

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4744049号
(P4744049)

(45) 発行日 平成23年8月10日 (2011. 8. 10)

(24) 登録日 平成23年5月20日 (2011. 5. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)

A O 1 H 5/00 (2006. 01)

A O 1 H 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 9/02 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G

A O 1 H 5/00 A

A O 1 H 5/10

C 1 2 N 5/00 1 O 3

C 1 2 N 9/02

請求項の数 6 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2001-518852 (P2001-518852)
 (86) (22) 出願日 平成12年8月11日 (2000. 8. 11)
 (65) 公表番号 特表2003-507062 (P2003-507062A)
 (43) 公表日 平成15年2月25日 (2003. 2. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/022613
 (87) 国際公開番号 W02001/014538
 (87) 国際公開日 平成13年3月1日 (2001. 3. 1)
 審査請求日 平成19年8月13日 (2007. 8. 13)
 (31) 優先権主張番号 60/151, 224
 (32) 優先日 平成11年8月26日 (1999. 8. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/172, 128
 (32) 優先日 平成11年12月17日 (1999. 12. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 599107393
 モンサント・カンパニー
 アメリカ合衆国、ミズーリ州 63167
 , セント・ルイス、 ノース・リンドバ
 ーグ・ブールバード 800
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100156122
 弁理士 佐藤 剛
 (74) 代理人 100106231
 弁理士 矢野 正樹
 (74) 代理人 100165892
 弁理士 坂田 啓司

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改質したポリ不飽和脂肪酸を有する植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 配列番号：2により表されるポリヌクレオチド配列、

b) F a d 2 デサチュラーゼ遺伝子の発現を抑制できる 30ヌクレオチドを有する (a) のフラグメント、

c) F a d 2 デサチュラーゼ遺伝子の発現を抑制できる 50ヌクレオチドを有する (a) のフラグメント、

d) (a)、(b) または (c) のポリヌクレオチド配列と相補的なポリヌクレオチド配列からなる群から選択される F a d 2 デサチュラーゼ遺伝子発現を抑制できる配列を含む単離したポリヌクレオチド分子。

【請求項 2】

植物宿主細胞中で機能する異種プロモーターに操作可能に連結された請求項 1 に記載のポリヌクレオチド配列の少なくとも 1 つを含む組換え DNA 構築体。

【請求項 3】

該ポリヌクレオチド配列が、センス方向にある、請求項 2 記載の組換え DNA 構築体。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチド配列のいずれか 1 つを含む DNA 構築体、または請求項 2 もしくは 3 に記載の構築体を大豆植物種子において発現させ、ここに、該ポリヌクレオチドまたは該構築体は、該 F a d 2 デサチュラーゼ遺伝子を抑制でき、センスまたはアンチセンス方向に位置し；次いで、

該ポリヌクレオチド配列またはイントロンの転写が開始され、該 F a d 2 デサチュラーゼ遺伝子の該発現が抑制される条件下で、該種子を増殖させるステップを含み、ここに、該大豆種子は：

(a) 2 6 ~ 8 0 % のオレイン酸、 2 . 9 7 ~ 4 9 . 9 2 % のリノール酸、および 3 . 3 8 ~ 8 . 8 1 % のリノレン酸；または

(b) 5 0 ~ 7 5 % のオレイン酸、わずか 1 0 ~ 3 0 % のリノール酸、およびわずか 1 ~ 3 % のリノレン酸を含む油性組成物を含むことを特徴とする植物細胞中のデサチュラーゼ遺伝子発現を抑制する方法。

【請求項 5】

請求項 2 もしくは 3 からの構築体を含む大豆植物種子であって、ここに、該大豆植物種子は：

(a) 2 6 ~ 8 0 % のオレイン酸、 2 . 9 7 ~ 4 9 . 9 2 % のリノール酸、および 3 . 3 8 ~ 8 . 8 1 % のリノレン酸；または

(b) 5 0 ~ 7 5 % のオレイン酸、わずか 1 0 ~ 3 0 % のリノール酸、およびわずか 1 ~ 3 % のリノレン酸を含む油性組成物を有し、または請求項 4 の方法により得ることができる大豆植物種子。

【請求項 6】

請求項 5 記載の植物種子を含む植物。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

導入部分

本出願は、 1 9 9 9 年 8 月 2 6 日に出願された米国仮特許出願第 6 0 / 1 5 1 , 2 2 4 号、および 1 9 9 9 年 1 2 月 1 7 日に提出された米国仮特許出願第 6 0 / 1 7 2 , 1 2 8 号への優先権を特許請求するものである。

【 0 0 0 2 】

技術分野

本発明は核酸配列および構築体、およびこれらに関する方法を対象とする。

【 0 0 0 3 】

背景

植物油はさまざまな用途において使用される。生合成または天然植物源からの、新規な植物油組成物および／または油組成物を得るための改良された手段が必要とされている。意図する油の使用に応じて、さまざまな異なる脂肪酸組成物が望まれる。

【 0 0 0 4 】

このような油および／または改質された脂肪酸組成物を得るために必要とされる 1 つの手段は、植物の遺伝子工学によるものである。しかしながら、所望の表現型結果を生み出すことができる適切な核酸配列、このような配列の適切な用途を指示することができる調節領域などを同定することが必要である。

【 0 0 0 5 】

高等植物は、共通の代謝経路（脂肪酸シンターゼ経路）を介して脂肪酸を合成するのである。脂肪酸がグリセロール骨格に結合し、さらなる発芽用のエネルギー源として貯蔵用のトリグリセリドを形成する、増殖中の種子においては、プロプラスチド中に F A S 経路が位置している。最初に行われるステップは、酵素アセチル - C o A : A C P トランスアシラーゼ（ A T A ）によって触媒される、アセチル - C o A および A C P からのアセチル - A C P （アセチル保有タンパク質）の形成である。アセチル - C o A から炭素 1 6 および 1 8 個の脂肪酸への伸長は、以下の順序の反応の周期的作用を含む：マロニル - A C P からの 2 つの炭素ユニットを縮合させて - ケトアシル - A C P （ - ケトアシル - A C P シンターゼ）を形成し、ケト機能をアルコールに還元して（ - ケトアシル - A C P リダクターゼ）、エノイル - A C P を形成するために脱水させ（ - ヒドロキシアシル - A C P デヒドラーゼ）、最後にエノイル - A C P を還元して伸長した飽和アシル - A C P を形成する（エノイル - A C P リダクターゼ）。 - ケトアシル - A C P シンターゼ I はパ

10

20

30

40

50

ルミトイル - A C P (C 1 6 : 0) までの伸長を触媒し、一方 - ケトアシル - A C P シンターゼ I I はステアロイル - A C P (C 1 8 : 0) への最終的な伸長を触媒する。貯蔵グリセリド中に見られるオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸などの一般的な植物の不飽和脂肪酸は、ステアロイル - A C P の飽和度低下から誘導されるものであり、可溶性プラスチド - 9 デサチュラーゼ (「ステアロイル - A C P デサチュラーゼ」と呼ばれることも多い) によって触媒される反応においてオレオイル - A C P (C 1 8 : 1) を形成する。分子状の酸素には飽和度低下が必要であり、還元されたフェドロキシシンがエレクトロン共ドナーとして働く。 - 1 2 デサチュラーゼおよび - 1 5 デサチュラーゼが結びついた膜の作用によって、さらなる飽和度低下が順次に行われる。これらの「デサチュラーゼ」は、このようにしてモノまたはポリ不飽和脂肪酸をそれぞれ生み出す。

10

【 0 0 0 6 】

表現型が F A S となる核酸配列を得ると、油を生成させるための飽和度低下および / または脂肪酸のグリセロール骨格への取り込みは、当該代謝因子の同定、有用な動的性質を有する酵素源の選択および特徴付け、そのアミノ酸のシーケンシングが可能であるレベルまでの当該のタンパク質の精製 (アミノ酸配列データを使用して所望の D N A 配列を探索するためのプローブとして使用することができる核酸配列を得る) 、および構築体の調製、結果として生じる植物の形質転換および分析を含めた (これらだけには限られないが) さまざまな障害の影響を受ける。

【 0 0 0 7 】

したがって、さらなる核酸配列標的および脂肪酸組成物を改質するための方法が必要とされる。詳細には、さまざまな範囲の異なる脂肪酸組成物を生成するための構築体および方法が必要とされる。

20

【 0 0 0 8 】

発明の概要

本発明は一般に、ゲノムデサチュラーゼポリヌクレオチド、詳細には二重結合の脂質アシル部分 (脂質アシル鎖においてカルボキシル末端から数えて 1 2 番目 (- 1 2 デサチュラーゼまたは f a d 2) または 1 5 番目 (- 1 5 デサチュラーゼまたは f a d 3) の炭素位置) への挿入を触媒する酵素をコードしているゲノムデサチュラーゼポリヌクレオチドを対象とする。さらに本発明は、このようなゲノムポリヌクレオチド配列の単離した非コード領域 (特にイントロンおよびプロモーター領域を含むもの) を提供する。 - 1 2 および

30

- 1 5 デサチュラーゼのプロモーターおよびイントロン配列から誘導される部分的または完全な配列を含む、特異的なオリゴヌクレオチドが提供される。本明細書で開示する配列は大豆植物から得られるが、大豆のデサチュラーゼ配列と相同であるか同一性があるデサチュラーゼゲノムポリヌクレオチド配列のイントロンおよびプロモーター領域から、追加的な配列を誘導することができることが企図される。以下に記載する標準的な方法を使用して、さまざまな植物源 (特に油種穀物) から、このような追加的なデサチュラーゼ配列を得ることができる。

【 0 0 0 9 】

植物中の脂肪酸組成物を改質するために使用することができる組換え D N A 構築体を提供すること、 - 1 2 および - 1 5 デサチュラーゼなどのデサチュラーゼ遺伝子またはタンパク質の転写または転写および翻訳 (発現) を改質することも本発明の態様である。本発明は特に、ゲノムクローンのイントロンおよびプロモーター領域から誘導される配列を含む D N A 構築体を対象とし、前記配列は D N A 構築体においてセンスまたはアンチセンス方向にある。次いでこれらの D N A 構築体を使用して宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトし、脂肪酸のレベルが改質された (特にオレイン酸、リノールおよびリノレン酸のレベルが改質された) 植物を生成させる。オレイン酸のレベルを増大させリノール酸およびリノレン酸のレベルを低下させるために、 - 1 2 および - 1 5 デサチュラーゼの遺伝子発現をダウンレギュレートさせるための構築体および方法を提供することが詳細には企図される。油種穀物の種組織中の脂肪酸組成を変化させることが詳細には企図される。

40

【 0 0 1 0 】

50

12 および 15 デサチュラーゼポリヌクレオチドの発現によって得られる改質された植物細胞、植物、種子および油も、本発明の一部であるとみなされる。さらに、それぞれの脂肪酸の特異的相対レベルを有する油組成物を生成することが企図される。1つの好ましい実施形態は少なくとも約80～85%のオレイン酸、わずか約1～2%のリノレン酸、およびわずか約1～3%のリノール酸を含み、第2の好ましい実施形態は少なくとも約50～75%のオレイン酸、少なくとも約10～30%のリノレン酸、およびわずか約1～3%のリノール酸を含む。

発明の詳細な説明

【0011】

本発明は、ゲノムデサチュラーゼ配列、特に宿主細胞源からのゲノム脂肪酸デサチュラーゼ核酸配列から単離された非コード配列を定める。本発明のデサチュラーゼ配列としては、細胞源から得ることができる蛋白質、ポリペプチドまたはペプチドなどの源からのアミノ酸をコードする全ての非コード領域など任意の核酸ゲノム配列が挙げられ、それは、植物宿主細胞中、すなわちインビボでの、または植物細胞様環境中、すなわちインビトロでの脂肪酸アシル部分への2重結合の挿入を触媒できる。以下にさらに詳細に記載するように、カルボキシル末端から計数される脂肪酸アシル鎖における炭素12位(12デサチュラーゼ)および炭素15位(15デサチュラーゼ)に2重結合を付加する酵素をコードする具体的なゲノムポリヌクレオチド配列を提供する。さらに、このようなゲノム配列の特異的な非コード領域をここに提供する。

【0012】

用語の「非コード」とは、発現された蛋白質の一部または全部をコードしないポリヌクレオチドの配列を言う。非コード方向としては、限定しないが、イントロン類、プロモーター領域および5'不飽和領域が挙げられる。

【0013】

ここで用いられる用語の「イントロン」とは、発現された蛋白質の一部または全部をコードしないポリヌクレオチドのセグメント、通常はDNAを意味するものとして用語の通常の意味を言う。

【0014】

ここで用いられる用語の「エキソン」とは、発現された蛋白質の一部または全部をコードするポリヌクレオチドのセグメント、通常はDNAを意味する用語の通常の意味を言う。

【0015】

したがって、用語の「イントロン」とは、RNA分子に転写される遺伝子領域ではあるが、それは、RNAが蛋白質に転写される前にRNAからスプライシングされるものを言う。RNAに転写され、引き続き蛋白質に翻訳される遺伝子領域を言う用語の「エキソン」とは対照的である。

【0016】

配列一覧表および実施例において詳細に記載されるように、ゲノム12デサチュラーゼ配列および15デサチュラーゼ配列およびこのような配列から得られたイントロンおよびプロモーター領域をここに提供する。特に、2種の12デサチュラーゼゲノムクローンが同定され、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:23に記載される。単独15デサチュラーゼゲノムクローンが同定され、SEQ ID NO:3に記載される。単独イントロン領域が、12デサチュラーゼゲノムクローンの各々から得られ、それぞれSEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:24が供される。12デサチュラーゼゲノムクローンの各々からプロモーター領域は、それぞれSEQ ID NO:1(塩基対1-1094)およびSEQ ID NO:23(塩基対1-1704)に含まれる。15デサチュラーゼは、コード領域(SEQ ID NO:4、5、6、7、8、25、26として記載される)内に7種のイントロンを含んでいた。また、予備的結果は、5'非翻訳領域内に追加イントロンがあることを示唆している。

【0017】

ここで記載された配列は大豆から得られるが、イントロン領域およびプロモーター領域は

10

20

30

40

50

、大豆デサチュラーゼ配列に対して相同性があるかまたは同一性を有するデサチュラーゼゲノムポリヌクレオチド配列から得ることができることが考慮されている。特に、配列を、他の植物源および特に油料種子穀物から得ることができる。このようなゲノム配列は標準方法を用いて得ることができるが、その幾つかを以下に記載する。

【 0 0 1 8 】

本発明の配列は、植物における脂肪酸組成物を修飾するのに使用できる（実施例 3 および表 I を参照）。特に、センスおよびアンチセンス抑制を、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の広範囲な濃度を獲得するために使用できることが示されている。特に、オレイン酸の濃度が約 26 ~ 80 % の範囲であり得、リノール酸の濃度が約 2 . 97 ~ 49 . 92 % の範囲であり得、リノレン酸の濃度が約 3 . 38 ~ 8 . 81 % の範囲であり得ることが示されている。しかし、これらは達成され得る広範囲の単に代表にすぎない。さらに、配列の組合せが追加の脂肪酸組成物を獲得するために使用できることが意図されている。ある一定の組成物が、油の意図的使用に基づいて好まれる。1 つの好ましい組成物として、少なくとも約 50 ~ 75 % のオレイン酸、少なくとも約 10 ~ 30 % のリノール酸および約 3 % 以下のリノレン酸が挙げられる。特に好ましい実施形態は、少なくとも約 60 ~ 70 % のオレイン酸、少なくとも約 15 ~ 20 % のリノール酸および約 3 % 以下のリノレン酸が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

ここに記載される実施例が、関心のある遺伝子をダウンレギュレートするためにセンスまたはアンチセンス抑制を利用するが、遺伝子発現を変更する他の方法を使用できることが考慮されている。特に、ここに同定された非コード領域に特異的に結合するようにデザインできる DNA 結合蛋白質を用いて、遺伝子発現がダウンレギュレートできるか、またはリボチームがこのような非コード領域を開裂するために利用できることが考慮されている。さらに、以下に記載されているように、当業界によく知られている遺伝子発現のダウンレギュレーションの方法が考慮され、本発明の配列と共に使用できる。

【 0 0 2 0 】

単離ポリヌクレオチド、蛋白質およびポリペプチド

本発明の第 1 の態様は、単離デサチュラーゼポリヌクレオチドに関する。本発明のポリヌクレオチド配列は、ゲノム核酸配列から得ることができる単離ポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 2 1 】

本発明は、配列一覧表に記載される各配列に対してその全長に亘り同一のポリヌクレオチド配列を提供する。該ポリヌクレオチドとしては、例えば限定しないが、転写された非翻訳配列、終結シグナル、リボソーム結合部位、mRNA を安定化する配列、イントロン、ポリアデニル化シグナルなどの非コード 5' および 3' 配列などの非コード配列、および追加のアミノ酸をコードする追加のコード配列が挙げられる。例えば、融合ポリペプチドの精製を促進するためにマーカー配列を含むことができる。本発明のポリヌクレオチドとしてはまた、構造遺伝子および遺伝子発現を制御する天然関連配列を含んで成るポリヌクレオチドが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、式： $X - (R_1)_n - (R_2) - (R_3)_n - Y$ のポリヌクレオチドを含み、式中 5' 末端における X は、水素であり、3' 末端における Y は水素または金属であり、 R_1 および R_3 は、任意の核酸残基であり、n は、1 から 3000、好ましくは 1 から 1000 の間の整数であり、 R_2 は、本発明の核酸配列、特に配列一覧表に記載された群から選ばれた核酸配列、好ましくは SEQ ID NO : 1 ~ 8 および 23 ~ 29 である。式中、 R_2 は、その 5' 末端残基は R_1 に結合して左側にあり、その 3' 末端残基は R_3 に結合して右側にあるように配向されている。R が 1 よりも大きい何れかの R 基により示される核酸残基の任意の伸長は、ヘテロポリマーまたはホモポリマーの何れか、好ましくはヘテロポリマーであり得る。

【 0 0 2 3 】

さらに発明の好ましい実施形態は、発明のポリヌクレオチドに対し全長に亘り少なくとも

10

20

30

40

50

50%、60%または70%同一であり、またこのようなポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドである。発明のポリヌクレオチドに対し全長に亘り少なくとも80%同一の領域を含んで成るポリヌクレオチドおよびそれに相補的なポリヌクレオチドがさらに好ましい。この点で、全長に亘り少なくとも90%同一のポリヌクレオチドは特に好ましく、少なくとも95%同一のものはとりわけ好ましい。さらに、少なくとも97%の同一性を有するものは、大いに好ましく、また少なくとも98%および99%の同一性を有するものは、特に大いに好ましく、少なくとも99%の同一性を有するものは、最も大いに好ましい。

【0024】

好ましい実施形態は、ゲノムポリヌクレオチド配列から得られ、配列一覧表に記載されるポリヌクレオチドである。

【0025】

さらに本発明は、上記配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。特に本発明は、上記ポリヌクレオチドに対して緊縮条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。ここで用いられる用語「緊縮条件」および「緊縮ハイブリダイゼーション条件」とは、配列間に少なくとも95%、また好ましくは少なくとも97%の同一性があれば、一般にハイブリダイゼーションが起こることを意味する。緊縮ハイブリダイゼーション条件の例としては、50%ホルムアミド、5xSSC(150mMNaCl、15mMクエン酸トリナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート(Denhardt)溶液、10%硫酸デキストラン、および20μg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含んで成る溶液中、42℃で一晩培養し、次いで約65℃で0.1xSSC中ハイブリダイゼーション支持体を洗浄するものである。他のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件はよく知られており、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1989年)の特に11章に例示されている。本発明はまた、前記ポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを有するプローブを用いて、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、配列一覧表に記載されたポリヌクレオチド配列に関する完全遺伝子を含む適当なライブラリーをスクリーニングにより獲得できるポリヌクレオチド配列から本質的に成るポリヌクレオチドおよび前記ポリヌクレオチド配列の単離を提供する。このようなポリヌクレオチドを獲得するのに有用なフラグメントとしては、例えばここに記載されるプローブおよびプライマーが挙げられる。

【0026】

本発明のポリヌクレオチドアッセイに関してここに検討されているように、例えば本発明のポリヌクレオチド類は、RNA、cDNAまたはゲノムDNA用のハイブリダイゼーションプローブとして使用でき、ポリヌクレオチドをコードする完全長cDNA類またはゲノムクローン類を単離し、また配列一覧表に記載されたポリヌクレオチドと高い配列類似性を有する他の遺伝子のcDNAまたはゲノムクローン類を単離する。このようなプローブは、一般に少なくとも15個の塩基を含んで成る。好ましくはこのようなプローブは、少なくとも30個の塩基を有することになり、少なくとも50個の塩基を有することができる。特に好ましいプローブ類は、30個の塩基から50個までの塩基を有する。

【0027】

配列一覧表に記載されたポリヌクレオチド配列を含む、または含まれる各遺伝子領域は、配列一覧表で与えられたDNA配列を用いてスクリーニングにより単離し、オリゴヌクレオチドのプローブを合成し得る。次いで本発明のポリヌクレオチド配列に相補的な配列を有する標識ポリヌクレオチドを用いて、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNAをスクリーンし、そのプローブにハイブリダイズするライブラリーのメンバーを同定する。例えば、デサチュラーゼプロモーターとイントロンの配列に一致する合成オリゴヌクレオチドが作製される。特に、ファージベクターにおけるcDNAライブラリーのスクリーニングは、背景ハイブリダイゼーションレベルがより低いため、このような方法において有用である。

10

20

30

40

50

【0028】

典型的には、核酸プローブの使用から得られるデサチュラーゼ配列は、標的デサチュラーゼ配列とプローブに用いた配列との間に60～70%の配列同一性を示すであろう。しかし、50～60%という小さな配列同一性を有する長配列もまた得られるであろう。核酸プローブは、核酸配列の長断片であり得るか、またはより短いオリゴヌクレオチドプローブでもあり得る。より長い核酸断片をプローブとして使用する場合(約100bpよりも大)、プローブに用いた配列から20～50%の偏差(すなわち、50～80%の配列相同性)を有する配列を標的サンプルから得るために、低緊縮にてスクリーニングし得る。オリゴヌクレオチドプローブは、デサチュラーゼ酵素をコードする全核酸配列よりかなり短くてもよいが、少なくとも約10個のヌクレオチドである必要があり、好ましくは少なくとも約15個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約20個のヌクレオチドである。より短い領域を用いる場合は、より長い領域に対比して、より高い程度の配列同一性が望まれる。したがって、他の関連するデサチュラーゼ遺伝子の検出および回収に関して、オリゴヌクレオチドのプローブを設計するためには、保存度の高いアミノ酸配列領域を同定することが望ましい。特に保存度の高い配列を同定できる場合、より短いプローブは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)にとり特に有用なことが多い(Gouldら、PNA S U S A (1989)86:1934-1938を参照)。

10

【0029】

当業界で十分理解されている「同一性」とは、配列の比較により決定される際の2つ以上のポリペプチド配列間の関係、または2つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当業界における「同一性」はまた、このような配列鎖の間のマッチにより決定される際の、ポリペプチド配列間またはポリヌクレオチド配列間の配列無関係の程度を意味する。「同一性」は、限定しないが、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. ら、オックスフォード大学プレス、ニューヨーク(1988); Biocomputing: informatics and Genome Projects, Smith, D. W. ら、アカデミックプレス、ニューヨーク(1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. および Griffin, H. G. ら、ヒューマナプレス、ニュージャージー(1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., アカデミックプレス(1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. ら、ストックトンプレス、ニューヨーク(1991); および Carillo, H., および Lipman, D., SIAM J Applied Math, 48:1073(1988)に記載されたものを含む公知の方法により容易に算出できる。同一性を決定する方法は、試験した配列間で最大に付合するようにデザインされる。さらに、同一性を決定する方法は、公的に入手できるプログラムに体系化されている。2つの配列間の同一性を決定するのに使用できるコンピュータプログラムは、限定しないが、GCG(Devereux, J. ら、Nucleic Acids Research 12(1):387(1984); 一揃いの5種類のBLASTプログラム、すなわちヌクレオチド配列照会用にデザインされた3種(BLASTN, TBLASTN および TBLASTX) および蛋白質配列照会用にデザインされた2種(BLASTN および TBLASTN)(Coulson, Trends in Biotechnology, 12:76-80(1994); Birren ら、Genome Analysis, 1:543-559(1997))が挙げられる。BLASTXプログラムは、NCBI および他の情報源(BLAST Manual, Altschul, S. ら、NCBI NLM NIH、メリーランド州ベセスダ; Altschul, S. ら、J. Mol. Bio., 215:403-410(1990))から公的に入手できる。よく知られた Smith Waterman 演算法もまた、同一性を決定するのに使用できる。

20

30

40

【0030】

ポリペプチド配列比較用パラメータは、一般に以下のものが挙げられる：

50

演算法：NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)

比較マトリクス：HentikoffおよびHentikoffからのBLOSSUM 62、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (1992)

ギャップペナルティ：12

ギャップ長ペナルティ：4

これらのパラメータと共に使用できるプログラムは、ウィスコン州マジソンの遺伝学コンピュータグループから「gap」プログラムとして公的に入手できる。末端gapにペナルティの無い上記パラメータは、ペプチド比較用デフォルトパラメータである。

10

【0031】

ポリヌクレオチド配列比較用パラメータは以下のものを含む：

演算法：NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)

比較マトリクス：マッチ = +10；ミスマッチ = 0

ギャップペナルティ：50

ギャップ長レングスペナルティ：3

これらのパラメータと共に使用できるプログラムは、ウィスコン州マジソンの遺伝学コンピュータグループから「ギャップ」プログラムとして公的に入手できる。上記パラメータは、核酸比較用デフォルトパラメータである。

20

【0032】

免疫学的スクリーニングに関して、蛋白質に対する抗体は、ウサギまたはマウスに精製蛋白質またはその部分を注射することにより調製できるが、抗体を調製するこのような方法は当業者によりよく知られている。一般的にポリクローナル抗体は遺伝子単離のためにより有用であるが、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の何れをも産生できる。コードされた蛋白質に対する抗体との交差反応により決定される際、ウェスタン分析は、関連蛋白質が所望の植物種の粗製抽出物に存在することを決定するために実施され得る。交差反応性を観察する場合、関連蛋白質をコードする遺伝子は、所望の植物種を示す発現ライブラリーのスクリーニングにより単離される。発現ライブラリーは、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版 (1989年)、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、コールドスプリングハーバーラボラトリー) により記載されているように、ラムダgt11を含む商品として入手できる種々のベクター類にて構築できる。

30

【0033】

植物構築体および使用方法

宿主植物細胞における本発明のデサチュラーゼゲノム配列の転写を方向づけるために、組換えDNA構築体におけるポリヌクレオチド配列の使用が特に興味深い。発現構築体は、一般に本発明の核酸配列に操作して結合された宿主植物細胞において機能的なプロモーターおよび宿主植物細胞において機能的な転写終結領域を含んで成る。

【0034】

当業者は、植物細胞において機能的であり、文献に記載されている多くのプロモーター類があることを認識されるであろう。クロロプラストおよびプラスチド特異的プロモーター類、クロロプラストまたはプラスチド機能性プロモーター類およびクロロプラストまたはプラスチド操作可能プロモーター類も考えられる。

40

【0035】

1セットのプロモーター類は、たいていの植物器官中に高レベルの発現を生じるCaMV 35SプロモーターまたはFMV 35Sプロモーターなどの構成プロモーター類である。CaMV 35SプロモーターおよびFMV 35Sプロモーターの増強形または複製形は、本発明の実施に有用である (Ode11ら、(1985) Nature 3131:810-812; Rogers、米国特許第5,378,619号)。さらに、葉、幹、根、

50

塊茎、種子、果実など植物の特定の組織において本発明の配列発現をもたらすことが好ましいと思われるが、選ばれたプロモーターは、所望の組織および発生特異性を有する必要がある。

【0036】

植物種子組織に優先的に発現する転写開始領域からの本発明の核酸配列の発現が特に興味深い。このような種子優先転写開始配列の例としては、植物保存蛋白質遺伝子をコードする配列または油料種子における脂肪酸生合成に関連する遺伝子から誘導された種子優先転写開始配列が挙げられる。このようなプロモーター類の例としては、ナピン (napin) (Kridleら、Seed Sci. Res. 1:209:219 (1991))、ファセオリン、ゼイン、大豆トリブシン阻害剤、ACP、ステアロイル-ACPデサチュラーゼ、 α -コングリニニン (conglycinin) の大豆 β -サブユニット (Chenら、Proc. Natl. Acad. Sci., 83:8560-8564 (1986)) およびオレオシン (oleosin) などの遺伝子からの5'調節領域が挙げられる。

【0037】

デサチュラーゼを与える蛋白質の局在化を特定の細胞内区画、例えばミトコンドリア、小胞体、液胞、クロロプラストまたは他のプラスチド区画へと方向付けることは有利である。例えば、本発明の興味のある遺伝子が、発現のためにクロロプラストなどのプラスチドに向けられる場合、構築体はまた、遺伝子をプラスチドに向けさせる配列利用を用いることとなる。このような配列は、ここではクロロプラスト透過ペプチド (CTP) またはプラスチド透過ペプチド (PTP) と呼ばれる。本様式において、興味のある遺伝子を、プラスチドに直接挿入しない場合、発現構築体はさらに、興味のある遺伝子をプラスチドに向けさせる透過ペプチドをコードする遺伝子を含む。該クロロプラスト透過ペプチドは、興味のある遺伝子から誘導されてもよく、またはCTPを有する非相同性配列から誘導されてもよい。このような透過ペプチドは当業界に知られている。例えば、Von Heijneら、(1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clarkら (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; della-Cioppaら (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romerら (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; およびShahら、(1986) Science 233:478-481を参照されたい。

【0038】

意図された利用に依存して、構築体は、全ゲノム核酸配列またはこのような配列の特定の非コード領域またはこのような配列の部分を含み得る。例えば、供されたデサチュラーゼ蛋白質のアンチセンス阻害が望まれる場合、全配列は必要としない。さらに、構築体に用いられたデサチュラーゼ配列をプローブとして用いようとする場合、デサチュラーゼ配列、例えば保存度の高いデナチュラーゼ領域をコードする配列の特定の部分のみを含む構築体を調製することは有利と思われる。

【0039】

当業者は、宿主細胞内の内因性配列の発現阻害のために、種々の方法があることを認識するであろう。このような方法としては、限定しないが、アンチセンス抑制 (Smithら、(1988) Nature 334:724-726)、共抑制 (Napoliら、(1989) Plant Cell 2:279-289)、リボチーム (PCT公報WO第97/10328号)、センスおよびアンチセンスの組合せ (Waterhouseら、(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959-13964)、プロモーターの沈黙化 (Parkら、(1996) Plant J. 9(2):183-194)、DNA結合蛋白質 (Beerliら、(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14628-14633; およびLiuら、(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA:94:5525-5530) が挙げられる。宿主細胞における内因性配列の抑制法は、一般的に転写または少な

くとも抑制される配列の一部の転写および翻訳を使用する。このような配列は、内因性配列の非コード領域と同じくコード化に相同であり得る。

【 0 0 4 0 】

なおその上、転写終結調節領域も、本発明の植物発現構築体内に供し得る。転写終結領域は、デサチュラーゼまたは異なる遺伝資源から誘導される都合のよい転写終結領域、例えば転写開始領域と本来関連する転写終結領域をコードするDNA配列により供し得る。当業者は、植物細胞において転写を終結できる任意の都合のよい転写終結領域が、本発明の構築体に使用できることを認識されるであろう。

【 0 0 4 1 】

別途に、構築体は、宿主植物細胞プラスミドから直接デサチュラーゼ配列の発現を方向づけるために調製され得る。このような構築体および方法は、当業者に知られており、例えばS v a bら、(1 9 9 0) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 7 : 8 5 2 6 - 8 5 3 0およびS v a bおよびM a l i g a (1 9 9 3) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 9 0 : 9 1 3 - 9 1 7および米国特許第5 , 6 9 3 , 5 0 7号に一般に記載されている。

【 0 0 4 2 】

発現構築体を含有する組換えDNA構築体が導入された植物細胞、組織、器官または植物は、形質転換、形質移入されているか、または遺伝導入がなされていると考えられる。遺伝子導入または形質転換された細胞または植物には、細胞または植物の子孫およびこのような遺伝子導入植物を異種交配における親株として使用し、デサチュラーゼ拡散配列の存在から生じる変化した表現型を示す飼育プログラムから生じた子孫も含まれる。

【 0 0 4 3 】

関心のあるDNA配列としてその発現の増減のために、本発明のデサチュラーゼポリヌクレオチドを有する植物発現構築体または転写構築体は、広範囲の植物、特に食用および産業使用の植物油の生産に係る植物により使用され得る。本質的に温暖気候の油料種子穀物が最も好ましい。興味のある植物としては、限定しないが、セイヨウアブラナ種子(カノーラおよび高エルカ酸変種)、ヒマワリ、ベニバナ、綿花、大豆、ピーナッツ、ココナツおよびヤシ油、およびトウモロコシが挙げられる。組換え構築体を宿主細胞に導入する方法に依って、他のDNA配列が必要とされ得る。重要なことに、本発明は、双子葉植物種および単子葉植物種に同じく適用され、新規および/または改良された形質変換および調節法に容易に適用し得るであろう。

【 0 0 4 4 】

植物デサチュラーゼプロモーターおよび/または植物中のイントロン構築体の利用が特に興味深く、限定しないが、変更した脂肪酸組成物を有する葉、幹、根、生殖器官、および種子などの植物または植物部分を生産する。デサチュラーゼプロモーターおよび/またはイントロン構築体において特に興味深いのは、宿主細胞内の脂肪酸組成物の修飾のためにセンスまたはアンチセンス方向における、 - 1 2および - 1 5 デサチュラーゼゲノム配列のプロモーターおよび/またはイントロン配列の利用である。

【 0 0 4 5 】

本発明のポリヌクレオチドは、種々の宿主細胞における利用のための構築体の調製に使用できる。本発明の使用のための宿主としては、限定しないが、植物細胞、細菌細胞、カビ細胞(酵母を含む)、昆虫細胞および哺乳類細胞が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

例えば、デサチュラーゼ酵素として単離核酸配列によりコードされた蛋白質の活性および特異性を確認するために、インビトロアッセイについてバキュロウィルス発現系を用いて昆虫細胞培養にて実施できる。このようなバキュロウィルス発現系は当業界に知られており、L e eらの米国特許第5 , 3 4 8 , 8 8 6号により記載されており、その全体が、ここに引用文献として組込まれている。

【 0 0 4 7 】

このような遺伝形質転換植物の獲得における形質転換法は、この発明にとって重要ではな

10

20

30

40

50

く、現在では植物形質転換の種々の方法が利用できる。さらに、穀物を形質転換するためにより新規な方法が利用できるようなれば、それらもまた、この記載に従って直接適用されてもよい。例えば、アグロバクテリウム感染に本来鋭敏な多くの植物種は、アグロバクテリウムに媒介された形質転換の3成分または2成分ベクター法により首尾よく変換され得る。多くの場合、T-DNAによる片側または両側に具体的には左端および右端、さらに具体的に右端隣接した構築体を有することが望ましいであろう。これは特に、構築体がアグロバクテリウム-ツメファシエンスまたはアグロバクテリウム-リゾゲネスを形質転換の様式として使用する場合に有用であるが、しかし、T-DNA端は形質転換の他の様式での使用を見つけ得る。また、種々の単子葉植物種および双子葉植物種の形質転換を可能にするミクロ注射法、DNA粒子衝撃法および電気穿孔法が発展してきた。

10

【0048】

通常、DNA構築体と共に、宿主における発現にとって必要な調節領域を有し、形質転換細胞の選択に供する構造遺伝子が含まれるであろう。この遺伝子は、細胞毒剤、例えば抗生物質、重金属、毒素に対する抵抗性のために栄養素急性宿主、ウィルス免疫などにプロトトロピーを供する相補性を提供し得る。宿主に依って、発現構築体またはその成分が導入され、種々の宿主に対して種々の選択条件が用いられる1種または複数のマーカーを使用し得る。

【0049】

植物細胞の形質転換にアグロバクテリウムが用いられる場合、アグロバクテリウム宿主に存在するT-DNAまたはTi-プラスミドまたはRi-プラスミドとの相長的組換えのために、アグロバクテリウム宿主に導入し得るベクターを使用し得る。組換えのためにT-DNAを含有するTi-プラスミドまたはRi-プラスミドは腕状化してもよいし(えい瘤形成能あり)、または腕状化しなくてもよく(えい瘤形成能なし)、後者は形質転換したアグロバクテリウム宿主中にウィルス遺伝子が存在している限りにおいて許容される。腕状化プラスミドは、正常な植物細胞とえい瘤の混合物を供することができる。

20

【0050】

アグロバクテリウムが宿主植物細胞を形質転換する媒体として用いられる幾つかの例において、T-DNA境界領域によって境界づけられている発現構築体または転写構築体は、大腸菌およびアグロバクテリウムを複製できる広範囲宿主ベクターに挿入されることになるが、広範囲ベクターは文献に記載されている。通常使用されるのは、pRK2またはその誘導体である。例えば、引用文献としてここに組入れているDittara、(Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. (1980) 77: 7347-7351) およびEPA0120515を参照のこと。他に植物細胞内に発現される配列を、1つは大腸菌内のベクターを安定化し、他方はアグロバクテリウム内のベクターを安定化させる別個の複製配列を含むベクター内へ挿入し得る。例えば、pRiHRI(Jouaninら、Mol. Gen. Genet. (1985) 201: 370-374)の複製源を利用し、宿主のアグロバクテリウム細胞内での植物発現ベクターの安定性付与を供するMcBrideおよびSummerfelt(Plant Mol. Biol. (1990) 14: 269-276)を参照のこと。

30

【0051】

発現構築体およびT-DNAと共に、形質転換アグロバクテリウムおよび形質転換植物細胞の選択を可能にする1種または複数のマーカーが含まれるであろう。クロラムフェニコール、カナマイシン、アミノグリコシドG418、ヒグロマイシンなどの抵抗性など、多数のマーカーが植物細胞と共に使用するために開発された。使用された具体的なマーカーは、本発明にとって本質的ではないが、具体的な宿主および構築様式に依って好ましいマーカーがある。

40

【0052】

アグロバクテリウムを用いる植物細胞の形質転換には、外植片を形質転換したアグロバクテリウムと合わせて形質転換に十分な時間培養し、バクテリアを殺菌し、適当な選択的培地において植物細胞を培養し得る。カルスが形成したら、適当な植物ホルモンを用い、知

50

られた方法に従ってシュート形成を促進でき、植物の生殖のために固着培地に移す。その後、植物は増殖して結実し、その種子は反復的生殖を確かにするために、また植物油の単離のために使用され得る。

【 0 0 5 3 】

宿主細胞における不飽和脂肪酸産生を変化させるため本発明に従って第2の発現構築体を使用し得る。例えば、脂肪酸生合成に関与する蛋白質に対するヌクレオチド配列を有する第2の発現構築体とデサチュラーゼ発現構築体とを合わせて宿主細胞へ導入し得る。

【 0 0 5 4 】

複数の発現構築体を含む本発明の植物細胞を得るには幾つかの可能な方法がある。本発明の発現構築体をコードするDNA配列を有する構築体、およびある酵素をコードする別のDNA配列を有する少なくとももう1つの構築体を含む植物を生産する任意の手段が本発明に含まれる。例えば、発現構築体は第2の構築体と同時に、双方の構築体を単独の形質転換ベクターに包含することによるか、または各々が所望の遺伝子を発現する別々のベクターを用いることによるかの何れかによって、植物を形質転換するために使用し得る。第2の構築体は、すでにデサチュラーゼ発現構築体により形質転換されている植物内へ導入することができ、または別途に、1つはデサチュラーゼ構築体を発現し、また1つは第2の構築体を発現している形質転換植物を交配して同一植物内にそれらの構築体を共に導入することができる。

【 0 0 5 5 】

本発明を一般的に記述するに当たって、下記の実施例を参照することにより理解がより容易となるが、これは説明のために入れられているのであって、本発明を限定する意図はない。

【 0 0 5 6 】

実施例

実施例1 デサチュラーゼゲノム配列のクローニング

1 A . 大豆 1 2 デサチュラーゼ (f a d 2 - 1)

大豆 f a d 2 - 1 A 配列は大豆 f a d 2 - 1 c DNA プローブを用いて大豆ゲノムライブラリーのスクリーニングにより同定された。3種の推定サイズ f a d 2 - 1 クローンを同定し、ブランク精製した。3種のサイズ f a d 2 - 1 クローンのうち2種を、pブルースクリプト I I K S + (層遺伝子) に連結し、塩基配列決定した。両クローン (1 4 - 1 および 1 1 - 1 2) は、同一であり、サイズ f a d 2 - 1 c DNA と厳密にマッチした。全 f a d 2 - 1 A クローンの配列は、S E Q I D N O : 1 で供される。

【 0 0 5 7 】

この完全長クローンを得る前に、f a d 2 - 1 A ゲノムクローンの一部を、5' 非翻訳配列 (プライマー 1 2 5 0 6、5' - A T A C A A G C C A C T A G G C A T - 3'、S E Q I D N O : 9) から c DNA (プライマー 1 1 6 9 8 : 5' - G A T T G G C C A T G C A A T G A G G G A A A A G G - 3'、S E Q I D N O : 1 0) 内にデザインされた P C R プライマーを用いて P C R 増幅した。f a d 2 - 1 A イントロンを含んだこの P C R 生成物を、ベクター p C R 2 . 1 (インビトロゲン) にクローン化し、塩基配列決定した。サイズ f a d 2 - 1 A 部分ゲノムクローン (S E Q I D N O : 2 7) およびそのイントロン領域 (S E Q I D N O : 2) を、M a c v e c t o r における P u s t e l l 比較プログラムを用いて大豆 c DNA 配列との比較により同定した。イントロン配列は、A T G 開始コドンの後から始まり、4 2 0 個の塩基長である。

【 0 0 5 8 】

第2の f a d 2 - 1 遺伝子科メンバーもまた、同定しクローン化し、ここでは f a d 2 - 1 B と言う。サイズ f a d 2 - 1 B 部分ゲノムクローン (S E Q I D N O : 2 3) (プロモーター (1 ~ 1 7 0 4 個の塩基対) を含む) ; 5' U T R (1 7 0 5 ~ 1 7 8 2 個の塩基対) ; イントロン番号 1 (1 7 8 6 ~ 2 1 9 0 個の塩基対) ; f a d 2 - 1 B コード化領域 (1 7 8 3 ~ 1 7 8 5 個および 2 1 9 1 ~ 2 4 6 3 個の塩基対) の一部およびそのイントロン領域 (S E Q I D N O : 2 4) を、M a c v e c t o r における P u s

10

20

30

40

50

t e l l 比較プログラムを用いて大豆 c D N A 配列との比較により同定した。イントロン配列は、A T G 開始コドンの後から始まり、4 0 5 個の塩基長である。

【 0 0 5 9 】

1 B . 大豆 1 5 デサチュラーゼ (f a d 3)

部分大豆 f a d 3 ゲノム配列を、プライマー 1 0 6 3 2、5 ' - C U A C U A C U A C U A C T C G A G A C A A A G C C T T T A G C C T A T G - 3 ' (S E Q I D N O : 1 1) および 1 0 6 3 3 : 5 ' - C A U C A U C A U C A U G G A T C C C A T G T C T C T C T A T G C A A G - 3 ' (S E Q I D N O : 1 2) を用いて大豆 D N A から P C R 増幅した。伸長テンプレート P C R システム (B o e h r i n g e r M a n n h e i m) を製造元説明書に従って使用した。生じた P C R 生成物をベクター p C R 2 . 1 (インビトロゲン) にクローン化し、塩基配列決定した。ダイズ f a d 3 部分ゲノムクローン配列およびイントロン領域を、M a c v e c t o r における P u s t e l l 比較プログラムを用いて大豆 f a d 3 c D N A 配列との比較により確認した。この同定された部分ゲノム大豆 f a d 3 配列 (S E Q I D N O : 3) から、7 種のイントロンが同定された (S E Q I D N O : 4 (イントロン番号 1)、S E Q I D N O : 5 (イントロン番号 2)、S E Q I D N O : 6 (イントロン番号 3 A)、S E Q I D N O : 7 (イントロン番号 4)、S E Q I D N O : 8 (イントロン番号 5)、S E Q I D N O : 2 5 (イントロン番号 3 B)、S E Q I D N O : 2 6 (イントロン番号 3 C))。イントロン番号 1 は、1 9 2 個の塩基対長であり、2 9 4 位と 4 8 5 位との間に位置し、イントロン番号 2 は、3 4 8 個の塩基対長であり、5 7 6 位と 9 2 3 位との間に位置し、イントロン番号 3 A は、1 4 2 個の塩基対長であり、9 9 1 位と 1 1 3 2 位との間に位置し、イントロン番号 3 B は、9 8 個の塩基対長であり、1 2 2 5 位と 1 3 2 2 位との間に位置し、イントロン番号 3 C は、1 1 5 個の塩基対長であり、1 5 0 9 位と 1 6 2 3 位との間に位置し、イントロン番号 4 は、1 2 3 1 個の塩基対長であり、1 7 0 5 位と 2 9 3 5 位との間に位置し、およびイントロン番号 5 は、6 2 6 個の塩基対長であり、3 0 7 4 位と 3 6 9 9 位との間に位置する。

【 0 0 6 0 】

実施例 2 発現構築体

テンプレートとして f a d 2 - 1 A 部分ゲノムクローン (S E Q I D N O : 2 7) およびプライマー 1 2 7 0 1 (5 ' - A C G A A T T C C T C G A G G T A A A T T A A A T T G T G C C T G C - 3 ' (S E Q I D N O : 1 3)) および 1 2 7 0 2 (5 ' - G C G A G A T C T A T C G A T C T G T G T C A A A G T A T A A A C - 3 ' (S E Q I D N O : 1 4)) を用いて、大豆 f a d 2 - 1 A イントロン配列を P C R により増幅した。生じた増幅生成物を、ベクター p C R 2 . 1 (インビトロゲン) にクローン化し、塩基配列決定した。次いで、センスおよびアンチセンス方向で、ダイズ f a d 2 - 1 A イントロンを発現カセット、p C G N 3 8 9 2 にクローン化した。ベクター p C G N 3 8 9 2 は、大豆 7 S プロモーターおよびエンドウ P B C S 3 ' を含む。次いで双方の遺伝子融合体を、F M V プロモーターにより調節された C P 4 遺伝子を含むベクター p C G N 9 3 7 2 に別個に連結した。生じた発現構築物 (P C G N 5 4 6 9 センスおよび p C G N 5 4 7 1 アンチセンス) を、下記の生物学的方法を用いて大豆の形質転換に用いた。

【 0 0 6 1 】

テンプレートとして f a d 2 - 1 B 部分ゲノムクローン (S E Q I D N O : 2 3) およびプライマー 1 3 8 8 3 (5 ' - G C G A T C G A T G T A T G A T G C T A A A T T A A A T T G T G C C T G - 3 ' (S E Q I D N O : 3 0)) および 1 3 8 7 6 (5 ' - G C G G A A T T C C T G T G T C A A A G T A T A A A G A A G - 3 ' (S E Q I D N O : 3 1)) を用いて、大豆 f a d 2 - 1 B イントロン配列を P C R により増幅した。生じた増幅生成物を、ベクター p C R 2 . 1 (インビトロゲン) にクローン化し、塩基配列決定した。ダイズ f a d 2 - 1 B イントロンを、プラスミド p C G N 5 4 6 8 (ダイズ f a d 2 - 1 A イントロン (センス) およびエンドウ R B C S 3 ' に融合された大豆 7 S プロモーターを含む) または p C G N 5 4 7 0 (ダイズ f a d 2 - 1 A イントロン

(アンチセンス)およびエンドウRBCS3'に融合された大豆7Sプロモーターを含む)中、それぞれセンスおよびアンチセンス方向で、ダイズfad2-1Aイントロンの3'末端に融合した。次いで生じたイントロン組合せ融合体をFMVプロモーターにより調節されたCP4遺伝子を含むベクターpCGN9372に別々に連結した。生じた発現構築物(pCGN5485、fad2-1A&BイントロンセンスおよびpCGN5486、fad2-1A&Bイントロンアンチセンス)を、下記の生物学的方法を用いて大豆の形質転換に用いた。

【0062】

テンプレートとしてfad3部分ゲノムクローンおよび以下のプライマー：イントロン番号1、プライマー12568：5'-GATCGATGCCCCGGGGTAATAATT
TTTGTGT(SEQ ID NO：15)および12569：5'-CACGCCCT
CGAGTGTTC AATTCAATCAATG(SEQ ID NO：16)；イント
ロン番号2、プライマー12514：5'-CACTCGAGTTAGTTTCATACT
GGCT(SEQ ID NO：17)および12515：5'-CGCATCGATT
GCAAAATCCATCAAA(SEQ ID NO：18)；イントロン番号4、プ
ライマー10926：5'-CUACUACUACUACTCGAGCGTAATAAG
TGGGTGAACAC(SEQ ID NO：19)および10927：5'-CAU
CAUCAUCAUCTCGAGGGAATTCGTCCATTTTAGTACACC(S
EQ ID NO：20)；イントロン番号5、プライマー10928：5'-CUAC
UACUACUACTCGAGGCGCGGTACATTTTATTGCTTA(SEQ
ID NO：21)および10929：5'-CAUCAUCAUCAUCTCGAGG
AATTCTGCGAGTGAATCCCAAATG(SEQ ID NO：22)を用いて
、大豆fad3ゲノムクローンから同定された7種のイントロンのうち4種をPCRにより増幅した。各イントロンに対して生じたPCR生成物を、ベクターpCR2.1(イン
ピトロゲン)にクローン化し、塩基配列決定した。イントロン番号1、2、4および5を
全て、センスおよびアンチセンス方向で、pCGN3892に別個に連結した。pCGN
3892は、大豆7SプロモーターおよびエンドウRBCS3'を含む。これらの融合体
を、大豆への形質転換のためのFMVプロモーターにより調節されたCP4遺伝子を含む
ベクターpCGN9372に連結した。生じた発現構築物(pCGN5455、fad3
イントロン番号4イントロンセンス；pCGN5459、fad3イントロン番号4イン
トロンアンチセンス；pCGN5456、fad3イントロン番号5イントロンセンス；
pCGN5460、fad3イントロン番号5イントロンアンチセンス；pCGN546
6、fad3イントロン番号2イントロンアンチセンス；pCGN5473、fad3イン
トロン番号1イントロンアンチセンス)を、下記の生物学的方法を用いて大豆の形質転
換に用いた。

【0063】

ダイズfad3イントロン番号3Cおよび4もまた、ここでfad3-1Bと呼ばれる第
2のfad3遺伝子科メンバーからもPCR増幅した。以下のプライマー、5'CATG
CTTCTGTGCTTCTC3'(SEQ ID NO：32)および5'GTTG
ATCCAACCATAGTCG3'(SEQ ID NO：33)を用いて、ダイズf
ad3-1Bイントロン番号3Cおよび4を大豆DNAからPCR増幅した。このPCR
生成物を、ベクターpCR2.1(インピトロゲン)にクローン化し、塩基配列決定した
。ダイズfad3-1Bイントロン番号3Cおよび4に関する配列は、SEQ ID N
Os：28および29で供される。

【0064】

実施例3 植物形質転換および分析

12および15デサチュラーゼイントロンのセンスおよびアンチセンス発現に係る発
現構築体を含む線状DNAフラグメントは、McCabeら、(1988)Bio/Te
chnology 6：923-926の方法により大豆(Asgrow変種A4922
)へ安定に導入された。形質転換された大豆植物は、グリホサートを含む培地上の選択に

10

20

30

40

50

より同定された。

【 0 0 6 5 】

脂肪酸組成物は、ガスクロマトグラフィーを用いてイントロン発現構築体により形質転換された大豆系の種子から分析された。T2 プールされた種子およびT2 単独種子油組成物は、非形質転換大豆からの種子と比較して、モノおよびポリ不飽和脂肪酸組成物が、遺伝形質転換大豆系列からの種子油において変化したことを明示している。表1 は、説明した構築体を用いて得られた結果の要約を示している。これらのデータは、デサチュラーゼ遺伝子の非コード領域のセンスおよびアンチセンス発現が脂肪酸組成物を変化させることを明らかに示している。このデータはまた、脂肪酸組成物を変える種々の系列を得るためにイントロンが使用できることを示す。所望の相対的脂肪酸組成物に依存してこのような系列から選択することができる。さらに、各イントロンは、各脂肪酸のレベルを様々な程度に変更できることから、イントロンの組合せが、所望の組成物に依存して使用できることが考慮されている。

10

【 0 0 6 6 】

【表1】

表 I

			オレイン	リノール	リノレン
Fad 2	方向	結果			
野生型 (対照)		5469-5無し、T27°-ル	18.15%	55.59%	7.97%
		10個の種子平均	13.89%	55.89%	9.067%
		5469-27無し、T27°-ル	19.15%	54.62%	9.32%
		A4922	15.75%	56.1%	8.75%
		5471-13無し、T27°-ル	17.02%	56.49%	9.08%
		10個の種子平均	13.86%	56.14%	9.49%
完全長 cDNA (対照)	センス	5462-133T27°-ル	84%	2.17%	1.55%
		5462-133T2種子	84%	0.59%	1.76%
イントロン	センス	5469-6T27°-ル	29.93%	46.53%	
		5469-8T27°-ル	36.5%	42.11%	5.98%
		最良5469-6T2種子	44.41%	29.34%	6.68%
		最良5469-8T2種子	41.26%	33.16%	5.74%
		5469-14T27°-ル	61.06%	16.42%	7.75%
		5469-20T27°-ル	48.89%	31.61%	4.89%
		5469-22T27°-ル	80%	2.97%	4.78%
		最良5469-14T2種子	62.21%	11.97%	8.81%
		5485-3T27°-ル	63.54%	14.09%	7.32%
		5485-53T27°-ル	47.58%	27.64%	7.81%
	アンチセンス	5471-8T27°-ル	31.05%	43.62%	7.07%
		5471-2T27°-ル	27.98%	48.88%	6.83%
		5471-26T27°-ル	32.66%	44.54%	6.76%
		最良5471-8T2種子	57.4%	23.37%	5.73%
		最良5471-2T2種子	28.08%	46.14%	6.52%
		最良5471-26T2種子	43.3%	34.15%	5.6%
		5486-33T27°-ル	32.37%	43.66%	6.87%
		5486-12T27°-ル	27.32%	46.97%	6.4%
		5486-40T27°-ル	26.79%	48.72%	6.55%
Fad 3					
野生型 (対照)		5473-7無し、T27°-ル	15.65%	56.74%	9.55%
		A4922T27°-ル	19.84%	56.79%	7.48%
完全長 cDNA (対照)	センス	5464-50T27°-ル	18.06%	62.03%	2.75%
		最良5464-50T2種子	17.08%	62.44%	1.72%
イントロン1	アンチセンス	5473-8T27°-ル	33.47%	45.97%	5.54%
		5473-1T27°-ル	33.34%	42.67%	7.59%
イントロン2	アンチセンス	5466-20T27°-ル	28.43%	48.83%	6.37%
		5466-16T27°-ル	27.61%	49.92%	5.96%
イントロン4	センス	5455-19T27°-ル	40.35%	39.97%	4.61%
		5455-10T27°-ル	35.14%	43.59%	5.53%
		5455-57T27°-ル	38.04%	42.44%	5.24%
		5455-76T27°-ル	37.24%	42.42%	5.37%
		5455-107T27°-ル	36.44%	42.72%	5.62%
		最良5455-57T2種子	45.36%	35.55%	4.92%
		最良5455-76T2種子	35.3%	43.54%	5.53%
		最良5455-107T2種子	45.56%	34.85%	5.12%
	アンチセンス	5459-2T27°-ル	34.5%	43.87%	5.59%
		5459-6T27°-ル	33.78%	44.12%	5.62%
		5459-20T27°-ル	28.26%	49.48%	5.5%
		最良5459-2T2種子	61.45%	23.45%	3.38%
		最良5459-6T2種子	53.51%	29.68%	3.53%

		最良5459-20T2種子	30%	50.55%	4.15%
イントロン5	センス	5456-38T27°-ル	28.23%	49.59%	6.74%
		5456-62T27°-ル	28.94%	48.66%	6.25%
		最良5456-62T27°-ル	29.5%	43.69%	5.4%
	アンチセンス	5460-9T27°-ル	29.78%	48.57%	5.54%
		5460-21T27°-ル	28.37%	49.79%	5.54%
		最良5460-21T2種子	35.18%	40.52%	5.33%

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

本明細書に言及されている全ての出版物および特許出願は、本発明に係る当業者の技能レベルを表す。参照のためにここに組入れている全ての出版物および特許出願は、各個別の出版物または特許出願と同程度に具体的に、また個別に参照のために組入れられていることを表す。

【 0 0 6 8 】

前述の発明は、明確な理解の目的上、図解や例によってかなり詳細に記述したが、添付の請求項の範囲内である一定の変更および修飾が実施され得ることは明らかであろう。

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

10

<110> Fillatti, Joanne J.

<120> Nucleic Acid Sequences and Methods of
Use for the Production of Plants with Modified
Polyunsaturated Fatty Acids

<130> 17138/00/WO

<140> new application

<141> 2000-08-11

<150> 60/151,224

<151> 1999-08-26

<150> 60/172,128

<151> 1999-12-17

<160> 33

20

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4497

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 1

```

cttgcttggt aacaacgtcg tcaagttatt attttgttct tttttttttt atcatatttc      60
ttatttttgt ccaagtatgt catattttga tccatcttga caagtagatt gtcattgtagg      120
aataggaata tcacttttaa ttttaaagca ttgattagtc ttaggcaat attgtcttct      180
tcttctctct tattaatat ttttattctg ccttcaatca ccagttatgg gagatggatg      240
taatactaaa taccatagtt gttctgcttg aagtttagtt gtatagttgt tctgcttgaa      300
gtttagttgt gtgtaatgtt tcagcgttgg cttccctgt aactgctaca atggtactga      360
atatatatat ttgcatgtgt tcattttttt cttttactta atcttcattg ctttgaaatt      420
aataaaacaa aaagaaggac cgaatagttt gaagtttgaa ctattgccta ttcattgtaac      480
ttattcacc aatcttatat agttttctg gtagagatca ttttaaattg aaggatataa      540
attaagagga aatacttgta tgtgatgtgt ggcaatttgg aagatcatgc gtagagagtt      600
taatggcagg ttttgcaaat tgacctgtag tcataattac actgggacct ctccgagttt      660
tgtgcctttt tgtgtcgtct gtgtttggtt ctgcatgtta gcctcacaca gatatttagt      720
agttgttgtt ctgcatataa gcctcacacy tataactaac gagtgaacct caaatcatg      780
gccttacacc tattgagtga aattaatgaa cagtgcattg gattatgtga ctgtgacaca      840
accocgggtt ttcataattgc aatgtgctac tgtggtgatt aacctgcta cactgtcgtc      900
cttggttgtt tccctatgta tattgatacc ataaattatt actagtatat cattttatat      960
tgtccatacc attacgtgtt tatagtcctt ttatgacatg taattgaatt ttttaattat      1020
aaaaaataat aaaacttaat tacgtactat aaagagatgc tcttgactag aattgtgatc      1080
tcttagtttc ctaaccatat actaatattt gcttgatttg atagccctc cgttcccaag      1140
agtataaaac tgcattcgaat aatacaagcc actaggcatg gtaaatataa ttgtgcctgc      1200
acctcggtat atttcattgt ggggttcata tttttgttga ggaaaagaaa ctcccgaaat      1260
tgaattatgc atttatatat cctttttcat ttctagattt cctgaaggct taggtgtagg      1320
cacctagcta gtagctacaa tatcagcact tctctctatt gataaacaat tggctgtaat      1380
gccgcagtag aggacgatca caacatttct tgctggttac tttttgtttt atggtcatga      1440
tttcaacttc tctaactctc ccattcattt tgtagttgtc attatcttta gatttttcac      1500

```

30

tacctgggttt	aaaattgagg	gattgtagtt	ctgtctgtac	atattacaca	ttcagcaaaa	1560
caactgaaac	tcaactgaac	ttgttttatac	tttgacacag	ggtctagcaa	aggaacaac	1620
aatgggaggt	agaggctcgtg	tggcaaaagt	gaagtccaag	ggaagaagcc	tctctcaagg	1680
gttccaaaca	caaagccacc	attcactgtt	ggccaactca	agaaagcaat	tccaccacac	1740
tgtcttcagc	gctccctcct	cacttcattc	tcctatgttg	tttatgacct	ttcatttgcc	1800
ttcattttct	acattgccac	cacctacttc	cacctccttc	ctcaaccctt	ttccctcatt	1860
gcatggccaa	tctattgggt	tctccaaggt	tgccttctca	ctgggtgttg	ggtgattgct	1920
cacgagtggt	gtcacccatgc	cttcagcaag	taccaatggg	ttgatgatgt	tgtgggtttg	1980
acccttcact	caacactttt	agtcccttat	ttctcatgga	aaataagcca	tcgcccgcct	2040
cactccaaca	cagggttccct	tgaccgtgat	gaagtgtttg	tcccaaaacc	aaaatccaaa	2100
gttgcatggg	tttccaagta	cttaaacac	cctctaggaa	gggctgtttc	tcttctcgtc	2160
acactcacaa	taggggtggcc	tatgtattta	gccttcaatg	tctctggtag	accctatgat	2220
agttttgcaa	gccactacca	cccttatgct	cccataatatt	ctaaccgtga	gaggcttctg	2280
atctatgtct	ctgatgttgc	tttgttttct	gtgacttact	ctctctaccg	tgttgcaacc	2340
ctgaaagggt	tgggtttggct	gctatgtgtt	tatgggggtc	ctttgtctcat	tgtgaacggt	2400
tttctctgtg	ctatcacata	tttgcagcac	acacactttg	ccttgctcca	ttacgattca	2460
tcagaaatgg	actggctgaa	gggagctttg	gcaactatgg	acagagatta	tgggattctg	2520
aacaagggtgt	ttcatcacat	aactgatact	catgtggctc	accatctctt	ctctacaatg	2580
ccacattacc	atgcaatgga	ggcaaccaat	gcaatcaagc	caatattggg	tgagtactac	2640
caatttggat	acacaccatt	ttacaaggca	ctgtggagag	aagcgagaga	gtgcctctat	2700
gtggagccag	atgaaggaa	atccgagaag	ggcgtgtatt	ggtacaggaa	caagtattga	2760
tggagcaacc	aatgggcat	agtgggagtt	atgggaagtt	tgtcatgtat	tagtacataa	2820
ttagtagaatt	gttataaata	agtggatttg	ccgcgttaatg	actttgtgtg	tattgtgaaa	2880
cagcttgttg	cgatcatggg	tataatgtaa	aaataattct	ggtattaatt	acatgtggaa	2940
agtgttctgc	ttatagcttt	ctgcctaaaa	tgcacgtctc	acgggacaat	atcattggta	3000
atttttttaa	aatctgaatt	gaggctactc	ataatactat	ccataggaca	tcaaagacat	3060
gttgcatgga	ctttaagcag	aggttcatct	agaggattac	tgcataggct	tgaactacaa	3120
gtaatttaag	ggacgagagc	aactttagct	ctaccacgtc	gttttacaag	gttattaaaa	3180
tcaaatgtgat	cttattaaaa	ctgaaaattt	gtaataaaat	gctattgaaa	aattaaaaata	3240
tagcaaacac	ctaaattgga	ctgattttta	gattcaaatt	taataattaa	tctaaattaa	3300
acttaaat	tataatatat	gtcttgtaat	atatcaagtt	ttttttttta	ttattgagtt	3360
tggaaacata	taataaggaa	cattagttaa	tattgataat	ccactaagat	cgacttagta	3420
ttacagtatt	tggatgattt	gtatgagata	ttcaaacctc	actcttatca	taatagagac	3480
aaaagttaat	actgatgggt	gagaaaaaaa	aatgttattg	ggagcatatg	gtaagataag	3540
acggataaaaa	atatgctgca	gcctggagag	ctaattgtatt	ttttggtgaa	gttttcaagt	3600
gacaactatt	catgatgaga	acacaataat	atcttctact	tacctatccc	acataaaaata	3660
ctgatttttaa	taatgatgat	aaataatgat	taaaatattt	gattctttgt	taagagaaat	3720
aaggaaaaaca	taaatattct	catggaaaaa	tcagcttgta	ggagtagaaa	ctttctgatt	3780
ataatttttaa	tcaagtttaa	ttcattcttt	taattttatt	attagtagaaa	aatcattctc	3840
ttgaatttag	agatgtatgt	tgtagcttaa	tagtaatttt	ttatttttat	aataaaaattc	3900
aagcagtcaca	atttcatcca	aataatcgtg	ttcgtgggtg	taagtcagtt	attccttctt	3960
atcttaatat	acacgcaaa	gaaaaaataa	aaataaaatt	cgaggaagcg	cagcagcagc	4020
tgataccacg	ttgggtgacg	aaactgataa	aaagcgcgtg	cattgtgtct	ttgtttgac	4080
atcttcacaa	tcacatctcc	agaacacaaa	gaagagtgc	ccttcttctt	gttattccac	4140
ttgcgttagg	tttctacttt	cttctctctc	tctctctctc	tcttcattcc	tcatttttcc	4200
ctcaaacac	caatcaattt	tcattcagat	tcgtaaaatt	ctcgattaga	tcacgggggt	4260
aggctctccca	ctttatcttt	tcccaagcct	ttctctttcc	ccctttccct	gtctgccccca	4320
taaaattcag	gatcggaac	gaactgggtt	cttgaatttc	actctagatt	ttgacaaaatt	4380
cgaagtgtgc	atgcactgat	gcgaccact	ccccctttt	tgcattaaac	aattatgaat	4440
tgagggtttt	cttgcgatca	tcattgcttg	aattgaatca	tattaggttt	agattct	4497

<210> 2
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Glycine max

10

20

30

```

<400> 2
gtaaattaaa ttgtgcctgc acctcgggat atttcattgtg gggttccatca tatttgttga      60
ggaaaaagaaa ctcccgaat tgaattatgc atttatatat cctttttcat ttctagatttt      120
cctgaaggct taggtgtagg cacttagcta gtactacaa tatcagcact tctctctatt      180
gataaacaat tggctgtaat gccgcagtag aggacgatca caacatttcg tgctggttac      240
tttttgtttt atggtcattga ttccactctc tcaaatctct ccattcattt tgtagtgtgc      300
attatcttta gatttttcac tacctgggtt aaaattgagg gattgtagtt ctgttggtac      360
atattacaca ttcagcaaaa caactgaaac tcaactgaac ttgtttatac tttagacacag      420

```

```

<210> 3
<211> 4010
<212> DNA
<213> Glycine max

```

```

<400> 3
acaaagcctt tagcctatgc tgccaataat ggataccaac aaaaggggttc ttcttttgat      60
tttgatccta gcgctcctcc accgtttaag attgcagaaa tcagagcttc aataccaaaa      120
cattgctggg tcaagaatcc atggagatcc ctacgttatg ttctcagggg tgtgcttgta      180
attgctgcat tgggtggctgc agcaattcac ttcgacaact ggcttctctg gctaattctat      240
tgccccattc aaggcacaat gttctgggct ctctttgttc ttggacatga ttggtaataa      300
tttttgtgtt tcttactctt tttttttttt ttttgtttat gatattgaatc tcacacattg      360
ttctgttatg tcatctcttc ttcatattggc tttagacaac ttaaatttga gatctttatt      420
atgtttttgc ttatatggta aagtgtattct tcattatttc attcttcatt gattgaattg      480
aacagtggcc atgggaagctt ttcatagatgc cctttgctga atagcctggg gggacacatc      540
ttgcatctct caattcttgt gccataccat ggatgggttag ttcatactgg cttttttgtt      600
tgttcatttg tcattgaaaa aaaatctttt gttgattcaa ttatttttat agtgtgtttg      660
gaagcccggt tgagaaaaata agaaatcgca tctggaatgt gaaagtata actatttagc      720
ttcatctgtc gttgcaagtt cttttatttg ttaaattttt atagcgtgct aggaaaccca      780
ttcgagaaaa taagaaatca catctggaat gtgaaagtta taactgttag cttctgagta      840
aacgttgaaa aaccacattt tggattttga accaaatttt atttgataaa tgacaaccaa      900
attgattttg atggattttg caggagaatt agccacagaa ctccaccatga aaaccatgga      960
cacattgaga aggatgagtc atgggttcca gtatgtgatt aattgcttct cctatagtgt      1020
ttcttgattc aattacattt tatttatttg gttaggtcaa gaaaaaaggg aatctttatg      1080
cttctgagg crgttcttga acatggctct tttttatgtg tcattatctt agttaacaga      1140
gaagatttac aagaatctag acagcatgac aagactcatt agattcactg tgccatttcc      1200
atgtttgtgt atccaattta tttggtgagt gattttttga cttggaagac aacaacacat      1260
tattattata atatggttca aaacaatgac tttttcttta tgatgtgaac tccatttttt      1320
agttttcaag aagccccgga aagggaaggct ctcaactcaa tccctacagc aatctgtttc      1380
caccagtgga gagaaaaagga atagcaatat caacactgtg ttgggctacc atgttttctc      1440
tgcttatcta tctctcattc attaactagt ccacttctag tgctcaagct ctatggaatt      1500
ccatattggg taactaaaatt actcctacat tgttactttt tctctctttt ttttattatt      1560
tcaattctcc aattggaaat ttgaaatagt taccataatt atgtaattgt ttgatcatgt      1620
gcagatgttt gttatgtggc tggactttgt cacatacttg catcaccatg gtcaccacca      1680
gaaactgcct tggtagcgcg gcaaggttaac aaaaaataat agaaaatagt ggggtgaacac      1740
ttaaactgca gtagtaata ctaaaaaaaa gaaaaaaata taggtataat aaataatata      1800
actttcaaaa taaaaagaaa tcatagagtc tagcgtagtg tttggagtga aatgatgttc      1860
acctaccatt actcaagat tttgttgtgt cctttagtgc attcttatta ttttacatat      1920
cttacttgaa aagacttttt aattattcat tgagatctta aagtgaactgt taaattaaaa      1980
taaaaaacaa gtttgttaaa acctcaaata aataagagtg aagggagtgt catttgtctt      2040
ctttctttta ttgcgttatt aatcacgttt ctcttctctt tttttttttt cttctctgct      2100
ttccacccat tatcaagttc atgtgaagca gtggcggtac tatgtaaatg agtggggggc      2160
aattgcaccc acaagatttt attttttatt tgcacaggaa taataaaaata aaactttgcc      2220
cccataaaaa ataaatattt tttcttaaaa taatgcaaaa taaatataag aaataaaaag      2280
agaataaatt attatttaatt ttattatttt gtacttttta tttagttttt ttagcggtta      2340

```

10

20

30

```

gattttttttt tcatgacatt atgtaatctt ttaaaagcat gtaatatctt tattttgtga 2400
aaataaaatat aaatgatcat attagtctca gaatgtataa actaataata attttatcac 2460
taaaagaaat tctaatttag tccataaata agtaaaacaa gtgacaatta tattttatat 2520
ttactttaatg tgaataaata cttgaacatt ataataaaac ttaatgacag gagatattac 2580
atagtgccat aaagatactt taaaaaataa aatcattaat acactgtact actatataat 2640
attcgatata tttttttaac atgattctca atagaaaaat tgtattgatt atattttatt 2700
agacatgaat ttacaagccc cgtttttcat ttatagctct taccgtgtgat ctattgtttt 2760
gcttcgctgt ttttgttggc caagggactt agatgtcaca atattaatac tagaagtaaa 2820
tattttatgaa aacatgtacc ttacctcaac aaagaaaagt tggtaagtgg caacacacgt 2880
gttgcatctt tggcccagca ataacacgtg tttttgtggt gtactaaaaat ggacaggaat 2940
ggagttattt aagaggtggc ctcaaccact tggatcgtga ctatgggttg atcaataaca 3000
ttcaccatga cattggcacc catgttatcc accatctttt ccccaaaatt cctcattatc 3060
acctcgttga agcgggtacat tttattgctt attcacctaa aaacaataca attagtacat 3120
ttgttttacc tcttgggaag tagtcatttt cagttgcctg attctaattg tctctccatt 3180
cttaaatcat gttttcacac ccacttcatt taaaataaga acgtgggtgt tatttttaatt 3240
tctatttact aacatgagaa attaaccttat ttcaagtaat aattttaaaa tatttttatg 3300
ctattatttt attacaaata attatgtata ttaagtttat tgattttata ataattatat 3360
taaaattata tcgatattaa tttttgattc actgatagt ttttatattg ttagtactgt 3420
gattttattt taaaattggc ataaataata tatgtaacca gctcactata ctatactggg 3480
agcttgggtg tgaagggggt tcccaacctt cctttctagg tgtacatgct ttgatacttc 3540
tggtagcttc ttatatcaat ataaattata ttttgctgat aaaaaaacat ggtaaacat 3600
taaatctctt ttttaaaaaa aaaactgtat ctaaactttg tattattaaa aagaagtctg 3660
agattaacaa taaactaaca ctcatcttga ttactgcag acacaagcag caaaaccagt 3720
ctttggagat tactaccgtg agccagaaag atctgcgcca ttaccatttc atctaataaa 3780
gtattttaatt cagagtatga gacaagacca cttcgttaag gacactggag atgttgttta 3840
ttatcagact gattctctgc tctctccact gcaacgagac tgagtttcaa actttttggg 3900
ttattattta ttgattctag ctactcaaatt tacttttttt ttaattgttat gttttctgga 3960
gtttaacgtt ttctgaacaa cttgcaaatt acttgcatag agagacatgg 4010

```

<210> 4
<211> 192
<212> DNA
<213> Glycine max

```

<400> 4
gtaataattt ttgtgtttct tactcttttt tttttttttt tgtttatgat atgaatctca 60
cacattgttc tgttatgtca tttctctctt atttggcttt agacaactta aatttgagat 120
ctttattatg tttttgctta tatggtaaag tgattcttca ttatttcatt cttcattgat 180
tgaattgaac ag 192

```

<210> 5
<211> 348
<212> DNA
<213> Glycine max

```

<400> 5
gttagttcat actggctttt ttgtttgttc atttgtcatt gaaaaaaaat cttttgttga 60
ttcaattatt tttatagtgt gtttgggaag ccgtttgaga aaataagaaa tggcatctgg 120
aatgtgaaag ttataactat ttagcttcat ctgtcgttgc aagttctttt attggttaaa 180
tttttatagc gtgctaggaa acccattcga gaaaaataaga aatcacatct ggaatgtgaa 240
agttataact gttagcttct gagtaaacgt ggaaaaacca cattttggat ttggaaccaa 300
attttatttg ataaatgaca accaaattga ttttgatgga ttttgcag 348

```

<210> 6
<211> 142

10

20

30

<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 6
gtatgtgatt aattgcttct cctatagttg ttcttgattc aattacattt tatttatttg 60
gtaggtccaa gaaaaaaggg aatcttttatg ctccctgagg ctgttcttga acatggctct 120
tttttatgtg tcattatctt ag 142

<210> 7
<211> 1231
<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 7
gtacacaaaa taaatagaaa atagtgggtg aacacttaaa tgcgagatag taatacctaa 60
aaaaagaaaa aaatataggt ataataaata atataacttt caaaataaaa agaaatcata 120
gagtctagcg tagtgtttgg agtgaaatga tgttcaccta ccattactca aagattttgt 180
tgtgtccctt agttcattct tattatttta catatcttac ttgaaaagac tttttaatta 240
ttcattgaga tcttaaaagt actgttaaat taaaataaaa aacaagtttg ttaaaacttc 300
aaataaataa gagtgaaggg agtgtcattt gtcttcttct ttttatttgc ttattaatca 360
cgtttctctt ctcttttttt tttttcttct ctgctttcca ccattatca agttcatgtg 420
aagcagtggt ggatctatgt aaatgagtg ggggcaattg caccacaaag attttatttt 480
ttatttctac aggaataata aaataaaaact ttgccccat aaaaaataaa tattttttct 540
taaaataatg caaaataaat ataagaaata aaaagagaat aaattattat taattttatt 600
attttgtact ttttatttag tttttttagc ggttagattt tttttctatg acattatgta 660
atcttttaaa agcatgtaat atttttattt tgtgaaaata aatataaatg atcatattag 720
tctcagaatg tataaactaa taataatttt atcactaaaa gaaattctaa tttagtccat 780
aaataagtaa aacaagtgac aattatattt tataattact taatgtgaaa taatacttga 840
acattataat aaaacttaat gacaggagat attacatagt gccataaaga tattttaaaa 900
aataaaaatca ttaataacact gtactactat ataattattg atatatattt ttaacatgat 960
tctcaataga aaaattgtat tgattatatt ttattagaca tgaatttaca agccccgttt 1020
ttcatttata gctcttacct gtgatctatt gttttgcttc gctgtttttg ttgggtcaagg 1080
gacttagatg tcacaatatt aatactagaa gtaaatattt atgaaaacat gtaccttacc 1140
tcaacaaaga aagtgtggtg agtggcaaca cacgtgttgc atttttggcc cagcaataac 1200
acgtgttttt gtggtgtact aaaatggaca g 1231

<210> 8
<211> 626
<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 8
gtacatttta ttgcttattc acctaaaaac aatacaatta gtacatttgt tttatctctt 60
ggaagttagt cattttcagt tgcattgattc taatgtcttc tccattctta aatcatgttt 120
tcacaccac ttcatTTaaa ataagaacgt ggggtgttatt ttaatttcta ttaactaaca 180
tgagaaatta acttatttca agtaataatt ttaaaaatatt tttatgctat tattttatta 240
caaataatta tgtatattaa gtttattgat tttaataata ttatattaaa attatatcga 300
tatttaatttt tgattcactg atagtgtttt atattgttag tactgtgcat ttattttaaa 360
attggcataa ataatatatg taaccagctc actatactat actgggagct tgggtggtgaa 420
aggggttccc aaccctcctt tctaggtgta catgctttga tacttctggt accttcttat 480
atcaatataa atttatattt gctgataaaa aaacatggtt aaccattaaa ttcttttttt 540
aaaaaaaaaa ctgtatctaa accttgtatt attaaaaaga agtctgagat taacaataaa 600
ctaacactca tttggattca ctgcag 626

<210> 9

10

20

30

<211> 18		
<212> DNA		
<213> SyntheticArtificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 9		
atacaagcca ctaggcat	18	
<210> 10		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		10
<400> 10		
gattggccat gcaatgaggg aaaagg	26	
<210> 11		
<211> 37		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 11		
cuacuacuac uactcgagac aaagccttta gcctatg	37	
<210> 12		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 12		
caucauaucau auggatccca tgtctctcta tgcaag	36	
<210> 13		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 13		
acgaattcct cgaggtaaata taaattgtgc ctgc	34	
<210> 14		30

<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 14		
gcgagatcta tcgatctgtg tcaaagtata aac	33	
<210> 15		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		10
<400> 15		
gacgcgatgcc cggggtaata atttttgtgt	30	
<210> 16		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 16		
cacgcctcga gtgttcaatt caatcaatg	29	
<210> 17		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 17		
cactcgagtt agttcatact ggct	24	
<210> 18		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 18		
cgcacgcgatt gcaaaatcca tcaaa	25	
<210> 19		30

<211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 19
 cuacuacuac uactcgagcg taaatagtgg gtgaacac 38

<210> 20
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

10

<400> 20
 caucauac auctcgagga attcgtccat tttagtacac c 41

<210> 21
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 21
 cuacuacuac uactcgaggc gcgtacattt tattgctta 39

<210> 22
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 22
 caucauac auctcgagga attctgcagt gaatccaaat g 41

<210> 23
 <211> 1734
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<400> 23
 actatagggc acgcgtgggc gacggccgg gctggctcgc ggtgtgactc agccccaagt 60
 gacgccaacc aaacgcgtcc taactaaggt gtagaagaaa cagatagtat ataagtatac 120
 catataagag gagagtgagt ggagaagcac ttctcctttt tttttctctg ttgaaattga 180
 aagtgttttc cgggaaataa ataaaaataa ttaaaatcct acacactcta ggtaggtact 240
 tctaatttaa tccacacttt gactctatat atgtttttaa aataattata atgcgtactt 300
 acttcctcat tatactaaat ttaacatcga tgattttatt ttctgtttct cttctttcca 360

30


```

cctacataca tcccaaaatt taggggtgcaa ttttaagttt attaacacat gtttttagct 420
gcatgctgcc tttgtgtgtg ctcaccaaatt tgcattcttc tctttatatg ttgtatttga 480
attttcacac catatgtaaa caagattacg tacgtgtcca tgatcaaaata caaatgctgt 540
cttatactgg caatttgata aacagccgtc cattttttct ttttctcttt aactatatat 600
gctctagaat ctctgaagat tctcttgcca tcgaatttct ttcttggtaa caacgtcgtc 660
gttatgttat ttttttattc tttttttatt ttatcatata ttttctctat ttgttcgaa 720
gtatgtcata ttttgatcgt gacaattaga ttgtcatgta ggagtaggaa tatcacttta 780
aaacattgat tagtctgtag gcaatattgt cttctttttc ctcctttatt aatatatttt 840
gtcgaagtgt taccacaagg ttgatctcgt tttttgtcc ctttctcttg ttctttttac 900
ctcaggtatt ttagtctttc atggattata agatcactga gaagtgtatg catgtaatac 960
taagcaccat agctgttctg cttgaattta tttgtgtgta aattgtaatt ttccagcgtt 1020
ggctttccct gtatctgtca caatgggtact gtatatctat tttttgcatt gttttcattt 1080
tttcttttac ttaattctta ttgctttgaa attaataaaa caataataa tagtttgaa 1140
tttgaactat tgcctattca tgaatttaac ttattcactg actcttattg ttttctgggt 1200
agaattcatt ttaaattgaa ggataaatta agaggcaata cttgtaaaatt gacctgtcat 1260
aattacacag gacctgtttt tgtgcctttt tgtctctgtc tttggttttg catgttagcc 1320
tcacacagat atttagtagt tgttctgcat acaagcctca cactataact aaaccagtgg 1380
acctcaaggt catggcctta cacctatttg atgcgagttc gtgacacaac ccctggtttc 1440
catattgcaa tggctacgc cgtctcctt gtttgtttcc atatgtatat tgataccatc 1500
aaattattat atcatctata tggctcggac cattacgtgt actctttatg acatgtaatt 1560
gagtttttta attaaaaaaa tcaatgaaat ttaactacgt agcatcata agagataatt 1620
gactagaaat ttgatgactt attctttcct aatcatattt ccttgtattg atagccccgc 1680
tgtccctttt aaactccga gagagtataa aactgcacg aatattacaa gatg 1734

```

<210> 24
<211> 405
<212> DNA
<213> Glycine max

```

<400> 24
gtatgatgct aaattaaatt gtgcctgcac cccaggatat ttcattgtggg attcatcatt 60
tattgaggaa aactctccaa attgaatcgt gcattttatat tttttttcca tttctagatt 120
tcttgaaggc ttatgggtata ggcacctaca attatcagca cttctctcta ttgataaaca 180
attggctgta ataccacagt agagaacgat cacaacattt tgtgctgggt acccttttgtt 240
ttatggctcat gatttcactc tctctaattc gtcacttccc tccattcatt ttgtacttct 300
catatttttc acttccctgg tgaattttgt agttctcttg gtacatacta gtattagaca 360
ttcagcaaca acaactgaac tgaacttctt tatactttga cacag 405

```

<210> 25
<211> 98
<212> DNA
<213> Glycine max

```

<400> 25
gtgagtgtatt ttttgacttg gaagacaaca acacattatt attataatat ggttcaaaac 60
aatgactttt tctttatgat gtgaactcca ttttttag 98

```

<210> 26
<211> 115
<212> DNA
<213> Glycine max

```

<400> 26
gtaactaaat tactcctaca ttgttacttt ttcctccttt tttttattat ttcaattctc 60
caattggaaa ttgaaatag ttaccataat tatgtaattg ttgatcatg tgcag 115

```

10

20

30

<210> 27
 <211> 778
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(778)
 <223> n = A,T,C or G

<400> 27
 atacaagcca ctaggcatgg taaattaaat tgtgcctgca cctcgggata tttcatgtgg 60
 ggttcatcat atttgttgag gaaaagaaac tcccgaatt gaattatgca tttatatatc 120
 ctttttcatt tctagatttc ctgaaggctt aggtgtaggc acctagctag tagctacaat 180
 atcagcactt ctctctattg ataaacaatt ggctgtaatg ccgcagtaga ggacgatcac 240
 aacatttctg gctggttact ttttgtttta tggctcatgat ttcactctct ctaatctctc 300
 cattcatttt gtagttgtca ttatcttttag atttttcaact acctgggtta aaattgaggg 360
 attgtagttc tgttgggtaca tattacacat tcagcaaaac aactgaaact caactgaact 420
 tgtttatact ttgacacagg gtctagcaaa ggaacaaca atgggaggta gaggtcgtgt 480
 ggccaaagtg gaagttcaag ggaagaagcc tctctcaagg gttccaaaca caaagccacc 540
 attcactgtt ggccaactca agaaagcaat tccaccacac tgctttcagc gctccctcct 600
 cacttcattc tctatgtgtt tttatgacct ttcatttgc ttcattttct acattgccac 660
 cacctacttc cacctccttc ctcaaccctt tccctcatt gcattggcaa tcaagccgaa 720
 ttctgcagat atccatcaca tggcggcggn tggngnaggn ntntanaggg cccaattc 778

10

<210> 28
 <211> 148
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<400> 28
 gtaatctcac tctcacactt tctttatata tcgcacacca gtgtgggtta tttgcaacct 60
 acaccgaagt aatgccctat aattaatggg gtttaacacat gtccaagtcc aatattttgt 120
 tcactttatt gaacttgaac atgtgttag 148

20

<210> 29
 <211> 361
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<400> 29
 gtatccatt taacacaatt tgtttcatta acattttaag agaatttttt tttcaaaata 60
 gttttcgaaa ttaagcaaat accaagcaaa ttgttagatc tacgcttgta cttgttttaa 120
 agtcaaatc atgaccaaatt tgcctcaca agtccaaacc gtccactatt ttattttcac 180
 ctactttata gccaatttg tcatattggtt acttcagaaa agagaacccc attttagta 240
 aatatattat ttatgaatta tggtagtttc aacataaaac atattttatgt gcagttttgc 300
 catccttcaa aagaagatag aaacttactc catgttactc tgtctatatg taatttcaca 360
 g 361

<210> 30
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Glycine max

30

<400> 30
 gcgatcgaatg tatgatgcta aattaaattg tgcctg 36

<210> 31
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<400> 31
 gcggaattcc tgtgtcaaag tataaagaag 30

<210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<400> 32
 catgctttct gtgctttctc 19

40

<210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<400> 33
 gttgatccaa ccatagtcg 19

フロントページの続き

(72)発明者 ファイラツテイ, ジョアン・ジエイ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 5 6 1 6、デビス、ラツセル・ブールバード・3 6 7 5 7

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 特表平07-501701(JP, A)
特表平08-503364(JP, A)
米国特許第05850026(US, A)
Plant Sci., 1998, Vol.136, No.2, p.181-194
Plant Cell, 1994, Vol.6, p.147-158

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
A01H 5/00-5/12
C12N 9/00-9/99
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
WPI