD、19 kD、22 kD および 27 kD 遺伝子を含めたこれらのクローンからのプロモーターも用いることができる。例えば、トウモロコシ中で機能することが知られている他のプロモーターは、以下の遺伝子 : waxy、Brittle、Shrunken 2、分枝酵素 I および II、デンプン合成酵素、脱分枝酵素、オレオシン、グルテリンならびにショ糖合成酵素についてのプロモーターを含む。トウモロコシ胚乳発現用の特に好ましいプロモーターは、コメからのグルテリン遺伝子用のプロモーター、より好ましくは、0sgt-1プロモーター (Zhengら, *Mol. Cell Biol.* 13:5829-5842 (1993)) である。小麦における発現に適しているプロモーターの例は、ADPGCPPサブユニット、顆粒結合および他のデンプン合成酵素、分枝および脱分枝酵素、胚形成富化 (embryogenesis-abundant) 蛋白質、グリアジンおよびグルテニン用のそれらのプロモーターを含む。コメにおけるかかるプロモーターの例は、ADPGCPPサブユニット、顆粒結合および他のデンプン合成酵素、分枝酵素、脱分枝酵素、ショ糖合成酵素ならびにグルテリン用のそれらのプロモーターを含む。特に好ましいプロモーターは、コメグルテリン、0sgt-1 用のプロモーターである。大麦用のかかるプロモーターの例は、ADPGCPPサブユニット、顆粒結合および他のデンプン合成酵素、分枝酵素、脱分枝酵素、ショ糖合成酵素、ホルデイン、胚グロブリンおよびデンプンの特定の蛋白質を含む。

【0063】

本発明の蛋白質の組織特異的な発現は、特に好ましい具体例である。用いることができる組織特異的なプロモーターは、エンドウからの葉緑体グルタミン合成酵素GS2プロモーター (Edwardsら, *PNAS USA* 87:3459-3463 (1990))、小麦からの葉緑体フルクトース-1, 6-ビホスファターゼ (FBPase) プロモーター (Lloydら, *Mol. Gen. Genet.* 225:209-216 (1991))、トマトからの核光合成ST-LS1プロモーター (Stockhausら, *EMBO J.* 8:2445-2451 (1989))、*Arabidopsis thaliana*からのセリン / トレオニンキナーゼ (PAL) プロモーターならびにグルコアミラーゼ (CHS) プロモーターを含む。また、光合成で活性な組織において活性であることが報告されているのは、東部カラマツ (*Larix laricina*) のリプロース-1, 5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ (rbcS)、マツからのcab遺伝子、cab6用のプロモーター (Yamamotoら, *Plant Cell Physiol.* 35:773-778 (1994))、小麦からのCab-1 遺伝子用のプロモーター (Fejesら, *Plant Mol. Biol.* 15:921-932 (1990))、ホウレン草からのCAB-1遺伝子用のプロモーター (Lubberstedtら, *Plant Physiol.* 104:997-1006 (1994))、コメからのcab1R遺伝子用のプロモーター (Luanら, *Plant Cell* 4:971-981 (1992))、トウモロコシからのピルビン酸オルトホスフェートジキナーゼ (PPDK) プロモーター (Matsuokaら, *PNAS USA* 90: 9586-9590 (1993))、タバコLhcb1⁺2遺伝子用のプロモーター (Cerdanら, *Plant Mol. Biol.* 33:245-255 (1997))、*Arabidopsis thaliana* SUC2スクロース-H⁺共輸送体プロモーター (Truernitら, *Planta* 196:564-570 (1995)) ならびにホウレン草からのチラコイド膜蛋白質用のプロモーター (psaD, psaF, psaE, PC, FNR, atpC, atpD, cab, rbcS) を含む。また、シロガラシからのLhcB遺伝子およびPsbP遺伝子用のプロモーターのごときクロロフィルa/b-結合蛋白質用の他のプロモーターを本発明に利用し得る (*Sinapis alba*; Kretschら, *Plant Mol. Biol.* 28:219-229 (1995))。

【0064】

クラス I パタチンプロモーター (Bevanら, *EMBO J.* 8:1899-1906 (1986); Jeffersonら, *Plant Mol. Biol.* 14:995-1006 (1990))、ポテト塊茎ADPGCPP遺伝子用プロモーター、その大小のサブユニット、スクロース合成プロモーター (Salanoubat and Belliard, *Gene* 60:47-56 (1987), Salanoubat and Belliard, *Gene* 84:181-185 (1989))、22 kD 蛋白複合体およびプロテアーゼ阻害剤を含めた主要塊茎蛋白質用プロモーター (Hannapel, *Pla* 50

nt Physiol. 101:703-704 (1993))、顆粒結合デンプン合成遺伝子(GBSS)用プロモーター(Visserら, Plant Mol. Biol. 17:691-699 (1991))ならびに他のクラスIおよびIIパタチンプロモーター(Koster-Topferら, Mol. Gen. Genet. 219:390-396 (1989); Migneryら, Gene. 62:27-44 (1988))を含めた塊茎特異的または塊茎増強した発現を持つ遺伝子用の多数のプロモーターが知られ、用いることができる。

【0065】

また、根特異的プロモーターを用いてもよい。かかるプロモーターの例は、酸キチナーゼ遺伝子用プロモーターである(Samacら, Plant Mol. Biol. 25:587-596 (1994))。また、根組織における発現は、同定されたCaMV35Sプロモーターの根特異的サブドメインを利用することにより達成できる(Lamら, PNAS USA 86:7890-7894 (1989))。他の根細胞特異的プロモーターは、Conklingら(Conklingら, Plant Physiol. 93:1203-1211 (1990))により報告されたものを含む。

【0066】

本発明の核酸構築体に用いるプロモーターは、所望ならば、それらの制御特性に影響するように修飾し得る。プロモーターは、オペレーター領域との連結、ランダムまたは制御変異誘発等により誘導できる。さらに、プロモーターを複数の「増強配列」を含有するように改変して、遺伝子発現の上昇を補助し得る。かかる増強は、当該技術分野において知られている。かかる構築体を持つエンハンサー配列を含むことにより、選択された蛋白質の発現を増強できる。これらのエンハンサーは、しばしば、真核細胞中で機能するプロモーター内で5'ないし転写開始点にて見出されるが、前方または逆配向にて5'または3'ないしコード配列にしばしば挿入できる。いくらかの例において、これらの5'増強エレメントは、イントロンである。エンハンサーとして特に有用であるようなものは、ライスアクチン1およびライスアクチン2遺伝子の5'イントロンである。本発明により用いることができる他のエンハンサーの例は、CaMV 35Sプロモーターからのエレメント、オクトピン合成酵素遺伝子、トウモロコシアルコール脱水素酵素遺伝子、トウモロコシ収縮(shrunken)1遺伝子、非植物真核生物からのプロモーターを含む。

【0067】

エンハンサーが、選択された蛋白質の発現用のプロモーターと共に用いられる場合、プロモーターと選択されたコード領域の開始コドンとの間にエンハンサーを配置することが好ましいと考えられる。また、しかしながら、他の配列に対しエンハンサーの異なる配置を用いることができ、依然としてそのエンハンサーにより与えられた有益な特性を認めることができた。例えば、エンハンサーは、プロモーター領域の5'、プロモーター領域内、コード配列内(存在し得るいすれの他のイントロン配列内も含む)、あるいはプロモーター領域の3'に配置できる。

【0068】

増強活性を持つイントロンに加えて、他のタイプのエレメントは形質発現に影響できる。例えば、遺伝子発現を増強すると予測される非翻訳リーダー配列、ならびに「コンセンサス」、および好ましいリーダー配列が同定された。好ましいリーダー配列は、付属のコード領域の最適な発現を指令すると予測される配列を有するものを含む、すなわち、mRNA安定性を増加または維持し、翻訳の不適当な開始を防止し得る好ましいコンセンサスリーダー配列を含むと考えられる。かかる配列の選択は、本開示に照らして当業者に知られているであろう。植物、特に、トウモロコシ中で高度に発現した遺伝子から誘導された配列は、最も好ましいであろう。例えば、リブロースビスホスフェートカルボキラーゼ(RUBISCO)の小サブユニットから誘導された配列。

【0069】

一般的には、ゲノムにおいて、異種のDNAをランダムに、すなわち、非特定の位置にて導入することが好ましい。特殊な場合において、それは、部位特異的な組込みを達成する、例えば、ゲノム中に存在する遺伝子を置換するために異種の核酸挿入を標的とするのに有用であり得る。他のいくつかの場合では、遺伝子発現が発生することが知られている事前決定された部位にてゲノムへ異種の核酸組込みを標的とすることは有用で有り得る。

10

20

30

40

50

米国特許第4,959,317号に開示されたcre-loxおよび米国特許第5,527,695号に開示されたFLP-FRTを含めた植物中で機能することが知られているいくつかの部位特異的な組換えシステムが存在する。

【0070】

利用し得るさらなるプロモーターは、例えば、米国特許第5,378,619号、第5,391,725号；第5,428,147号；第5,447,858号；第5,608,144号；第5,614,399号；第5,633,441号；第5,633,435号；および第4,633,436号に記載されている。加えて、組織特異的エンハンサーを用いてもよい(Frommら, *Plant Cell* 1:977-984 (1989))。

【0071】

B. 核酸分子

本発明のある態様において、核酸分子は、細胞または生物体に導入された場合、細胞または生物体において発現された1以上のRNA分子のレベルを抑制できる1以上の他のRNA分子を発現しつつ、1以上の蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドを生成するように1以上のRNA分子を同時に過剰発現、発現、共発現するか、協調的に発現できる核酸配列を含む。

【0072】

本発明のこの態様において、いずれの蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドも発現でき、いずれのRNA分子も抑制できる。かかる蛋白質、その断片、ポリペプチドおよびペプチドをコードする核酸配列ならびに細胞または生物体において発現された1以上のmRNA分子の抑制に有用な核酸配列は、例えば、限定なくして、遺伝子、その断片、cDNA、その断片等から誘導できる。

【0073】

本発明の遺伝子は、内因性または導入されたかにかかわらず、いずれの遺伝子でもあり得る。かかる遺伝子の核酸配列は、限定なくして、www-ebi.ac.uk/swisprot/；www-expasy.ch/；www-embl.heidelberg.de/；およびwww-ncbi.nlm.nih.govに見出されるEMBLおよびGenbankのごときデータベースを含めた複数のソースから導き出すことができる。また、かかる遺伝子の核酸配列は、限定なくして、http://genes.mit.edu/GENSCAN.htmlにて見出されるGENSCANプログラムのごときソースから導き出すことができる。さらなる具体例において、さらなる遺伝子は、さらなる遺伝子が同定し得るいずれかの方法により得てもよい。好ましい具体例において、さらなる遺伝子は、公知の遺伝子配列のプローブでゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得てもよい。次いで、その遺伝子はクローニングされ、確認し得る。さらなる遺伝子は、例えば、限定なくして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅され、本発明の具体例において用いてもよい。加えて、遺伝子の他の核酸配列は、当業者に明らかであろう。

【0074】

種々の方法のいずれかを用いて、1以上の遺伝子を得てもよい。自動核酸シンセサイザーは、この目的のために使用し、細胞または生物体においても判明した配列を有する核酸分子を作成できる。かかる合成に代えて、核酸分子を用いて、いずれかの所望の核酸分子または第1の遺伝子の断片を増幅し得るためにPCRで用いることができる1対のプライマーを規定するように用いてもよい。

【0075】

好ましい態様において、その遺伝子、mRNAまたは蛋白質は、非ウイルス遺伝子、mRNAまたは蛋白質である。もう一つの好ましい態様において、その遺伝子、RNAまたは蛋白質は、内因性の遺伝子、RNAまたは蛋白質である。好ましい態様において、遺伝子はGMT遺伝子である。本発明の好ましいGMT遺伝子は、植物またはラン藻(cyanobacterial)GMT、より好ましくは、Arabidopsis(アラビドプシス)、コメ、トウモロコシ、綿、クフェア属(cuphea)、アブラナ、トマト、ダイズ、キンセンカ、モロコシおよびニラよりなる群から選択される生物体で判明したGMT、最も好ましくは、Arabidopsis thaliana、Oryza sativa、Zea mays、Gossypium hirsutum、Cuphea pulcherrima、Br

10

20

30

40

50

assica napus、Lycopersicon esculentum、Glycine max、Tagetes erectaおよびLilium asiaticよりなる群から選択される生物体において判明したGMTである。GMT遺伝子についての代表的な配列は、限定なくして、2002年8月16日に出願された米国特許出願シリアル番号10/219,810号に記載されたものを含む。

【0076】

ある態様において、本発明のもう一つの好ましい遺伝子はFAD2遺伝子である。FAD2についての代表的な配列は、限定なくして、2002年6月21日に出願された米国出願シリアル番号10/176,149号、2000年8月11日に出願された米国特許出願シリアル番号09/638,508号、および1999年8月26日に出願された米国仮出願シリアル番号60/151,224号、1999年12月17日に出願された米国仮出願シリアル番号60/172,128号を含む。好ましい態様において、GMT蛋白質が発現され、FAD2蛋白質の発現が抑制される。

10

【0077】

本発明の態様において、核酸分子は、ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントおよび遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含み、宿主細胞中の該核酸分子の転写の結果、該宿主細胞内で該ポリペプチドコード配列によりポリペプチドを発現し、遺伝子を抑制し、該第1の核酸セグメントおよび該第2の核酸セグメントが、単一プロモーターに作動可能に連結する。

20

【0078】

本発明の好ましい態様において、その核酸分子は、蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドをコードする本発明の核酸分子に作動可能に融合した色素体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

20

【0079】

本発明の核酸分子または蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドは、遺伝子またはその翻訳された産物からの核酸またはアミノ酸配列のいずれかにおいても異なってもよいが、それにもかかわらず、遺伝子から核酸またはアミノ酸配列とパーセンテージ同一性を共有してもよい。配列の比較により決定されるように、当該技術分野においてよく理解されている「同一性」は、2以上のポリペプチド配列または2以上の核酸分子配列間の関連性である。また、当該技術分野における「同一性」は、かかる配列のストリング間の対合により決定されたようなポリペプチドまたは核酸分子の配列間の配列関連性の度合いを意味する。「同一性」は、容易に公知の方法により計算できる。

30

【0080】

もう一つの態様において、本発明の核酸分子の核酸配列は、蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドが1以上の保守的なアミノ酸変化を有しかねなく、従って、そのポリペプチドをコードする核酸配列が配列差を有しかねないという事実のために、蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドをコードするものとは異なる配列を含むことができる。

30

【0081】

本来の配列における1以上のアミノ酸をその電荷および極性が本来のアミノ酸のものと類似する他のアミノ酸(群)と置換できる、すなわち、保存的アミノ酸置換できる。また、アミノ酸変化をさせる場合に、アミノ酸のヒドロパシーインデックスも考慮され得る。蛋白質に関する相互作用的な生物学的機能を与えることにおけるそのアミノ酸ヒドロパシーインデックスの重要性は、一般的に当該技術分野において理解されている(Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982))。また、類似するアミノ酸の置換を親水性に基づいて有效地に作成できると当該技術分野において理解されている。米国特許第4,554,101号は、蛋白質の最も大きな局所的な平均親水性が、その隣接したアミノ酸の親水性により規定されるように、蛋白質の生物学的特性と関連すると記載している。かかる変化を行うと、その親水性値が±2内にあるアミノ酸の置換が好ましく、±1内にあるものが特に好ましく、±0.5内の中のものがさらに特に好ましい。

40

【0082】

50

遺伝コードの縮重により、異なったヌクレオチドコドンを、特定のアミノ酸をコードするためには用いてよい。宿主細胞は、しばしばコドン利用の好みのパターンを示す。構造的核酸配列は、特定の宿主細胞のコドン利用パターンを利用するようには構築される。これは、一般的に形質転換された宿主細胞における構造的核酸配列の発現を増強する。いずれの前記の核酸およびアミノ酸配列も、それらが含まれている宿主細胞または生物体の好みのコドン利用を反映するように修飾し得る。植物における最適なコドン利用のための構造的核酸配列の修飾は、米国特許第5,689,052号に記載されている。

【0083】

本発明の好みの具体例は、植物遺伝子にその全長にわたり少なくとも50%、60%または、70%同一である第1、第2または双方の核酸セグメント(群)を含む核酸分子を含む。より好みののは、植物遺伝子にその全長にわたり少なくとも80%または少なくとも85%同一である領域を含む第1、第2、または双方の核酸セグメントである。この点では、それらの全長にわたり少なくとも90%同一の第1および第2の核酸セグメントが特に好み、少なくとも95%のものがとりわけ好み。さらに、少なくとも97%の同一性を持つものが非常に好み、少なくとも98%同一性および少なくとも99%同一性を持つものが特に非常に好み、100%の同一性を示すものが、最も非常に好み。

【0084】

本発明の核酸分子の第1および第2の核酸セグメントのサブセットは、断片核酸分子を含む。断片核酸分子は、植物遺伝子のかなりの(複数)部分、または実際に、大部分よりなり得る。あるいは、断片は、約15ないし約40の近接するヌクレオチド残基、より好みのは、約15ないし約45の近接するヌクレオチド残基、約20ないし約45の近接するヌクレオチド残基、約15ないし約30の近接するヌクレオチド残基、約21ないし約30の近接するヌクレオチド残基、約21ないし約25の近接するヌクレオチド残基、約21ないし約24の近接するヌクレオチド残基、約19ないし約25の近接するヌクレオチド残基、または約21の近接するヌクレオチド残基を有するより小さなオリゴヌクレオチドを含み得る。好みの具体例において、断片は、植物遺伝子の領域に100%の同一性を示す。もう一つの好みの具体例において、断片は、より大きな核酸配列の一部分を含む。もう一つの態様において、断片核酸分子は、本発明の核酸分子の少なくとも15、25、50、または100の近接するヌクレオチドを有する核酸配列を有する。好みの具体例において、核酸分子は、植物遺伝子の少なくとも15、25、50、または100の近接するヌクレオチドを有する核酸配列を有する。

【0085】

本発明の核酸は、いずれかの配向に有り得る、およびかかる分子がセンスまたはアンチセンスの配向に有り得ると理解される。

【0086】

第1の核酸セグメントを第2の核酸セグメントを持つ多シストロン性構築体またはその一部分に物理的に連結できる。物理的に第1または第2の核酸セグメント内の核酸配列を他の核酸配列セグメントを持つ多シストロン性構築体にまたはその一部に物理的に連結できる。プロモーターを第1の核酸セグメントおよび第2の核酸セグメントを持つ多シストロン性構築体またはその一部分に物理的に連結できる。かかる多シストロン性構築体は、ポリシストロン性mRNAを発現できる。

【0087】

i. 1以上のRNAとして転写できる第1の核酸セグメント

第1の核酸セグメントは、mRNAとして転写および発現できるいずれかの核酸配列で有り得る。ある態様において、その核酸配列は、自然発生の遺伝子または遺伝子の転写されたセグメントのごとき遺伝子の一部分においても判明した核酸配列に対応する。かかる遺伝子はいずれかの生物体からのいずれの遺伝子でも有り得る。好みの態様において、遺伝子は植物からのものである。もう一つの好みの態様において、遺伝子は微生物からのものである。例示的な遺伝子はGMT遺伝子である。mRNAとして転写および発現さ

10

20

30

40

50

れた第1の核酸セグメントは、蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳できる。また、1つの態様において、蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドは、宿主に内因的である。もう一つの態様において、蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドは、通常、植物において見出されない。さらなる態様において、蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列は、非-形質転換宿主において見出されない。

【0088】

また、第1の核酸セグメントは、1を超える蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドをコードする配列を含むことができると理解される。この態様において、蛋白質、その断片、ポリペプチドもしくはペプチドは、通常植物において見出されないまたは非-形質転換宿主において見出されない宿主に内因的な蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドの組合せであり得る。この態様において、第1の核酸セグメントは、2、3、4、5、または5を超える蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドをコードできる。

10

【0089】

ii. 1以上のRNAを抑制できる第2の核酸配列

第2の核酸セグメントは、細胞または生物体に導入された場合、遺伝子によりコードされたmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下、少なくとも部分的に低下または低下できる。本発明のある態様において、遺伝子は内因性遺伝子である。本発明のある態様において、遺伝子は植物遺伝子である。例示的な遺伝子はFAD2遺伝子である。

20

【0090】

また、第2の核酸セグメントは、細胞または生物体に導入された場合に、1、2、3、4、5、またはそれを超えるmRNAのレベルを有効に消失、実質的に低下、少なくとも部分的に低下、あるいは低下できるいすれかの核酸配列で有り得ると理解される。また、この態様において、個々のmRNAは、異なった方法、例えば、RNAiおよびアンチセンス抑制により抑制され得ると理解される。

【0091】

本発明の態様において、好ましくはdsRNA、好ましくはセンスRNA構築体、または好ましくはアンチセンス構築体である本発明の第2の核酸配列は、蛋白質またはmRNAのごときもう一つの剤の少なくとも部分的な低下、より好ましくは実質的な低下または最も好ましくは有効な消失を提供できる。本発明のある態様において、他の剤は、FAD2蛋白質、またはFAD2遺伝子によりコード化されたmRNAである。

30

【0092】

もう一つの態様において、1以上の剤のレベルは、低下、少なくとも部分的に低下、実質的に低下、あるいは有効に消失するが、1以上の同時に、共発現または協調的に発現した剤のレベルが、少なくとも部分的に増強、少なくとも増強または実質的に増強される。

【0093】

さらなる具体例において、核酸分子は、細胞または生物体に導入された場合に、選択的に、第1の遺伝子によりコード化された第1の蛋白質もしくはRNA転写体またはその双方を選択的に増加させ、同時に、第2の遺伝子によりコード化された第2の蛋白質、転写体または双方のレベルを低下させ、また、細胞または生物体のアルファ-トコフェロール含量、油組成物、および油レベルを改変する。

40

【0094】

複数の方法が、遺伝子によりコード化されたmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下または部分的に低下させるように用いることができる。かかる方法は、遺伝子特異的なサイレンシングまたは複数遺伝子のサイレンシングを生じさせることができる。かかる遺伝子サイレンシングの例は、限定なくして、二本鎖RNA分子、アンチセンスおよびセンスRNAの導入により引き起こされたものを含む。

【0095】

50

もう一つの態様において、第2の核酸セグメントは、細胞または生物体に導入された場合に、遺伝子によりコード化された2、3、4、5、または5を超えるmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下、少なくとも部分的に低下、または低下できるいざれかの核酸配列で有り得る。

【0096】

a. dsRNA

遺伝子サイレンシングに用いることができる二本鎖の分子は、転写体で判明した核酸配列に対応する核酸配列を含むdsRNA分子を含む。かかる核酸配列は、限定なくして、蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸配列、および転写されたイントロン、転写された3'非翻訳領域(UTR)および転写された5'UTRに対応するものを含む。

【0097】

本発明の核酸分子の第2の核酸配列の1つのサブセットは、(1)抑制されるべき第2の遺伝子の転写領域に同一性を示す第1のRNA断片、および(2)第1のRNAを持つ二本鎖RNA分子を形成できる第2のRNAを含む二本鎖RNAとして発現される核酸配列である。第1のRNA断片は、抑制されるべき植物遺伝子のかなりの(複数の)部分、または大部分よりなり得る。

【0098】

ある態様において、本発明の核酸分子は、植物細胞または植物にdsRNA構築体として導入された場合に、(複数の)イントロンを誘導する遺伝子によりコードされたmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下、または少なくとも部分的に低下できる第2の植物遺伝子からの1以上の植物イントロンに十分な相同性を示す核酸配列を含む。

【0099】

ある態様において、本発明の核酸分子は、植物細胞または植物にdsRNA構築体として導入された場合に、(複数の)エキソンを誘導する遺伝子によりコード化されたmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下、または少なくとも部分的に低下できる第2の植物遺伝子からの1以上の植物エキソンに十分な相同性を示す核酸配列を含む。

【0100】

ある態様において、本発明の核酸分子は、植物細胞または植物にdsRNA構築体として導入された場合に、(複数の)3'UTRを誘導する遺伝子によりコード化されたmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下、または少なくとも部分的に低下できる第2の植物遺伝子からの1以上の植物の転写された(複数の)3'UTRに十分な相同性を示す核酸配列を含む。

【0101】

ある態様において、本発明の核酸分子は、植物細胞または植物にdsRNA構築体として導入された場合に、(複数の)5'UTRを誘導する遺伝子によりコード化されたmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下、または少なくとも部分的に低下できる第2の植物遺伝子からの1以上の植物の転写された(複数の)5'UTRに十分な相同性を示す核酸配列を含む。

【0102】

もう一つの好ましい態様において、dsRNA構築体は、エキソン配列を含むが、そのエキソン配列は、エキソンを誘導する第2の遺伝子によりコード化されたmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下、または少なくとも部分的に低下できるのに十分な部分の植物エキソンに対応しない。dsRNA構築体での遺伝子発現を抑制する戦略は、2000年6月9日に出願された米国仮特許出願シリアル番号60/390,186号に記載のものを含む。

【0103】

b. アンチセンス抑制

10

20

30

40

50

遺伝子サイレンシングに用いることができるアンチセンス分子は、アンチセンス分子として作用するのに十分な相補性をもつ転写体またはその一部分または分子で見出された核酸配列の相補体に対応する核酸配列を含むいすれかの分子を含む。かかる分子は、限定なくして、蛋白質、その断片またはポリペプチドをコードするものの相補体であり、転写されたイントロン、転写された3'非翻訳領域(UTR)および5'UTRに対応するものの相補体である配列を含む。

【0104】

アンチセンスアプローチは、遺伝物質を標的とすることにより、遺伝子機能を防止または低下させる方法である(Molら, FEBS Lett. 268:427-430 (1990))。アンチセンスアプローチの目的は、標的遺伝子に相補的な配列を用いて、その発現をブロックし、単一の選択された蛋白質のレベルが選択的に低下または消滅する変異細胞系または生物体を創製することにある。不活性化およびその発生効果の部位は、アンチセンス遺伝子用プロモーターの選択、または外部適用もしくはミクロ注入のタイミングにより操作できる。アンチセンスは、標的遺伝子のユニークな領域、またはそれが他の関連する遺伝子と相同性を共有する領域のいすれかの選択によりその特異性を操作できる(Hiattら, In: *Genetic Engineering*, Setlow (ed.), Vol. 11, New York: Plenum 49-63 (1989))。

【0105】

アンチセンスRNA技術は、細胞中への標的mRNAに相補的であるRNAの導入を含み、その結果、特定のRNA:RNAデュプレックスが、アンチセンス基質および標的mRNA間の塩基の対合により形成される(Greenら, Annu. Rev. Biochem. 55:569-597 (1986))。1つの具体例の下、そのプロセスは、アンチセンス遺伝子配列の導入および発現を含む。かかる配列は、その一部分または全ての正常な遺伝子配列が、逆配向においてプロモーター下に配置され、「間違った」または相補的な鎖が標的mRNAとハイブリダイズし、その発現と干渉する非コードアンチセンスRNAに転写されるものである(Takayama and Inouye, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 25:155-184 (1990))。アンチセンスペクターは、標準的な手順により構築され、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、ミクロ注入、感染等により細胞に導入される。形質転換のタイプおよびベクターの選択は、発現が一過性または安定しているかどうかを決定するであろう。アンチセンス遺伝子に用いたプロモーターは、アンチセンス阻害のレベル、タイミング、組織、特異性または誘導性に影響し得る。

【0106】

c. 共抑制 (cosuppression) またはセンス抑制

遺伝子抑制に用いることができるセンス抑制分子は、センス分子として作用するのに十分な相補性を持つ転写体もしくはその一部分または分子において判明する核酸配列に対応する核酸配列を含むいすれの分子も含む。かかる分子は、限定なくして、蛋白質、その断片またはポリペプチドをコードする配列、および翻訳されたイントロン、転写された3'非翻訳領域(UTR)および転写された5'UTRに対応するものを含む

【0107】

共抑制は、内因性遺伝子の転写体と同一の鎖の数(strandedness)のmRNAを転写できる相同性のセンス構築体の発現による特定の内因性遺伝子または遺伝子ファミリーの発現レベル、通常、RNAのレベルにおける低下である(Napoliら, Plant Cell 2:279-289 (1990); van der Krolら, Plant Cell 2:291-299 (1990))。共抑制は、細胞内で見出された核酸配列に相同性である單一コピーの核酸分子(Prolls and Meyer, Plant J. 2:465-475 (1992))、または細胞内で見出された核酸配列に相同性である核酸分子の複数コピー(Mittlestenら, Mol. Gen. Genet. 244:325-330 (1994))での安定した形質転換に起因してもよい。たとえ異なるとしても相同性プロモーターに連結された遺伝子は、その連結した遺伝子の共抑制を生じる(Vaucheret, C.R. Acad. Sci. III 316:1471-1483 (1993); Flavell I, PNAS USA, 91:3490-3496 (1994); van Bloklandら, Plant J. 6:861-877 (1994); Jorgensen, Trends Biotechnol. 8:340-344 (1990); Meins and Kunz, In: *Gene Inactivation and Homologous Recombination in Plants*, Paszkowski (ed.), pp. 335-348, Kluwer 50

Academic, Netherlands (1994)).

【0108】

iii. 抑制または発現核酸分子

本発明の1つの態様において、本発明は、単一のプロモーター配列に作動可能に連結した、2、3、4、5もしくは5を超える蛋白質、その断片、ポリペプチドまたはペプチドをコードできる核酸分子を提供する。

【0109】

本発明のもう一つの態様において、本発明は、細胞または生物体へ導入された場合に、単一のプロモーター配列に作動可能に連結した、2、3、4、5、または5を超えるmRNA転写体のレベルを有効に消失、実質的に低下、少なくとも部分的に低下、または低下できる核酸分子を提供する。

【0110】

C. 構築体 / ベクターの他の成分

また、構築体またはベクターは、注目する領域内に、その領域の転写を終了するために全体的または部分的に作用する核酸配列を含み得る。Tr7 3'配列およびNOS 3'配列を含めた多数のかかる配列が単離されている(Ingelbrechtら, Plant Cell 1:671-680 (1989); Bevanら, Nucleic Acids Res. 11:369-385 (1983))。制御転写終了領域は、本発明の植物発現構築体において同様に提供できる。転写終了領域は、注目する遺伝子をコードするDNA配列、または異なる遺伝子ソースから誘導された便利な転写終了領域、例えば、その転写開始領域と自然に関係する転写終了領域により提供できる。当業者は、植物細胞中で転写を終了できるいすれかの便利な転写終了領域を本発明の構築体において使用できると認識するであろう。

【0111】

また、ベクターまたは構築体は、制御エレメントを含み得る。かかる例は、Adhイントロン1(Callisら, Genes and Develop. 1:1183-1200 (1987))、スクロースシンターゼイントロン(Vasilら, Plant Physiol. 91:1575-1579 (1989))およびTMVオメガエレメント(Gallieら, Plant Cell 1:301-311 (1989))を含む。適切な場合に、これらおよび他の制御エレメントが含まれてもよい。

【0112】

また、ベクターまたは構築体は、選択マーカーを含み得る。また、選択マーカーを用いて、外因性の遺伝物質を含む植物または植物細胞につき選択し得る。かかる例は、限定されるものではないが、カナマイシン抵抗性をコードし、カナマイシン、RptII、G418、hptを用いて選択できるneo遺伝子(Potrykusら, Mol. Gen. Genet. 199:183-188 (1985))；ビアラホス抵抗性をコードするbar遺伝子；変異EPSP合成酵素遺伝子(Hincheeら, Bio/Technology 6:915-922 (1988); Reynaertsら, Selectable and Screenable Markers, In Gelvin and Schilperoort, Plant Molecular Biology Manual, Kluwer, Dordrecht (1988))；グリホサート抵抗性をコードするaadA (Scofieldら, Mol. Gen. Genet. 244(2):189-96 (1994))；プロモキニル(bromoxynil)に対する抵抗性を与えるニトリラーゼ遺伝子(Stalkerら, J. Biol. Chem. 263:6310-6314 (1988))；イミダゾリノンまたはスルホニル尿素抵抗性を与える変異アセトラクテート合成酵素遺伝子(ALS) (欧州特許出願第154,204号(1985年9月11日))；ALS (D'Halluinら, Bio/Technology 10: 309-314 (1992))；ならびにメトトレキサート抵抗性DHFR遺伝子(Thilletら, J. Biol. Chem. 263:12500-12508 (1988))を含む。

【0113】

また、ベクターまたは構築体は、スクリーニングマーカーを含み得る。スクリーニングマーカーは、発現をモニターするために用いられてもよい。典型的なスクリーニングマーカーは：様々な色素形成基質が知られている酵素をコードする -グルクロニダーゼまたはuidA遺伝子(GUS) (Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405 (1987); Jeffersonら, EMBO J. 6:3901-3907 (1987))；植物組織中でアントシアニン色素(赤色)の生成を調節する産物をコードするR座遺伝子(Dellaportaら, Stadler Symposium 11:263-282 (1988))；

10

20

20

30

40

40

50

様々な色素形成基質が知られている（例えば、PADAC、色素生産性セファロスボリン）酵素をコードする遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子(Sutcliffeら, PNAS USA 75:3737-3741 (1978)); ルシフェラーゼ遺伝子(0wら, Science 234:856-859 (1986)); 色素生産性カテコールを変換できるカテコールジオキシゲナーゼをコードするxyIE遺伝子(Zukowskyら, PNAS USA 80:1101-1105 (1983)); β -アミラーゼ遺伝子(Ikedaら, Bio/Technology 8:241-242 (1990)); チロシンをDOPAおよびドーパキノンに酸化でき、今度はメラニンに濃縮する酵素をコードするチロシナーゼ遺伝子(Katzら, J. Gen. Microbiol. 129:2703-2714 (1983)); ならびに色素生産性 β -ガラクトース基質を変化させる酵素をコードする β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む。

【0114】

10

また、「選択またはスクリーニングマーカー遺伝子」なる用語に含まれるのは、形質転換した細胞を同定または選択する手段としてその分泌が検出できる選択マーカーをコードする遺伝子である。例には、抗体相互作用、または触媒的に検出できる選択可能な酵素でさえにより同定できる選択可能な抗原をコードするマーカーが含まれる。選択可能な蛋白質は、（例えば、ELISAにより）検出可能である拡散した小さな蛋白質、細胞外溶液中で検出可能である活性な小さな酵素（例えば、 β -アミラーゼ、 β -ラクタマーゼ、ホスフィノトリシン(phosphinothricin)転移酵素）、あるいは細胞壁中に挿入または捕捉される蛋白質（例えば、伸長の発現ユニットまたはタバコPR-Sにおいて判明したようなリーダー配列を含む蛋白質）を含めた多数のクラスに分類される。他の可能な選択および/またはスクリーニングマーカー遺伝子は、当業者に明らかであろう。

20

【0115】

トランスジェニック植物、そのパーティおよび植物細胞

外因性の遺伝物質は、植物細胞に輸送でき、植物細胞は全体の、多産の、不稔性の植物または植物パーティに再生できる。外因性の遺伝物質は、いずれかの生物体に挿入できるいずれかのソースからの、自然発生またはそうではない、いずれかの遺伝物質である。かかる外因性の遺伝物質は、限定なくして、本明細書に記載のごとき、本発明の核酸配列を含む核酸分子および構築体を含む。

30

【0116】

好ましい態様において、本発明の植物細胞または植物は、第1および第2の核酸配列を含み、該第1の核酸配列は、それが発現される場合に、mRNAの転写体または蛋白質のレベルを少なくとも部分的に増強、増加、増強または実質的に増強でき、該第2の核酸配列は、それが発現される場合に、それを誘導する遺伝子またはその遺伝子に相同性を有するいずれかの遺伝子によりコードされたmRNA転写体または蛋白質のレベルを有効に消失、実質的に低下または少なくとも部分的に低下できるような1以上の植物遺伝子に十分な相同性を示す。

40

【0117】

遺伝子の発現を抑制するいずれの方法も用いることができると理解される。

【0118】

本発明のある態様において、本発明の植物細胞または植物は、GMT遺伝子によりコードされた蛋白質、転写体もしくはその双方を増強でき、同時にFAD2遺伝子によりコードされた蛋白質、転写体もしくはその双方を選択的に低下できる核酸配列を含む核酸分子を含む。

50

【0119】

好ましい態様において、本発明の植物細胞または植物は、第1の核酸セグメントおよび第2の核酸セグメントを含む核酸分子を含み、該第1の核酸セグメント、第2の核酸セグメントまたはその双方は、種子油組成物を変更できる。より好ましい態様において、第1の核酸配列は、それが発現される場合に、アルファ-トコフェロールのレベルを増強でき、第2の核酸セグメントは、それが発現される場合に、オレイン酸もしくは含油量またはその双方のレベルを増強できるような1以上の植物遺伝子の相補体に十分な相同性を示し、該第1の核酸配列および第2の核酸配列は、単一のプロモーター配列に作動可能に連結

している。

【0120】

遺伝物質は、いずれの種類、例えば、限定なくして、単子葉植物または双子葉植物、限定されるものではないが、アルファルファ、リンゴ、*Arabidopsis*、バナナ、大麦、*Brassica campestris*、キャノーラ、トウゴマ、キク、コーヒー、綿、綿実、トウモロコシ、ハマナ、クランベリー、キュウリ、デンドロビウム、ディオスコリア、ユーカリ、ウシノケグサ (fescue)、アマ、グラジオラス、ユリ、アマニ、ミッレト (millet)、マスクメロン、カラシ、オート麦、アブラヤシ、アブラナ、パパイヤ、ピーナツ、多年生植物、*Ph aseolus*、ジャガイモ、菜種、コメ、ライ麦、ライグラス、ベニバナ、ゴマ、モロコシ、ダイズ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、タバコ、トマト、ターフグラスおよび小麦 (C hristou, INO: Particle Bombardment for Genetic Engineering of Plants, Biotechnology Intelligence Unit. Academic Press, San Diego, California (1996)) に導入してもよく、アルファルファ、*Arabidopsis*、*Brassica campestris*、キャノーラ、トウゴマ、トウモロコシ、綿、綿実、ハマナ、アマ、アマニ、カラシ、アブラヤシ、アブラナ、ピーナツ、ジャガイモ、菜種、ベニバナ、ゴマ、ダイズ、ヒマワリ、タバコ、トマトおよび小麦が好ましく、*Brassica campestris*、キャノーラ、トウモロコシ、アブラヤシ、アブラナ、ピーナツ、菜種、ベニバナ、ダイズおよびヒマワリがより好ましい。より好ましい態様において、遺伝物質はキャノーラに移行される。もう一つのより好ましい態様において、遺伝物質はアブラナに移行される。もう一つの特に好ましい具体例において、遺伝物質はダイズまたはトウモロコシに移行される。

10

20

30

【0121】

また、遺伝物質は、植物細胞のごとき適当な細胞に導入し得る。細胞は多細胞性環境下で存在し得る。本発明のある態様において、多細胞性環境は形質転換された植物中で有り得る。

【0122】

また、遺伝物質は、哺乳動物細胞、哺乳動物、魚細胞、魚、トリ細胞、トリ、藻類細胞、藻類、真菌細胞、真菌または細菌細胞のごとき細胞または生物体に導入し得る。好ましい宿主および形質転換体は、*Aspergillus*のごとき真菌細胞、酵母、哺乳動物、特にウシおよびブタ、昆虫、細菌および藻類を含む。特に好ましい細菌は、*Agrobacterium tumefaciens*および大腸菌 (*E. coli*) である。

30

【0123】

転写体または蛋白質のごとき生成物のレベルは、植物のごとき生物体の全体にわたって増加しても、減少しても、またはその双方であってもよく、あるいは生物体の1以上の特定の器官または組織に局在してもよい。例えば、生成物のレベルは、限定なくして、根、塊茎、茎、葉、茎 (stalk)、果実、液果、ナッツ、樹皮、鞘、種子および花を含めた1以上の組織および器官において増加または減少し得る。好ましい器官は種子である。

【0124】

本発明の態様において、本発明の核酸での植物または他の生物体の形質転換の後、1以上の剤のレベルは、少なくとも部分的に増強、増加、増強または実質的に増強され、一方、第2の剤は、その第1の剤と共に、同時に発現、共発現、または協調的に発現される。

40

【0125】

もう一つの態様において、本発明の核酸での植物または他の生物体の形質転換の後、1以上の剤のレベルは少なくとも部分的に増強、増加、増強、または実質的に増強され、一方、第2の剤は、同時に発現、共発現、または協調的に発現され、第2の剤のその同時の発現、共発現または協調的発現の結果、第2の剤を低下、好ましくは少なくとも部分的に低下、実質的に低下または有効に消失させる。

【0126】

もう一つの態様において、本発明の核酸での植物または他の生物体の形質転換の後、1以上の剤のレベルは少なくとも部分的に増強、増加、増強または実質的に増強され、一方、第2の剤は、2または2を超える剤と同時に発現、共発現または協調的に発現される。

50

【0127】

もう一つの態様において、本発明の核酸での植物または他の生物体の形質転換の後、1以上の剤のレベルは、少なくとも部分的に増強、増加、増強または実質的に増強され、一方、第2の剤は、3または3を超える剤と同時に発現、共発現または同等に発現される。

【0128】

もう一つの態様において、本発明の核酸での植物または他の生物体の形質転換の後、1以上の剤のレベルは、少なくとも部分的に増強、増加または実質的に増強され、一方、さらなる剤は、第1の剤と同時に発現、共発現または協調的に発現され、さらなる剤、好ましくは2以上、3以上、4以上または5以上の剤の同時発現、共発現または協調的な発現の結果、1を超える剤、好ましくは2以上、3以上、4以上または5以上の剤を少なくとも部分的に低下、実質的に低下または有効に消失させる。

【0129】

ある態様において、本発明の核酸での植物または他の生物体の形質転換の後に、1以上の剤は、少なくとも部分的に増強、増加、増強または実質的に増強され、一方、もう一つの剤または複数の剤が同時に発現、共発現または協調的に発現し、かかる発現の結果、1つの剤または複数の剤を少なくとも部分的に低下、実質的に低下または有効に消失させる。

【0130】

剤のレベルが比較される場合、かかる比較は類似する遺伝的背景を持つ生物体間で好ましくは行なわれる。好ましい態様において、類似する遺伝的背景は、比較されるべき生物体がそれらの核遺伝物質の50%以上を共有する背景である。より好ましい態様において、類似する遺伝的背景は、比較されるべき生物体がそれらの核遺伝物質の75%以上、さらに好ましくは90%を共有する背景である。もう一つのさらにより好ましい態様において、類似する遺伝的背景は、比較されるべき生物体が植物である背景であり、その植物は、植物形質転換技術を用いて、元来導入されたいずれかの遺伝物質を除いて同質遺伝子的である。

【0131】

好ましい態様において、剤のレベルを部分的に増強、増強または実質的に増強するための核酸配列の能力は、mRNA転写体のレベルの比較により行われる。好ましい態様において、もう一つの遺伝子に対し、遺伝子のレベルを部分的に増強、増強または実質的に増強する核酸配列の能力は、その遺伝子によりコードされた蛋白質、その断片またはポリペプチドのレベルの比較により行われる。好ましい態様において、もう一つの遺伝子に対し、遺伝子のレベルを低下させる核酸配列の能力は、mRNA転写体のレベルの比較により行われる。好ましい態様において、もう一つの遺伝子に対し、遺伝子のレベルを低下させる核酸配列の能力は、遺伝子によりコードされた蛋白質、その断片またはポリペプチドのレベルの比較により行われる。本明細書に用いたmRNAの転写体は、処理されるか、または処理されないmRNA転写体を含む。本明細書に用いた蛋白質、その断片またはポリペプチドは、いずれかの翻訳後修飾を持つか、または翻訳後修飾がない蛋白質、その断片またはポリペプチドを含む。もう一つの好ましい態様において、もう一つの遺伝子に対し、遺伝子のレベルを増加させる核酸分子の能力は、発現型の比較により行われる。好ましい態様において、発現型の比較はアルファ-トコフェロール含量の比較である。好ましい態様において、発現型の比較は脂肪酸組成の比較である。好ましい態様において、発現型の比較は合計の油レベルの比較である。

【0132】

植物または生物体に核酸分子を導入する方法

植物細胞に核酸分子を導入する多数の方法が存在する。適当な方法は、核酸分子を、Agrobacterium感染、あるいは例えれば、トランスフェクション、注入、プロジェクション(projection)、PEG媒介形質転換、DNA被覆粒子のエレクトロポレーションまたは促進によるように核酸分子の直接的な送達等により細胞に導入し得るいずれかの方法を実質的に含むと考えられる(Potrykus, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:205-

225 (1991); Vasil, *Plant Mol. Biol.* 25:925-937 (1994))。例えば、エレクトロポレーションを用いて、トウモロコシプロトプラストが形質転換されている (Frommら, *Nature* 312:791-793 (1986))。

【0133】

また、核酸は、限定されるものではないが、接合、エンドサイトーシスおよび食作用を含めた方法を介して生物体に導入できる。さらに、核酸は、植物、植物細胞、藻類、藻類細胞、真菌、真菌細胞、細菌細胞、哺乳動物細胞、魚細胞またはトリ細胞から誘導された細胞または生物体に導入できる。特に好ましい微生物は、*E. coli*および*Agrobacterium*の種である。

【0134】

細胞へのDNAの導入のための技術は当業者によく知られている。細胞へ遺伝子を送達する一般的な4つの方法が記載されている:(1)化学的方法(Graham and van der Eb, *Virology* 54:536-539 (1973));(2)ミクロ注入(Capecchi, *Cell* 22:479-488 (1980))、エレクトロポレーション(Wong and Neumann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:584-587 (1982); Frommら, *PNAS USA* 82:5824-5828 (1985); 米国特許第5,384,253);遺伝子銃(Johnston and Tang, *Methods Cell Biol.* 43:353-365 (1994));および真空浸潤(Bechtoldら, *C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* 316:1194-1199. (1993))のごとき物理的方法;(3)ウイルスベクター(Clapp, *Clin. Perinatol.* 20:155-168 (1993); Luら, *J. Exp. Med.* 178:2089-2096 (1993); Eglitis and Anderson, *Biotechniques* 6:608-614 (1988));ならびに(4)受容体媒介メカニズム(Curielら, *Hum. Gen. Ther.* 3:147-154 (1992); Wagnerら, *PNAS USA* 89:6099-6103 (1992))。

【0135】

用い得る促進方法は、例えば、微粒子銃等を含む。植物細胞へ形質転換する核酸分子を送達する方法の1例は、微粒子銃である。この方法は、Yang and Christou (eds.), *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, Oxford Press, Oxford, England (1994)により概説されている。非生物学的な粒子(微粒子銃)は、核酸分子で覆われ、推進力により細胞に送達され得る。典型的な粒子は、タンゲステン、金、白金等よりなるものを含む。

【0136】

微粒子銃の特定の利点は、それが繁殖的に単子葉植物を形質転換する有効な方法であることに加えて、プロトプラストの単離(Cristouら, *Plant Physiol.* 87:671-674 (1988))も*Agrobacterium*感染に対する感受性も必要ではないことである。促進によりトウモロコシ細胞にDNAを送達する方法の例示的な具体的な例は、微粒子銃(biolistics)粒子送達システムであり、それを用いて、ステンレス鋼またはNytexのスクリーンのごときスクリーンを通ってDNAで覆われた粒子を懸濁液中で培養されたトウモロコシ細胞で覆われていたフィルター表面上に推進できる。Gordon-Kammらは、DNAでタンゲステン粒子を覆うための基本的な手順を記載している(Gordon-Kammら, *Plant Cell* 2:603-618 (1990))。それらが大きな凝集物中の受容細胞に送達されないように、スクリーンはタンゲステン核酸粒子を分散させる。本発明での使用に適する粒子送達システムは、Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad, Hercules, California)から入手可能であるヘリウム促進PDS-1000/He銃である(Sanfordら, *Technique* 3:3-16 (1991))。

【0137】

その微粒子銃では、懸濁液中の細胞はフィルターに濃縮され得る。衝撃されるべき細胞を含むフィルターは、微粒子銃(microprojectile)停止板より下の適当な距離に配置する。また、所望ならば、1以上のスクリーンを、銃と衝撃されるべき細胞との間に配置する。

【0138】

あるいは、未成熟胚または他の標的細胞を固形培養基上に配列し得る。衝撃されるべき細胞は、微粒子銃の停止板より下の適当な距離に配置する。また、所望ならば、1以上のスクリーンを、促進デバイスと衝撃されるべき細胞との間に配置する。本明細書に記載さ

10

20

30

40

50

れた技術の使用を通して、一時的にマーカー遺伝子を発現する細胞の1000以上の座を得てもよい。衝撃48時間後の外因性遺伝子産物を発現する焦点における細胞数は、しばしば1~10個の範囲にあり、1~3個を平均とする。

【0139】

衝撃形質転換において、衝撃前培養条件および衝撃パラメーターを最適化して、最大数の安定した形質転換体を得てもよい。衝撃用の物理的および生物学的パラメーターの双方は、この技術において重要である。物理的因子は、DNA/微粒子銃沈澱物を操作することを含むもの、またはマクロまたはミクロの粒子銃のいずれかの飛行および速度に影響するものである。生物学的因子は、衝撃前および衝撃直後にて細胞の操作に関する全ての工程、衝撃と関連する外傷を緩和するのに役立つ標的細胞の浸透圧調整、およびさらに線形化されたDNAまたは完全なスーパーコイルのプラスミドのごとき形質転換するDNAの性質を含む。衝撃前操作は未成熟な胚の成功した形質転換に特に重要であると考えられる。

【0140】

従って、小規模試験における衝撃パラメーターの種々の態様を調節して、その条件を完全に最適化したいかもしれないと考えられる。特に、ギャップ距離、飛行距離、組織距離およびヘリウム圧のごとき物理的なパラメーターを調節したいかもしれない。また、受容細胞の生理的状態に影響し、従って形質転換および組込みの効率に影響し得る条件を修飾することにより外傷低下因子を最小化し得る。例えば、受容細胞の浸透状態、組織水和、および二次培養ステージまたは細胞周期を最適な形質転換のために調整し得る。他の定期調整の実施は本開示に照らして当業者に公知であろう。

【0141】

DNAを全植物組織に導入でき、それにより、プロトプラストからの完全な植物の再生の必要性を回避するため、Agrobacterium媒介トランスクターは、植物細胞に遺伝子を導入するための広範囲に適用可能なシステムである。植物細胞にDNAを導入するベクターを組込むAgrobacterium媒介とした植物の使用は、当該技術分野においてよく知られている。

例えば、Fraleyら, Bio/Technology 3:629-635 (1985)およびRogersら, Methods Enzymol. 153:253-277 (1987)により記載された方法を参照。さらに、Ti-DNAの組込みはわずかな再配列を生じる比較的正確なプロセスである。移行されるべきDNAの領域は、境界配列により規定され、介在するDNAは、記載のごとき植物ゲノムに通常挿入される(Spielmannら, Mol. Gen. Genet. 205:34 (1986))。

【0142】

現代のAgrobacterium形質転換ベクターは、E. coliならびにAgrobacterium中で複製でき、Kleeら, in Plant DNA Infectious Agents, Hohn and Schell (eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985)に記載のごとき便利な操作を可能とする。さらに、Agrobacteriumを媒介とした遺伝子移入のためのベクターにおける技術的進歩は、様々なポリペプチドをコードする遺伝子を発現できるベクターの構築を促すようにベクターにおける遺伝子および制限部位の配置を改善してきた。言及されたベクターは、挿入されたポリペプチドコード遺伝子の直接的な発現のためのプロモーターおよびポリアデニル化部位により隣接して挿まれた便利な多リンカー領域を有し、そのベクターは、現在の目的に適している(Rogersら, Methods Enzymol. 153:253-277 (1987))。加えて、武装(armed)および安全化した双方のTi遺伝子を含むAgrobacteriumは、形質転換に用いることができる。Agrobacteriumを媒介する形質転換が有効であるそれらの植物株において、それは、遺伝子移入の容易さおよび規定された性質のために選択の方法である。

【0143】

Agrobacterium形質変換法を用いて形成されたトランスクレッセニック植物は、典型的には1つの染色体上の単一の遺伝子を含む。かかるトランスクレッセニック植物はさらなる遺伝子にヘテロ接合性であるということができる。さらなる構造遺伝子にホモ接合性であるトランスクレッセニック植物；すなわち、2つのさらなる遺伝子を含み、1つの遺伝子が染色体対

10

20

30

40

50

の各染色体上の同一座にあるトランスジェニック植物がより好ましい。ホモ接合性トランスジェニック植物は、単一のさらなる遺伝子を含むトランスジェニック植物の独立した分離体を性的に接合(自殖(selfing))し、生成された種子のうちのいくらかを発芽させ、次いで注目する遺伝子につき生成された得られた植物を分析することにより得ることができる。

【0144】

また、2つの異なるトランスジェニック植物は、独立して分離している2つの外因性構築体を含む子孫を生成するように交配できると理解されるべきである。適当な子孫の自殖は、注目するポリペプチドをコードする双方のさらなる外因性遺伝子にホモ接合性である植物を生成できる。親植物への戻し交配および非トランスジェニック植物でアウトクロッシング(out-crossing)が栄養繁殖であると考えられる。10

【0145】

植物プロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム沈降、ポリエチレングリコール処理、エレクトロポレーションおよびこれらの処理の組合せに基づいた方法を用いて達成できる(例えば、Potrykusら, Mol. Gen. Genet. 205:193-200 (1986); Lorzら, Mol. Gen. Genet. 199:178 (1985); Frommら, Nature 319:791 (1986); Uchimiyaら, Mol. Gen. Genet. 204:204 (1986); Marcotteら, Nature 335:454-457 (1988)参照)。異なる植物株に対するこれらのシステムの適用は、プロトプラストからのその特定の植物株を再生する能力に依存する。プロトプラストからのシリアルの再生のための例示的な方法が記載されている(Fujimuraら, Plant Tissue Culture Letters 2:74 (1985); Toriyamaら, Theor. Appl. Genet. 205:34 (1986); Yamadaら, Plant Cell Rep. 4:85 (1986); Abdullahら, Biotechnology 4:1087 (1986))。20

【0146】

プロトプラストからうまく再生できない植物株を形質転換するために、本来の細胞または組織へDNAを導入する他の方法が利用できる。例えば、記載のごとく、未成熟胚または外植片からのシリアルの再生が達成できる(Vasil, Bio/Technology 6:397 (1988))。加えて、「粒子銃」または高速度微粒子銃技術が利用できる(Vasilら, Bio/Technology 10:667 (1992); Kleinら, Nature 328:70 (1987); Kleinら, PNAS USA 85:8502-8505 (1988); McCabeら, Bio/Technology 6:923 (1988)に記載のごとく、その後者の技術を用いて、DNAは、細胞壁を通って、小金属粒子の表面上の細胞質に運ばれる。金属粒子は、細胞のいくつかの層に入り込み、かくして組織外植片内の細胞の形質転換を可能とする。30

【0147】

主として、*Agrobacterium tumefaciens*の使用により、双子葉植物を形質転換し、トランスジェニック植物を得る方法は、綿(米国特許第5,004,863号; 米国特許第5,159,135号; 米国特許第5,518,908号);ダイズ(米国特許第5,569,834号; 米国特許第5,416,011号; McCabeら, Biotechnology 6:923 (1988); Christouら, Plant Physiol. 87:671-674 (1988));*Brassica*(米国特許第5,463,174号);*Brassica*(米国特許第5,463,174号);ピーナツ(Chengら, Plant Cell Rep. 15:653-657 (1996), McKentlyら, Plant Cell Rep. 14:699-703 (1995));パパイヤ;エンドウ(Grantら, Plant Cell Rep. 15:254-258 (1995));および*Arabidopsis thaliana*(Bechtoldら, C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sci. 316:1194-1199 (1993))について公開されている。*Arabidopsis thaliana*を形質転換する後者の方法は、「浸漬(dipping)」もしくは真空浸潤または生殖質形質転換と一般的に呼ばれる。40

【0148】

また、エレクトロポレーション、粒子衝撃および*Agrobacterium*を用いる单子葉植物の形質転換も報告されている。形質転換および植物再生は、アスパラガス(Bytebierら, PNAS USA 84:5354 (1987));大麦(Wan and Lemaux, Plant Physiol. 104:37 (1994));トウモロコシ(Rhodesら, Science 240:204 (1988); Gordon-Kammら, Plant Cell 2:603-618 (1990); Frommら, Bio/Technology 8:833 (1990); Kozielら, Bio/Technology 11:194 (1993); Armstrongら, Crop Science 35:550-557 (1995));オート麦(Somersら, Bio/Tech 50

nology 10:1589 (1992)); カモガヤ (orchard grass) (Hornら, Plant Cell Rep. 7:469 (1988)); コメ (Toriyamaら, Theor Appl. Genet. 205:34 (1986); Partら, Plant Mol. Biol. 32:1135-1148 (1996); Abediniaら, Aust. J. Plant Physiol. 24:133-141 (1997); Zhang and Wu, Theor. Appl. Genet. 76:835 (1988); Zhangら, Plant Cell Rep. 7:379 (1988); Battraw and Hall, Plant Sci. 86:191-202 (1992); Christouら, Bio/Technology 9:957 (1991)); ライ麦 (De la Penaら, Nature 325:274 (1987)); サトウキビ (Bower and Birch, Plant J. 2:409 (1992)); ヒロハノウシノケグサ (tall fescue) (Wangら, Bio/Technology 10:691 (1992)) ならびに小麦 (Vasilら, Bio/Technology 10:667 (1992)); 米国特許第5,631,152)において達成されている。

【0149】

クローン化された核酸構築体の一過性発現に基づいた遺伝子発現についてのアッセイ方法は、ポリエチレンギリコール(PEG)処理、エレクトロポレーションまたは粒子衝撃により植物細胞に核酸分子を導入することにより開発されてきた (Marcotteら, Nature 335:454-457 (1988); Marcotteら, Plant Cell 1:523-532 (1989); McCartyら, Cell 66:895-905 (1991); Hattoriら, Genes Dev. 6:609-618 (1992); Goffら, EMBO J. 9:2517-2522 (1990))。一過性の発現系を用いて、遺伝子構築体を機能的に分析し得る(一般的には, Malignaら, Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press (1995)参照)。

【0150】

本発明のいずれの核酸分子も持続性または一過性に植物細胞に導入し得る。本発明の核酸分子は、核、葉緑体またはミトコンドリアのゲノムに、好ましくは、核ゲノムに組み込まれてもよい。

【0151】

また、細胞または生物体の形質転換の他の方法を用いることができ、それは、限定されるものではないが、花粉への直接的なDNAトランスファー (Hessら, Intern Rev. Cytol. 107:367 (1987); Luoら, Plant Mol Biol. Reporter 6:165 (1988))、植物の再生器官へのDNAの直接的注入 (Penaら, Nature 325:274 (1987))、プロトプラストへのDNAの直接的ミクロ注入 (Crosswayら, Mol. Gen. Genet. 202: 179-185 (1986))、あるいは未成熟胚の細胞へのDNAの直接的注入後の乾燥した胚の再水和 (Neuhausら, Theor. Appl. Genet. 75:30 (1987))による植物へのDNAの導入を含む。EP 0 238 023; Yeltonら, PNAS USA, 81:1470-1474 (1984); Malardierら, Gene, 78:147-156 (1989); Becker and G uarente, In: Abelson and Simon (eds.), Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Method Enzymol., Vol. 194, pp. 182-187, Academic Press, Inc., New York; Itoら, J. Bacteriol., 153:163 (1983); Hinnenら, PNAS USA, 75:1920 (1978); and Bennett and LaSure (eds.), More Gene Manipulation in fungi, Academic Press, CA (1991)参照。

【0152】

単一の植物プロトプラスト形質転換体、または種々の形質転換された外植片からの植物の再生、発育および栽培は、当該技術分野においてよく知られている (Weissbach and Weissbach, In Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, CA, (1988))。この再生および成長過程は、典型的には、形質転換細胞の選択、ならびに胚発生の通常のステージを介する、および根を下ろした苗木のステージを介するそれらの個別の細胞を培養する工程を含む。遺伝子導入の胚および種子は同様に再生される。その後、得られた導入遺伝子の根を下ろした苗条は、土壤のごとき適当な植物生育媒体中で植えられる。

【0153】

注目する蛋白質をコードする外来性の外因性遺伝子を含む植物の生育または再生は、当該技術分野においてよく知られている。好ましくは、再生された植物を自家受粉して、ホモ接合性のトランスジェニック植物を提供する。そうでなければ、再生された植物から得られた花粉は、作物学的に重要な系の種子生育された植物に交配される。逆に、これらの重要な系の植物からの花粉を用いて、再生された植物を受粉する。所望のポリペプチドを

10

20

30

40

50

含む本発明のトランスジェニック植物は、当業者によく知られた方法を用いて培養される。

【0154】

植物組織からの植物の再生のための種々の方法が存在する。特定の再生方法は、再生されるべき開始植物組織および特定の植物類に依存するであろう。

【0155】

また、本発明は、植物のパートの再生、特に、再生または貯蔵部の再生を提供する。植物パートは、限定なくして、種子、胚乳、胚珠、花粉、根、塊茎、葉、茎、果実、液果、ナッツ、樹皮、鞘および花を含む。本発明の特に好ましい具体例において、植物パートは種子である。

10

【0156】

本発明の植物またはそのパートのいずれも、餌、ミール、蛋白質または油調製物を生成するために加工し得る。この目的のための特に好ましい植物パートは種子である。好ましい具体例において、餌、ミール、蛋白質または油調製物は家畜動物もしくはヒト、または双方のために設計される。餌、ミール、蛋白質および油調製物を生成する方法は、当該技術分野において知られている。例えば、米国特許第4,957,748号、第5,100,679号、第5,219,596号、第5,936,069号、第6,005,076号、第6,156,227号参照。好ましい具体例において、蛋白質調製物は、高蛋白質調製物である。かかる高蛋白質調製物は、好ましくは5%w/v、より好ましくは10%w/v、さらに好ましくは15%w/vを超える蛋白含有量を有する。好ましい油調製物において、油調製物は、5%w/v、より好ましくは10%w/v、さらに好ましくは15%w/vを超える本発明の植物またはそのパートから誘導された油含量を持つ高値の油調製物である。好ましい具体例において、油調製物は液体である。好ましい具体例において、油調製物は、1、5、10または50リットルを超える体積である。本発明は、本発明の植物から生成されたか、本発明の方法により生成された油を供する。かかる油は増強された酸化安定性を示し得る。また、かかる油はいずれかの合成の生成物の微量成分または主成分であり得る。さらに、かかる油は他の油に混ぜ合わせてもよい。好ましい具体例において、本発明の植物から生成されたか、本発明の方法により生成された油は、体積または重量により0.5%、1%、5%、10%、25%、50%、75%または90%を超えて、いずれかの組成物の油成分を構成する。もう一つの具体例において、油調製物を混合し、体積により混合物の10%、25%、35%、50%または75%を超えて構成できる。本発明の植物から生成された油は、1以上の有機溶媒または石油蒸留物と混合できる。

20

【0157】

本発明の植物は、育種プログラムの一部分であり得、または育種プログラムから生成できる。育種方法の選択は、植物再生の様式、改善されるべき形質（群）の遺伝率、および商業上用いられる品種のタイプ（例えば、 F_1 雑種品種、純系品種等）に依存する。本発明の植物の育種の選択される非限定のアプローチを以下に記載する。育種プログラムは、いずれかの交配の子孫のマーカーに支援された選択を用いて増強できる。いずれの商業的および非商業的な品種も育種プログラムに利用できるとさらに理解される。例えば、発芽力、成長（vegetative）力、ストレス耐性、耐病性、分枝、開花、結実、種子サイズ、種子密度、スタンダビリティ（standability）および脱粒性（threshability）のごとき因子は、一般的に選択を決定づけるであろう。

30

【0158】

高度に遺伝性の形質については、単一の位置で評価された優れた個体植物の選択は有効であるが、低遺伝率を持つ形質については、選択は、関連する植物のファミリーの複製された評価から得られた平均値に基づくべきである。ポピュラーな選択方法は、一般的に系統選択、修飾された系統選択、集団選択および循環選択を含む。好ましい具体例において、戻し交配または再発性育種プログラムが試みられる。

40

【0159】

遺伝の複雑さは、育種方法の選択に影響する。戻し交配育種法を用いて、高度に遺伝性

50

の形質のための 1 または少数の好ましい遺伝子を望ましい品種に移行できる。このアプローチは、耐疾患性の品種を生育させるために広範囲に用いられている。種々の反復性選択技術を用いて、定量的に多数の遺伝子により制御された遺伝的特性が改善される。作物の自家受粉における反復性選択の使用は、受粉の容易さ、各受粉からの成功した雑種の頻度、および個々の成功した交配からのハイブリッド子孫数に依存する。

【 0 1 6 0 】

育種系をテストし、2 以上の世代につき、商用標的領域を示す環境での適当な基準と比較できる。その最良の系は、新しい商品品種に対する候補であり；形質がまだ不足しているものを親として用いて、さらなる選択のための新しい集団を生成し得る。

【 0 1 6 1 】

優れた植物を同定する 1 つの方法は、他の実験植物、および広範囲に成長した標準品種に対して、その能力を観察することである。単一の観察が決定的でないならば、反復した観察は、その遺伝価値のより良好な判断を提供できる。生育者は、2 以上の親の系を選択および交配し、自殖および選択を反復し、多数の新しい遺伝子の組合せを生成できる。

【 0 1 6 2 】

新しい品種の発生は、変種の発生および選択、これらの変種の交配および優れたハイブリッド交配の選択を必要とする。そのハイブリッド種子は、選択された雄 - 多産の親間のマニュアル交配により、または雄性不稔性システムを用いることにより生成できる。雑種は、鞘色、花色、種子産出、成熟期の色または除草剤抵抗性のごときある種の単一の遺伝子形質につき選択され、それは、種子が本当に雑種であることを示す。親系のさらなるデータならびに雑種の発現型は、特定のハイブリッド交配を継続すべきであるかの生育者の決定に影響する。

【 0 1 6 3 】

系統育種および反復性選択の育種方法を用いて、育種集団からの品種を発生できる。育種プログラムは、2 以上の品種または種々の広範囲のソースからの所望の形質を、品種が自殖および所望の発現型の選択により発生した育種プールに組み合わせる。新しい品種を評価して、商用可能性を有するかを決定できる。

【 0 1 6 4 】

系統育種は、自家受粉する作物の改良に一般的に用いられる。好ましい相補的な形質を所有する 2 つの親が F_1 を生成するように交配される。 F_2 集団は、1 またはいくつかの F_1 を自殖することにより生成される。最良のファミリーからの最良の個体の選択が行なわれる。ファミリーの反復性テストは、 F_4 世代において開始して、低遺伝率を持つ形質のための選択の有効性を改善できる。同系交配(すなわち、 F_6 および F_7)の進行したステージでは、最良の系または発現型で類似する系の混合物は新しい品種として潜在的な放出につきテストされる。

【 0 1 6 5 】

戻し交配育種法を用いて、単に遺伝性の高度に遺伝可能な形質についての遺伝子を、反復親である所望のホモ接合性の品種または同系繁殖系に移行させる。移行されるべき形質のソースは供与親と呼ばれる。得られた植物は、反復親の属性(例えば、品種)および供与親から移行した所望の特質を有すると期待される。最初の交配後、供与親の発現型を所有する個体は選択され、反復親に反復して交配(戻し交配)された。得られた親は、反復親の属性(例えば、品種)および供与親から移行した望ましい形質を有すると期待される。

【 0 1 6 6 】

厳密な意味における単一種子の家系手順(descent procedure)は、分離集団を植えて、1 つの植物当たり 1 粒の種子の試料を収穫し、次いで次世代を植えるために 1 粒の種子試料を用いることをいう。その集団が、 F_2 から同系交配の所望のレベルまで進んだ場合に、それからの系が導き出す植物は各々異なった F_2 個体に遡るであろう。集団における植物数は、発芽するいくつかの種子またはいくつかの植物の少なくとも 1 粒の種子の生成の失敗により各世代は低下する。結果的に、その集団において元来サンプリングされた F_2 植物のすべてが、世代進行が完了した場合の子孫により表されるであろう。

10

20

30

40

50

【0167】

複数の種子手順において、生育者は、集団における各植物からの1以上の鞘を一般的に収穫し、それらを一緒に脱殻してバルクを形成する。そのバルクの一部分を用いて、次の世代を植え、次いで、一部分を保存する。その手順は、修飾された単一種子の家系または鞘バルク技術と呼ばれている。

【0168】

複数の種子の手順を用いて、収穫での労力を省いてきた。単一種子の手順のための手により各々から1粒の種子を取り出すより機械で鞘を脱殻する方がかなり速い。また、その複数種子の手順は、各世代の生育にて集団の同数の種子を植えることを可能にする。

【0169】

異なる形質および作物に一般的に用いられる他の育種方法の説明は、いくつかの参考図書のうちの1つで見出すことができる(例えば、Fehr, *Principles of Cultivar Development* Vol. 1, pp. 2-3 (1987))。

【0170】

また、本発明のトランスジェニック植物は、アポミクシスを用いて再生し得る。アポミクシスは、胚が卵および精子の結合なくして形成される植物における遺伝学的に制御された再生法である。3つの基本的なタイプのアポミクシスの生殖: 1)胚が核から誘導された胚囊において染色体が減少していない卵から発生する無胞子生殖、2)胚が大胞子母細胞から誘導された胚囊における減少していない卵から発生した複相胞子生殖、および3)胚が体細胞から直接的に発生した不定胚形成が存在する。大部分の形態のアポミクシスにおいて、胚乳を生成する極核の偽受精または受精は種子生存性に必要である。無胞子生殖では、ナース品種(*nurse cultivar*)は種子中での胚乳形成のための花粉源として用いることができる。その品種の減少していない卵が単為生殖的に発生するが、可能な胚乳生成をするので、ナース品種は、無胞子生殖のアポミクシスの品種の遺伝学に影響しない。アポミクシスは、それがいずれかの遺伝子型が、どんなにヘテロ接合でも、本当に生育するのを可能とするために、特にトランスジェニック植物において、経済的に重要である。かくして、アポミクシス生殖で、ヘテロ接合のトランスジェニック植物は、繰り返された生活環の全体でそれらの遺伝適合度を維持できる。アポミクシスの植物の生成のための方法は当該技術分野において知られている。例えば、米国特許第5,811,636号参照。

以下の例は例示であり、何ら制限することを意図するものではない。

10

20

30

40

【0171】

実施例1

この実施例は、本発明の実施を示すために調製された構築体を示す。

図1に関して、連続して、

- (a) ナピンプロモーターのDNA、
- (b) *Gossypium hirsutum*(綿)から単離されたガンマ・メチルトランスフェラーゼ(GMT)をコードするDNA、
- (c) *Arabidopsis thaliana* fad2の3'UTRのセンス配向したDNA、
- (d) スプライス部位が除去された*Arabidopsis thaliana* fad2中のイントロンのDNA、

(e) (c)エレメントの相補体、すなわち、*Arabidopsis thaliana* fad2の3'UTRのアンチセンス配向したDNA、

(f) ナピン3'ターミネーターのDNA

を含むDNA構築体のエレメントを模式的に示す。

【0172】

その構築体は、BARマーカーエレメントと一緒に、*Agrobacterium tumefaciens*からのT1境界の間でベクターに挿入した。配列番号:5に関して、pMON75565と指定されたベクターの適当なDNAエレメントを表1に記載する。

【0173】

【表1】

表1

ベクターpMON75565のエレメント

塩基	DNAセグメントの記載
1-285	Agrobacterium tumefaciensの右境界
520-2282	ナピンプロモーター
2344-3381	Gossypium hirsutum gmt
3425-3470	ナピン 3'転写ターミネーター
3545-3678	センス配向のfad2 3'UTR
3687-4818	fad2 イントロン
4823-4947	アンチセンス配向のfad2 3'UTR
4985-6199	ナピン 3'転写ターミネーター
6381-6780	CaMV 3'5Sプロモーター
6781-7328	BARマーカー遺伝子
7333-7590	NOS転写ターミネーター
7597-8179	Agrobacterium tumefaciensの左境界

10

20

30

40

50

【0174】

図2に関して、連続して、

- (a) ナピンプロモーターのDNA、
 (b) Gossypium hirsutum(綿)から単離されたガンマ・メチルトランスフェラーゼ(GMT)をコードするDNA、
 (c)スプライス部位が除去されたArabidopsis thaliana fad2中のイントロンのDNA、
 および
 (d) ナピン 3'ターミネーターのDNA
 を含むDNA構築体のエレメントを模式的に示す。

【0175】

その構築体はBARマーカーエレメントと一緒にAgrobacterium tumefaciensからのTI境界の間でベクターに挿入した。配列番号:6に関して、pMON75571と指定されたベクターの適当なDNAエレメントを表2に記載する。

【0176】

【表2】

表2

ベクターpMON75571のエレメント

塩基	DNAセグメントの記載
1-285	Agrobacterium tumefaciensの右境界
520-2282	ナピンプロモーター
2344-3381	Gossypium hirsutum gmt
3396-4515	fad2イントロン
4519-5733	ナピン 3'転写ターミネーター
5915-6314	CaMV 3'5Sプロモーター、
6315-6862	BARマーカー遺伝子
6867-7124	NOS転写ターミネーター
7131-7713	Agrobacterium tumefaciens左境界

【0177】

pMON75565およびpMON75571での植物の形質転換

ベクターのpMON75565およびpMON75571を、GMTの発現を指令し、fad2遺伝子の発現を抑制するためにArabidopsis thaliana植物形質転換において用いる。

バイナリーベクター構築体 pMON75565 および pMON75571 は、Holstersら, Mol. Gen. Genet. 163:181-187 (1978) の方法により ABI 株 Agrobacterium 細胞に形質転換する。トランスジェニック *Arabidopsis thaliana* 植物は、Valverkensら, PNAS USA 85: 5536-5540 (1988), Bentら, Science 265:1856-1860 (1994), および Bechtoldら, C.R. Acad. Sci., Life Sciences 316:1194-1199 (1993) に記載された Agrobacterium を媒介とした形質転換により得る。トランスジェニック植物を、土壤に直接的に形質転換された R1 種子をまき、次いで光の不存在下の 4¹⁰ にて 4 日間それらを春化処理することにより選択する。次いで、その種子を 21¹⁰ の 16 時間光に移し、播種後 7 および 14 日にて Finale (フィナーレ) (Basta) 除草剤の 1:200 希釀をスプレーする。形質転換された植物を成熟まで生育し、生成された R₂ 種子をトコフェロール含量について分析する。

【0178】

表 3 A および 3 B は、ナビンの種子に特異的なプロモーターの管理の下で、pMON75565 (図 3 A) または pMON75571 (図 3 B) からの GMT を発現するトランスジェニック *Arabidopsis thaliana* の R₂ 種子からのアルファトコフェロールレベル分析からのデータを示す。以下の表 3 は、種々の形質転換および制御された植物系についての特定のトコフェロールレベル結果 (アルファ、ガンマおよびデルタ) を与える。

【0179】

【表3】

表3

構築体	アルファ Toco	ガンマ Toco	デルタ Toco	合計 Toco	%アルファ	世代
対照	7	453	12	472	1.5	R3
	9	446	12	467	1.9	R3
	5	440	10	455	1.1	R3
	7	460	12	479	1.5	R3
	9	460	13	482	1.9	R3
	6	443	10	459	1.3	R3
	6	459	11	476	1.3	R3
	8	456	10	474	1.7	R3
	6	447	11	464	1.3	R3
	7	436	9	452	1.5	R3
pMON 75565	67	386	11	464	14.4	R2
	320	152	5	477	67.1	R2
	304	142	6	452	67.3	R2
	309	142	5	456	67.8	R2
	292	134	4	430	67.9	R2
	320	143	5	468	68.4	R2
	360	145	5	510	70.6	R2
	317	121	4	442	71.7	R2
	329	124	4	457	72.0	R2
	336	79	3	418	80.4	R2
	369	78	3	450	82.0	R2
	392	68	4	464	84.5	R2
	391	66	4	461	84.8	R2
	422	51	2	475	88.8	R2
pMON 75571	10	492	13	515	1.9	R2
	137	350	8	495	27.7	R2
	296	166	5	467	63.4	R2
	313	136	5	454	68.9	R2
	364	124	4	492	74.0	R2
	354	119	3	476	74.4	R2
	371	91	2	464	80.0	R2
	381	87	2	470	81.1	R2
	391	52	2	445	87.9	R2
	422	55	3	480	87.9	R2
	436	54	2	492	88.6	R2
	410	45	2	457	89.7	R2
	449	45	1	495	90.7	R2
	439	31	1	471	93.2	R2
	475	22	1	498	95.4	R2

【0180】

図3Aおよび3Bならびに表3は、その構築体が、形質転換されていない植物系と比較して、形質転換された植物系でアルファ-トコフェロールのレベルを増加させたことを示

10

20

30

40

50

す。

【0181】

脂肪酸組成は、構築体 pMON75565 と pMON75571 で形質転換された *Arabidopsis* 系の種子からガスクロマトグラフィーを用いて分析する。表 4 は、これらの構築体を用いて得られた脂肪酸レベルの要約を提供する。見られるように、発現 pMON75565 構築体の結果、オレイン酸(18:1)の発現が増加し、リノール酸(18:2)およびリノレン酸(18:3)の発現が軽度に減少し、ステアリン酸(18:0)のレベルは実質上変化しない。12:0、14:0、16:0、16:1、20:0、20:1、20:2、22:0、22:1 および 22:2 脂肪酸レベルにおいて有意な変化はない。pMON75571 および pMON75565 についての結果は異なる。さらに、センス抑制と比較して、RN 10 Ai 抑制を用いるとより効率で成功する。

【0182】

表 5 は、記載された構築体を用いて得られる油レベルの要約を提供する、見られるように、蛋白質、炭素、窒素および硫黄の合計レベルは、対照構築体に比較して、pMON75565 および pMON75571 構築体が用いられる場合と事実上同一のままである。

【0183】

図 4 は、pMON75565 および pMON75571 構築体を用いて得られる脂肪酸および油レベルの双方の図表による報告を示す。系 AT G490 および AT G499 (双方は pMON75565 を用いて得られた) は、最高のオレイン酸を有し、アルファ - トコフェロール表現型を示し、双方は、次世代につきトコフェロールおよびオレイン酸ならびに油分分析を受ける。二本鎖 FAD2 RNA 配列の発現の結果、脂肪酸および油組成物の双方が修飾される。

【0184】

pMON75565 構築体の表現型を確認するために、pMON75565 を発現している *R₂* 植物を自殖して、*R₃* 植物を得る。表 6 は、*R₃* 植物による二本鎖 FAD2 RNA 配列の発現の結果、脂肪酸および油組成物の双方が修飾されることを確認する。具体的には、オレイン酸のレベルは、対照構築体に比較して増加し、リノール酸およびリノレン酸のレベルはわずかに減少する。かかる結果は、FAD2 発現の下方調節と一致している。

【0185】

表 7 および図 5 は、*R₃* 植物が GMT RNA 配列を発現し、その結果、アルファ - トコフェロールのレベルが増加するが、トコフェロールの合計レベルは本質的に同じままであることを確認する。

【0186】

これらのデータは、本発明の構築体が綿 GMT 蛋白質を上方調節し、FAD2 の発現を下方調節することを示す。GMT の発現の増加の結果、アルファ - トコフェロールレベルが増加する。(GMT はガンマ - トコフェロールをアルファ - トコフェロールに変換する)。オレイン酸レベル増加およびリノール酸レベル減少は下方調節と一致している。

【0187】

【表4】

表4

構築体	株ID	18:0	18:1	18:2	18:3
对照	9979-54-49	2.98	14.09	28.71	18.88
	9979-54-50	2.89	14.28	29.51	18.41
	9979-54-51	2.8	14.46	29.28	18.43
	9979-54-52	2.75	15.5	29.53	17.57
	9979-54-53	2.78	15.61	29.39	17.63
pMON 75565	AT_G485	3.04	22.4	20.82	18.38
	AT_G486	2.9	18.09	25.88	18.25
	AT_G487	2.95	16.39	26.28	19.71
	AT_G488	2.97	22.53	20.95	18.16
	AT_G489	2.8	28.87	18.17	15.53
	AT_G490	3	32.34	15.18	15.05
	AT_G492	2.8	18.26	26.68	17.51
	AT_G493	2.86	24.25	21.16	16.85
	AT_G494	3.02	23.36	20.44	18.12
	AT_G495	2.9	23.9	21.43	16.88
	AT_G496	3.02	21.53	22.08	18.59
	AT_G497	2.79	27.9	17.46	16.58
	AT_G498	2.88	19.35	24.42	18.22
	AT_G499	3.04	30.19	17.08	15.55
对照	9979-54-59	2.84	14.86	29.6	17.91
	9979-54-60	2.83	14.96	29.41	18.14
	9979-54-61	3.02	14.97	29.05	18.62
	9979-54-62	2.71	14.78	29.6	18.18
	9979-54-63	2.95	15.29	30.13	17.43
pMON 75571	AT_G500	2.84	15.38	28.74	18.39
	AT_G501	2.75	16.73	29.31	16.88
	AT_G502	2.85	15.86	27.86	18.79
	AT_G503	2.8	17.18	29.52	16.38
	AT_G504	2.9	15.29	29.01	18.38
	AT_G505	2.93	16.25	28.94	17.59
	AT_G506	2.86	16.3	29.18	17.23
	AT_G507	2.89	16.31	27.88	18.27
	AT_G508	2.98	16.44	29.93	16.73
	AT_G509	2.89	15.77	28.8	17.9
	AT_G510	2.84	16.91	29.78	16.44
	AT_G511	2.79	15.32	27.82	19.05
	AT_G512	2.77	17.88	29.68	15.62
	AT_G513	2.86	16.7	29.52	16.78
	AT_G514	2.86	15.84	28.66	18.19

【0188】

10

20

30

40

【表5】

表5

構築体	事象	世代	%油	% PRO	% C	% N	% S	色
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
对照	9979-AT00002-54-49	R3	36.4	22.3	53.4	3.7	0.75	0.981
	9979-AT00002-54-50	R3	35.4	22.7	52.8	3.8	0.86	0.985
	9979-AT00002-54-51	R3	35.1	23.5	53	3.9	0.88	0.974
	9979-AT00002-54-52	R3	37.3	21.5	53.6	3.6	0.85	0.978
	9979-AT00002-54-53	R3	35.4	23.5	53	3.9	1.03	0.968
pMON 75565	AT_G485	R2	32	25.2	51.8	4.2	0.89	0.982
	AT_G486	R2	36.9	22.6	53.8	3.8	0.79	0.981
	AT_G487	R2	35.7	23.1	53.1	3.8	0.86	0.98
	AT_G488	R2	36.9	22.5	53.9	3.8	0.74	0.979
	AT_G489	R2	37.1	22.2	53.9	3.7	0.91	0.984
	AT_G490	R2	37.2	22	54	3.7	0.86	0.981
	AT_G492	R2	36.8	21.7	53.4	3.6	0.89	0.986
	AT_G493	R2	37.2	22.8	53.9	3.8	0.97	0.976
	AT_G494	R2	36.8	22.3	53.7	3.7	0.8	0.975
	AT_G495	R2	36.3	21.7	53.5	3.6	0.9	0.999
	AT_G496	R2	36.5	23	53.6	3.8	0.8	0.984
	AT_G497	R2	35.5	23.5	53.2	3.9	0.95	0.983
	AT_G498	R2	37.1	22.9	53.8	3.8	0.91	0.988
	AT_G499	R2	36.5	22.4	53.6	3.7	0.83	0.985
对照	9979-AT00002-54-59	R3	36.5	22.5	53.7	3.8	0.96	0.977
	9979-AT00002-54-60	R3	36.3	22.4	53.6	3.7	0.96	0.978
	9979-AT00002-54-61	R3	35.9	23	53.5	3.8	0.94	0.976
	9979-AT00002-54-62	R3	36.3	22.9	53.6	3.8	1	0.977
	9979-AT00002-54-63	R3	36	22.9	53.6	3.8	0.95	0.975
pMON 75571	AT_G500	R2	37.1	22.5	53.9	3.7	0.94	0.976
	AT_G501	R2	36.2	22.9	53.5	3.8	1.14	0.971
	AT_G502	R2	36.3	23.4	53.7	3.9	1.01	0.976
	AT_G503	R2	36.2	22.2	53.6	3.7	1	0.98
	AT_G504	R2	37.1	22.1	53.9	3.7	0.96	0.974
	AT_G505	R2	37.4	21.7	54	3.6	0.88	0.983
	AT_G506	R2	38	21.3	54.3	3.6	0.95	0.976
	AT_G507	R2	36.5	23.1	53.7	3.8	1.01	0.974
	AT_G508	R2	36.9	22.2	53.8	3.7	0.97	0.981
	AT_G509	R2	36.7	22.3	53.7	3.7	0.99	0.978
	AT_G510	R2	36.9	22.2	53.9	3.7	0.98	0.978
	AT_G511	R2	34.8	23.8	53	4	1	0.982
	AT_G512	R2	35	23.7	53.2	3.9	1.15	0.973
	AT_G513	R2	36.1	22.6	53.4	3.8	0.99	0.982
	AT_G514	R2	37.3	22.3	54	3.7	0.96	0.976

【表6】

表6

構築体	株ID	18:0	18:1	18:2	18:3
pMON 75565	AT_G490-2	2.95	21.4	23.91	17.38
	AT_G490-4	2.99	22.46	22.47	17
	AT_G490-3	2.83	22.78	22.64	17.13
	AT_G490-8	2.88	22.82	22.81	16.59
	AT_G490-5	3	23.33	22.51	16.51
	AT_G490-6	2.93	26.1	20.29	16.02
	AT_G490-7	3.07	27	19.72	15.89
	AT_G490-9	2.99	28.59	18.55	15.59
	AT_G490-1	2.94	29.9	18.12	14.83
	AT_G490-10	2.99	31.8	15.49	14.59
	AT_G499-9	3.25	26.35	20.47	16.09
	AT_G499-1	3.12	27.19	17.99	16.59
	AT_G499-6	3.13	28.49	20.52	14.81
	AT_G499-2	3.05	28.86	19.75	14.73
	AT_G499-3	3.11	30.21	18.27	14.88
	AT_G499-5	3.11	30.76	19.83	13.71
	AT_G499-10	3.09	32.56	15.77	14.33
	AT_G499-8	2.91	32.88	16.02	14.46
	AT_G499-4	2.86	33.16	16.08	14.17
	AT_G499-7	3.67	34.04	14.53	11.07
对照	9979-40-92	2.74	15.3	29.07	17.16
	9979-40-94	2.64	15.9	29.02	17.16
	9979-40-95	2.81	15.92	29.03	17.35
	9979-40-88	2.85	16.17	28.87	17.14
	9979-40-97	2.79	16.42	28.9	16.58
	9979-40-90	2.56	16.5	29.15	16.45
	9979-40-93	2.72	16.65	29.22	16.31
	9979-40-91	2.67	16.84	29.61	16.33
	9979-40-96	2.78	16.88	29.07	16.44
	9979-40-89	2.71	16.92	28.88	16.51
	9979-40-100	2.67	14.86	28.84	17.59
	9979-40-105	2.81	15.08	28.3	18
	9979-40-99	2.78	15.4	28.78	17.71
	9979-40-101	2.73	15.6	28.74	17.44
	9979-40-103	2.85	15.67	29.09	17.34
	9979-40-106	2.69	15.83	28.96	17.31
	9979-40-102	2.87	15.94	28.45	17.25
	9979-40-107	2.79	16.75	29.16	16.4
	9979-40-104	2.82	16.78	28.41	17.03
	9979-40-98	2.89	16.89	27.99	16.94

10

20

30

40

【0190】

【表7】

表7

構築体	株ID	アルファー- Toco	カソマー- Toco	デルタ- Toco	合計 Toco	%アルファー- Toco	世代
対照	9979-40-100	5	495	16	516	1	R3
	9979-40-94	5	469	15	489	1	R3
	9979-40-93	6	468	14	488	1	R3
	9979-40-101	6	461	14	481	1	R3
	9979-40-95	6	455	14	475	1	R3
	9979-40-91	7	491	17	515	1	R3
	9979-40-90	7	491	16	514	1	R3
	9979-40-96	7	490	15	512	1	R3
	9979-40-99	7	473	16	496	1	R3
	9979-40-106	7	471	15	493	1	R3
	9979-40-107	7	469	14	490	1	R3
	9979-40-103	7	458	14	479	1	R3
	9979-40-92	7	447	15	469	1	R3
	9979-40-89	8	498	18	524	2	R3
	9979-40-88	8	496	16	520	2	R3
	9979-40-102	8	485	15	508	2	R3
	9979-40-97	8	474	16	498	2	R3
	9979-40-98	9	462	14	485	2	R3
	9979-40-104	9	460	15	484	2	R3
	9979-40-105	9	453	15	477	2	R3
pMON75565	AT_G499-9.	286	161	7	454	63	R3
	AT_G490-8.	268	143	8	419	64	R3
	AT_G499-5.	274	147	7	428	64	R3
	AT_G490-4.	291	153	7	451	65	R3
	AT_G490-2.	282	143	7	432	65	R3
	AT_G499-2.	286	145	7	438	65	R3
	AT_G499-6.	301	152	7	460	65	R3
	AT_G490-5.	274	123	8	405	68	R3
	AT_G490-3.	285	128	8	421	68	R3
	AT_G490-9.	312	116	7	435	72	R3
	AT_G490-7.	330	85	6	421	78	R3
	AT_G490-10.	330	80	6	416	79	R3
	AT_G499-3.	352	84	6	442	80	R3
	AT_G499-1.	344	71	5	420	82	R3
	AT_G490-1.	368	71	6	445	83	R3
	AT_G499-10.	380	56	5	441	86	R3
	AT_G499-4.	368	55	4	427	86	R3
	AT_G499-7.	441	56	4	501	88	R3
	AT_G499-8.	423	48	4	475	89	R3
	AT_G490-6.	367	34	4	405	91	R3

【図面の簡単な説明】

【0191】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、ベクターpMON75565中のDNA構築体エレメントの模式図である。

【図2】図2はベクターpMON75571中のDNA構築体エレメントの模式図である。

【図3】図3Aおよび3Bは、各々、pMON75565(図3A)またはpMON75571(図3B)で形質転換された植物のR₂世代からのArabidopsis種子の合計トコフェロール含量におけるアルファ-トコフェロールのパーセンテージを示すグラフである。

【図4】図4は、pMON75565で形質転換された植物のR₃世代からの選択されたArabidopsis種子における平均種子油およびオレイン酸の脂肪酸(18:1)レベルを表わすグラフである。

【図5】図5Aおよび5Bは、pMON75565で形質転換された植物のR₃世代からのArabidopsis種子の合計トコフェロールレベル(図5A)ならびにその合計トコフェロール含量中のアルファ-トコフェロールのパーセンテージ(図5B)を示すグラフである。

10

【図1】

FIGURE 1



【図2】

FIGURE 2



【図3】

FIGURE 3A

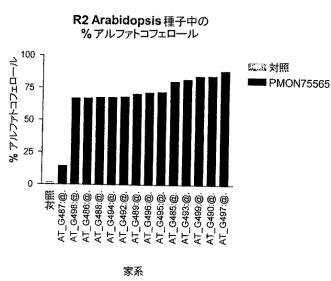
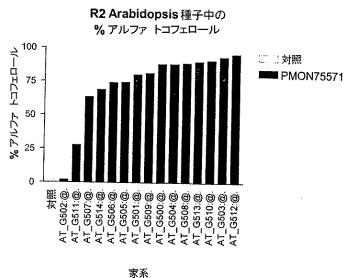
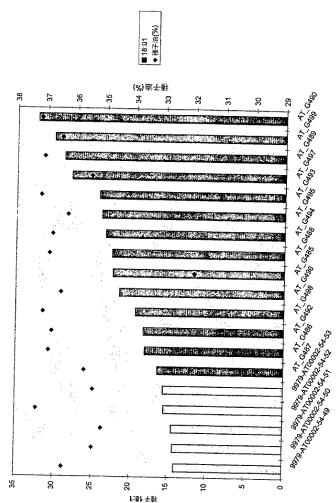


FIGURE 3B



【図4】

FIGURE 4



【図5】

FIGURE 5A

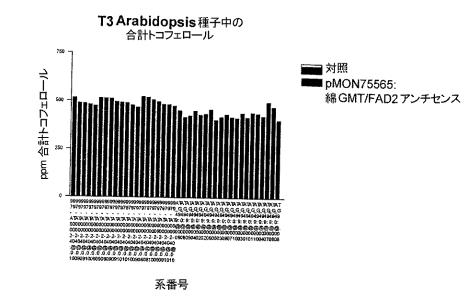
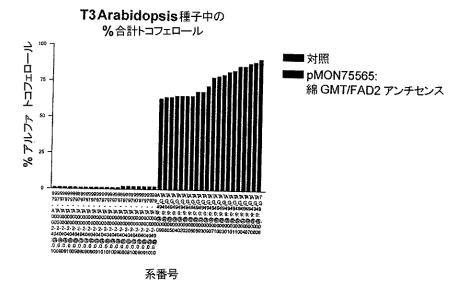


FIGURE 5B



【配列表】

2007506437000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年5月9日(2006.5.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2007506437000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年5月25日(2006.5.25)

【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】

ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントならびに遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含む核酸分子を有する植物細胞であって、該植物細胞中の該核酸分子の転写の結果、該宿主細胞内で、該ポリヌクレオチドコード配列によりポリペプチドが発現し、同時に遺伝子が抑制され、第1の核酸セグメントおよび該第2の核酸セグメントが、多シストロン性配置にて单一プロモーターに作動可能に連結し、該第1および該第2

の核酸セグメントが異なる遺伝子から得られる該植物細胞。

【請求項 2】

該第2の核酸セグメントの発現により内因性遺伝子が抑制される請求項1記載の植物細胞。

【請求項 3】

該第2の核酸セグメントが、dsRNA分子として発現される請求項1記載の植物細胞。

【請求項 4】

該第2の核酸セグメントが、mRNAに対応する少なくとも21の近接するヌクレオチドを有する請求項1記載の植物細胞。

【請求項 5】

請求項1記載の複数の植物細胞を含む植物。

【請求項 6】

ポリペプチドコード配列を含む第1の核酸セグメントならびに遺伝子抑制配列を含む第2の核酸セグメントを含む核酸分子であって、植物細胞中の該核酸分子の転写の結果、該宿主細胞内で、該ポリヌクレオチドコード配列によりポリペプチドが発現し、同時に遺伝子が抑制され、第1の核酸セグメントおよび該第2の核酸セグメントが、多シストロン性配置にて单一プロモーターに作動可能に連結し、該第1および該第2の核酸セグメントが異なる遺伝子から得られる該核酸分子。

【請求項 7】

植物のゲノムに請求項6記載の核酸分子を導入することを特徴とする、植物中の1を超えるRNA分子の発現を同時に改変する方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/31605															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01H 5/00; C12N 15/82 US CL : 800/278, 298 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 800/278, 298																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, Dialog																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 2003/0135882 A1 (METZLAFF et al) 17 July 2003 (17.07.2003), pages 1, 3 and 16-18.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-3,5,8-12,14,17-19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 2003/0049835 A1 (HELLIWELL et al) 13 March 2003 (13.03.2003), page 2</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">4,6,7,13,15,16</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-19</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2003/0135882 A1 (METZLAFF et al) 17 July 2003 (17.07.2003), pages 1, 3 and 16-18.	1-3,5,8-12,14,17-19	—		—	Y	US 2003/0049835 A1 (HELLIWELL et al) 13 March 2003 (13.03.2003), page 2	4,6,7,13,15,16	Y		1-19
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	US 2003/0135882 A1 (METZLAFF et al) 17 July 2003 (17.07.2003), pages 1, 3 and 16-18.	1-3,5,8-12,14,17-19															
—		—															
Y	US 2003/0049835 A1 (HELLIWELL et al) 13 March 2003 (13.03.2003), page 2	4,6,7,13,15,16															
Y		1-19															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.															
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 06 May 2005 (06.05.2005)		Date of mailing of the international search report 12 JUL 2005															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Elizabeth F. McElwain Telephone No. 571-272-1600															

フロントページの続き

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

(72)発明者 クリストイーン・ケイ・シューメイカー

アメリカ合衆国 9 5 7 7 6 カリフォルニア州ウッドランド、スプリングクリーク 1 4 0 9 番

F ターム(参考) 2B030 AA02 AA03 AD08 CA11 CB02

4B024 AA08 BA79 CA01 CA05 CA11 CA20 DA01 EA04 FA02 GA11

HA01

4B065 AA88X AA88Y AB01 AC14 BA02 CA10 CA18 CA41 CA53