

(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 1

C 12 N	15/113	(2010.01)	C 12 N	15/00	Z N A G
A O 1 H	5/00	(2006.01)	A O 1 H	5/00	A
A O 1 H	5/10	(2006.01)	A O 1 H	5/10	
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00	1 O 3
C 12 N	9/02	(2006.01)	C 12 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)

前置審査

(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

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 ad 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 ad 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 ad 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。

10

【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 ad 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、

20

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) 26 ~ 80 % のオレイン酸、2 . 97 ~ 49 . 92 % のリノール酸、および 3 . 38 ~ 8 . 81 % のリノレン酸；または

(b) 50 ~ 75 % のオレイン酸、わずか 10 ~ 30 % 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) 26 ~ 80 % のオレイン酸、2 . 97 ~ 49 . 92 % のリノール酸、および 3 . 38 ~ 8 . 81 % のリノレン酸；または

(b) 50 ~ 75 % のオレイン酸、わずか 10 ~ 30 % 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】

【0001】

導入部分

本出願は、1999年8月26日に出願された米国仮特許出願第 60 / 151 , 224 号、および 1999 年 12 月 17 日に出願された米国仮特許出願第 60 / 172 , 128 号への優先権を特許請求するものである。

【0002】

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。

【0003】

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。

【0004】

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。

【0005】

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ようである。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 16 および 18 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」と呼ばれることが多い）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クエ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。

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、本発明の一部分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、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ニングが同定され、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ニングが同定され、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ニングの各々から得られ、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ニング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意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。

【0018】

本発明の配列は、植物における脂肪酸組成物を修飾できるのに使用できる（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。

【0019】

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できが考慮されている。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できが考慮されている。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。

【0020】

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。

【0021】

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。

【0022】

本発明はまた、式：X - (R₁)_n - (R₂) - (R₃)_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、R₁およびR₃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、R₂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、R₂は、その5'末端残基はR₁に結合して左側にあり、その3'末端残基はR₃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。

【0023】

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。 10

【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、5×SSC(150 mM NaCl、15 mMクエン酸トリナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×デンhardt(Denhardt)溶液、10%硫酸デキストラン、および20 µg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含んで成る溶液中、42°Cで一晩培養し、次いで約65°Cで0.1×SSC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プ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。 20

【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ニング類を単離し、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ニング類を単離する。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。 30

【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をスクリーニングし、そのプローブにハイブリダイズするライプ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ライプ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。 40

【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%の配列相同意性）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 USA (1989) 86: 1934-1938を参照）。

【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 Heijne, 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ープログラムは、限定しないが、GCG (Devereux, J.ら、Nucleic Acids Research 12(1): 387(1984); 一挙いの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, TBLAS N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TBLASN)(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、NCB I NLM NIH、メリーランド州ベセスタ; Altschul, S.ら、J. Mol. Biol., 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。

【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：

10

20

30

40

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BLOSUM 62、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 - 10919 (1992)

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ーグループから「gap」プログラムとして公的に入手できる。末端gapにペナルティー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ー：50

ギャップ長レンジスペナルティー：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ーグループから「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)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。

40

【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。

【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 (Odeelら、(1985) Nature 313: 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、ナビン (n a p i n) (K r i d l e ら、S e e d S c i . R e s . 1 : 2 0 9 : 2 1 9 (1 9 9 1))、ファセオリン、ゼイン、大豆トリプシン阻害剤、A C P 、ステアロイル - A C P デサチュラーゼ、- コングリシニン (c o n g l y c i n i n) の大豆 ' サブユニット (C h e n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 8 3 : 8 5 6 0 - 8 5 6 4 (1 9 8 6)) およびオレオシン (o l e o s i n) 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 (C T P) またはプラスチド透過ペプチド (P T P) 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C T P 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、V o n H e i j n e ら、(1 9 9 1) P l a n t M o l . B i o l . R e p . 9 : 1 0 4 - 1 2 6 ; C l a r k ら (1 9 8 9) J . B i o l . C h e m . 2 6 4 : 1 7 5 4 4 - 1 7 5 5 0 ; d e l l a - C i o p p a ら (1 9 8 7) P l a n t P h y s i o l . 8 4 : 9 6 5 - 9 6 8 ; R o m e r ら (1 9 9 3) B i o c h e m . B i o p h y s . R e s C o m m u n . 1 9 6 : 1 4 1 4 - 1 4 2 1 ; および S h a h ら、(1 9 8 6) S c i e n c e 2 3 3 : 4 7 8 - 4 8 1 を参考されたし。

【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 (S m i t h ら、(1 9 8 8) N a t u r e 3 3 4 : 7 2 4 - 7 2 6) 、共抑制 (N a p o l i ら、(1 9 8 9) P l a n t C e l l 2 : 2 7 9 - 2 8 9) 、リボチーム (P C T 公報 W O 第 9 7 / 1 0 3 2 8 号) 、センスおよびアンチセンスの組合せ (W a t e r h o u s e ら、(1 9 9 8) P r o c . N a t l e . A c a d . S c i . U S A 9 5 : 1 3 9 5 9 - 1 3 9 6 4) 、プロモーターの沈黙化 (P a r k ら、(1 9 9 6) P l a n t J . 9 (2) : 1 8 3 - 1 9 4) 、DNA結合蛋白質 (B e e r l i ら、(1 9 9 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 5 : 1 4 6 2 8 - 1 4 6 3 3 ; および L i u ら、(1 9 9 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A : 9 4 : 5 5 2 5 - 5 5 3 0) 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

10

20

30

30

40

50

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。

【0040】

なおその上、転写終結調節領域も、本発明の植物発現構築物内に供し得る。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。

【0041】

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Svabら、(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526-8530およびSvabおよびMaliga(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 90: 913-917および米国特許第5,693,507号に一般に記載されている。10

【0042】

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。20

【0043】

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。30

【0044】

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、-12および-15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。

【0045】

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。40

【0046】

例えば、デナ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、Leeらの米国特許第5,348,886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。

【0047】

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になれば、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用急性宿主、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-プラスミドとの相同的組換えのために、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Dittaら、(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。

【0053】

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。

【0054】

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。

【0055】

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ろうが、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。

【0056】

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

1A. 大豆 12デサチュラーゼ(fad2-1)

大豆 fad2-1 A 配列は大豆 fad2-1 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種の推定ダイズ fad2-1 クローンを同定し、ブラーク精製した。3種のダイズ fad2-1 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(14-1および11-12)は、同一であり、ダイズ fad2-1 c DNA と厳密にマッチした。全 fad2-1 A クローンの配列は、SEQ ID NO: 1 で供される。

【0057】

この完全長クローンを得る前に、fad2-1 A ゲノムクローンの一部を、5' 非翻訳配列(プライマー 12506、5' - ATACAAGCCACTAGGCCAT - 3'、SEQ ID NO: 9)から c DNA(プライマー 11698: 5' - GATTGGCCA TGCAATGAGGGAAAAGG - 3'、SEQ ID NO: 10)内にデザインされたPCRプライマーを用いて PCR 増幅した。fad2-1 A イントロンを含んだこのPCR生成物を、ベクター pCR 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 fad2-1 A 部分ゲノムクローン(SEQ ID NO: 27)およびそのイントロン領域(SEQ ID NO: 2)を、Macvector における Pus t e l 1 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、ATG 開始コドンの後から始まり、420 個の塩基長である。

【0058】

第2の fad2-1 遺伝子科メンバーもまた、同定しクローン化し、ここでは fad2-1 B と言う。ダイズ fad2-1 B 部分ゲノムクローン(SEQ ID NO: 23)(プロモーター(1~1704 個の塩基対)を含む); 5' UTR(1705~1782 個の塩基対); イントロン番号 1(1786~2190 個の塩基対); fad2-1 B コード化領域(1783~1785 個および 2191~2463 個の塩基対)の一部およびそのイントロン領域(SEQ ID NO: 24)を、Macvector における Pus

10

20

30

40

50

t e l 1 比較プログラムを用いて大豆cDNA配列との比較により同定した。イントロン配列は、ATG開始コドンの後から始まり、405個の塩基長である。

【0059】

1B. 大豆 15デサチュラーゼ(fad3)

部分大豆fad3ゲノム配列を、プライマー10632、5'-CUACUACUACUACTCGAGACAAAGCCTTAGCCTATG-3' (SEQ ID NO: 11) および10633: 5'-CAUCAUCAUCAUGGGATCCCATGTCCTCTCTATGCAAG-3' (SEQ ID NO: 12) を用いて大豆DNAからPCR增幅した。伸長テンプレートPCRシステム(Boehringer Mannheim)を製造元説明書に従って使用した。生じたPCR生成物をベクターpCR2.1(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fad3部分ゲノムクローン配列およびイントロン領域を、MacvectorにおけるPustelle1比較プログラムを用いて大豆fad3cDNA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fad3配列 (SEQ ID NO: 3) から、7種のイントロンが同定された (SEQ ID NO: 4 (イントロン番号1)、SEQ ID NO: 5 (イントロン番号2)、SEQ ID NO: 6 (イントロン番号3A)、SEQ ID NO: 7 (イントロン番号4)、SEQ ID NO: 8 (イントロン番号5)、SEQ ID NO: 25 (イントロン番号3B)、SEQ ID NO: 26 (イントロン番号3C))。イントロン番号1は、192個の塩基対長であり、294位と485位との間に位置し、イントロン番号2は、348個の塩基対長であり、576位と923位との間に位置し、イントロン番号3Aは、142個の塩基対長であり、991位と1132位との間に位置し、イントロン番号3Bは、98個の塩基対長であり、1225位と1322位との間に位置し、イントロン番号3Cは、115個の塩基対長であり、1509位と1623位との間に位置し、イントロン番号4は、1231個の塩基対長であり、1705位と2935位との間に位置し、およびイントロン番号5は、626個の塩基対長であり、3074位と3699位との間に位置する。

【0060】

実施例2 発現構築体

テンプレートとしてfad2-1A部分ゲノムクローン (SEQ ID NO: 27) およびプライマー12701 (5'-ACGAATTCCCTCGAGGTAAATTAAA TTGTGCCCTGC-3' (SEQ ID NO: 13)) および12702 (5'-GCGAGATCTATCGATCTGTCAAAAGTATAAAC-3' (SEQ ID NO: 14)) を用いて、大豆fad2-1Aイントロン配列をPCRにより増幅した。生じた増幅生成物を、ベクターpCR2.1(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fad2-1Aイントロンを発現カセット、pCGN3892にクローン化した。ベクターpCGN3892は、大豆7SプロモーターおよびエンドウPBCS3'を含む。次いで双方の遺伝子融合体を、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に別個に連結した。生じた発現構築物 (pCGN5469センスおよびpCGN5471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。

【0061】

テンプレートとしてfad2-1B部分ゲノムクローン (SEQ ID NO: 23) およびプライマー13883 (5'-GCGATCGATGTATGATGCTAAATTAAATTGTGCCCTG-3' (SEQ ID NO: 30)) および13876 (5'-GCGGAATTCCCTGTCAAAAGTATAAAGAAG-3' (SEQ ID NO: 31)) を用いて、大豆fad2-1Bイントロン配列をPCRにより増幅した。生じた増幅生成物を、ベクターpCR2.1(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fad2-1Bイントロンを、プラスミドpCGN5468(ダイズfad2-1Aイントロン(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)またはpCGN5470(ダイズfad2-1Aイントロン

10

20

30

40

50

(アンチセンス) 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) 中、それぞれ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 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 に別々に連結した。生じた発現構築物 (p C G N 5 4 8 5、f a d 2 - 1 A & B イントロンセンスおよび p C G N 5 4 8 6、f a d 2 - 1 A & 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 f a d 3 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 1 2 5 6 8 : 5' - G A T C G A T G C C C G G G G T A A T A A T T
10 T T T G T G T (SEQ ID NO: 15) および 1 2 5 6 9 : 5' - C A C G C C T C G A G T G T T C A A T T C A A T C A A T G (SEQ ID NO: 16) ; イントロン番号 2、プライマー 1 2 5 1 4 : 5' - C A C T C G A G T T A G T T C A T A C T G G C T (SEQ ID NO: 17) および 1 2 5 1 5 : 5' - C G C A T C G A T T G C A A A A T C C A T C A A A (SEQ ID NO: 18) ; イントロン番号 4、プライマー 1 0 9 2 6 : 5' - C U A C U A C U A C U A C T C G A G C G T A A A T A G T G G G T G A A C A C (SEQ ID NO: 19) および 1 0 9 2 7 : 5' - C A U C A U C A U C A U C T C G A G G A A T T C G T C C A T T T A G T A C A C C (SEQ ID NO: 20) ; イントロン番号 5、プライマー 1 0 9 2 8 : 5' - C U A C U A C U A C T C G A G G C G C G T A C A T T T A T T G C T T A (SEQ ID NO: 21) および 1 0 9 2 9 : 5' - C A U C A U C A U C A U C T C G A G G A A T T C T G C A G T G A A T C C A A A T G (SEQ ID NO: 22) を用いて、大豆 f a d 3 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 P C R により増幅した。各イントロンに対して生じた 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。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、p C G N 3 8 9 2 に別個に連結した。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 R B C S 3' を含む。これらの融合体を、大豆への形質転換のための 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 に連結した。生じた発現構築物 (p C G N 5 4 5 5、f a d 3 イントロン番号 4 イントロンセンス；p C G N 5 4 5 9、f a d 3 イントロン番号 4 イントロンアンチセンス；p C G N 5 4 5 6、f a d 3 イントロン番号 5 イントロンセンス；p C G N 5 4 6 0、f a d 3 イントロン番号 5 イントロンアンチセンス；p C G N 5 4 6 6、f a d 3 イントロン番号 2 イントロンアンチセンス；p C G N 5 4 7 3、f a d 3 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 f a d 3 イントロン番号 3 C および 4 もまた、ここで f a d 3 - 1 B と呼ばれる第 2 の f a d 3 遺伝子科メンバーからも P C R 増幅した。以下のプライマー、5' C A T G C T T T C T G T G C T T C T C 3' (SEQ ID NO: 32) および 5' G T T G A T C C A A C C A T A G T C G 3' (SEQ ID NO: 33) を用いて、ダイズ f a d 3 - 1 B イントロン番号 3 C および 4 を大豆 D N A から P C R 増幅した。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。ダイズ f a d 3 - 1 B イントロン番号 3 C および 4 に関する配列は、SEQ ID NOs: 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

1 2 および 1 5 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 D N A フラグメントは、M c C a b e r a 、(1988) B i o / T e c h n o l o g y 6 : 9 2 3 - 9 2 6 の方法により大豆 (A s g r o w 変種 A 4 9 2 2) 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

より同定された。

【0065】

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

【0066】

【表1】

表 I

Fad 2	方向	結果	オレイン	リノール	リノレン
野生型 (対照)		5469-5無し、T27°-ル 10個の種子平均 5469-27無し、T27°-ル A4922 5471-13無し、T27°-ル 10個の種子平均 A4922	18.15% 13.89% 19.15% 15.75% 17.02% 13.86% 14.95%	55.59% 55.89% 54.62% 56.1% 56.49% 56.14% 55.95%	7.97% 9.067% 9.32% 8.75% 9.08% 9.49% 9.07%
完全長 cDNA (対照)	センス	5462-133T27°-ル 5462-133T2種子	84% 84%	2.17% 0.59%	1.55% 1.76%
イントロン	センス	5469-6T27°-ル 5469-8T27°-ル 最良5469-6T2種子 最良5469-8T2種子 5469-14T27°-ル 5469-20T27°-ル 5469-22T27°-ル 最良5469-14T2種子 5485-3T27°-ル 5485-53T27°-ル	29.93% 36.5% 44.41% 41.26% 61.06% 48.89% 80% 62.21% 63.54% 47.58%	46.53% 42.11% 29.34% 33.16% 16.42% 31.61% 2.97% 11.97% 14.09% 27.64%	5.98% 6.68% 5.74% 7.75% 4.89% 4.78% 8.81% 7.32% 7.81%
	アンチセンス	5471-8T27°-ル 5471-2T27°-ル 5471-26T27°-ル 最良5471-8T2種子 最良5471-2T2種子 最良5471-26T2種子 5486-33T27°-ル 5486-12T27°-ル 5486-40T27°-ル	31.05% 27.98% 32.66% 57.4% 28.08% 43.3% 32.37% 27.32% 26.79%	43.62% 48.88% 44.54% 23.37% 46.14% 34.15% 43.66% 46.97% 48.72%	7.07% 6.83% 6.76% 5.73% 6.52% 5.6% 6.87% 6.4% 6.55%
Fad 3					
野生型 (対照)		5473-7無し、T27°-ル A4922T27°-ル	15.65% 19.84%	56.74% 56.79%	9.55% 7.48%
完全長 cDNA (対照)	センス	5464-50T27°-ル 最良5464-50T2種子	18.06% 17.08%	62.03% 62.44%	2.75% 1.72%
イントロン 1	アンチセンス	5473-8T27°-ル 5473-1T27°-ル	33.47% 33.34%	45.97% 42.67%	5.54% 7.59%
イントロン 2	アンチセンス	5466-20T27°-ル 5466-16T27°-ル	28.43% 27.61%	48.83% 49.92%	6.37% 5.96%
イントロン 4	センス	5455-19T27°-ル 5455-10T27°-ル 5455-57T27°-ル 5455-76T27°-ル 5455-107T27°-ル 最良5455-57T2種子 最良5455-76T2種子 最良5455-107T2種子	40.35% 35.14% 38.04% 37.24% 36.44% 45.36% 35.3% 45.56%	39.97% 43.59% 42.44% 42.42% 42.72% 35.55% 43.54% 34.85%	4.61% 5.53% 5.24% 5.37% 5.62% 4.92% 5.53% 5.12%
	アンチセンス	5459-2T27°-ル 5459-6T27°-ル 5459-20T27°-ル 最良5459-2T2種子 最良5459-6T2種子	34.5% 33.78% 28.26% 61.45% 53.51%	43.87% 44.12% 49.48% 23.45% 29.68%	5.59% 5.62% 5.5% 3.38% 3.53%

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

10

20

30

40

50

【0067】

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。

【0068】

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

cttgcttgg	aacaacgtcg	tcaagttatt	attttgttct	tttttttttt	atcatatttc	60
ttatttgtt	ccaaagtatgt	catattttga	tccatcttga	caagtagatt	gtcatgtagg	120
aataggaata	tcactttaaa	ttttaaagca	ttagtagtc	tgtaggcaat	attgtcttct	180
tcttcctct	tattaattt	ttttatctg	ccttcaatca	ccagttatgg	gagatggatg	240
taatactaaa	taccatagg	gttctgttg	aagtttagtt	gtatagttgt	tctgcttgaa	300
gttttagttgt	gtgtatgtt	tcagcggtgg	tttccctgt	aactgtaca	atggtaactga	360
atatatattt	tttgcattgt	tcattttttt	ctttactta	atcttcattt	ctttgaaatt	420
aataaaacaa	aaagaaggac	cgaatagttt	gaagtttcaa	ctattgccta	ttcatgttaac	480
tatttcaccc	aatcttatatt	agttttctg	gtagagatca	ttttaaattt	aaggatataa	540
attaagagga	aataacttgtt	tgtgatgtgt	ggcaatttgg	aagatcatgc	gtagagagtt	600
taatggcagg	tttgcaaat	tgacctgttag	tcataattac	actggggccct	ctcgaggtt	660
tgtgcctttt	tgttgcgtt	gtgttttttt	ctgcatgttta	gcctcacaca	gatattttgt	720
agttgtgtt	ctgcataataa	gcctcacacg	tatactaaac	gagtgaacct	caaaatcatg	780
gccttacacc	tattgagtga	aattaatgaa	cagtgcattt	gagttatgtt	ctgtgacaca	840
accccccgtt	ttcatatttgc	aatgtgttac	tgtgtgtt	aaccttgcata	cactgtcgcc	900
cttgtttttt	tcctttatgtt	tattgtatcc	ataaattatt	actagtatata	cattttatat	960
tgtccatacc	attacgtttt	tatagttctt	ttatgacatg	taattgttatt	ttttaaattat	1020
aaaaaaaataat	aaaaacttaat	tacgtactat	aaagagatgc	tcttgactag	aattgtgtatc	1080
tcttagttt	ctaacccat	actaatattt	gcttgttatt	atagccccctc	cgttcccaag	1140
agataaaaac	tgcattcgaat	aataacaagcc	actaggcatg	gttaaatttttt	ttgtgcctgc	1200
acctcgggat	atttcatgtt	gggttcattca	tatttgttga	gtaaaaagaaa	ctccccgaaat	1260
tgaatttatgc	atttatataat	cctttttcat	ttcttagattt	cctgttgcagg	taggtgtttagg	1320
cacctagcta	gtagctacaa	tatcagcaact	tctcttattt	gataaacaat	tggctgttaat	1380
gccgcagtag	aggacgatca	caacatctcg	tgctggttac	ttttgttttt	atggtcatga	1440
tttcactctc	tctaatctct	ccattcattt	tgtatgttgc	attatcttta	gatttttccac	1500

30

tacctgggtt	aaaattgagg	gattgttagt	ctgttgttac	atattacaca	ttcagcaaaa	1560
caactgaaac	tcaactgaac	ttgtttatac	tttgacacag	ggctctagca	aggaaacaac	1620
aatggggaggt	agaggcggt	tgccaaagt	gaagttcaag	ggaagaagcc	tcttcagg	1680
gttccaaaca	caaagccacc	attctacttt	ggccaaactca	agaaagcaat	tccaccacac	1740
tgcggccatc	gctccctct	cacticattc	tccatgtt	tttatgacct	tteatttgcc	1800
ttcatatct	acattggcc	cacctacttc	cacctcttc	ctcaacccctt	ttccctcatt	1860
gcatggccaa	tctatgggt	tctccaagg	tgccttctca	ctgggtgtg	ggtgattgt	1920
cacgagtgt	gtcaccatgc	cttcaggcaag	taccaatgg	ttgtatgtt	tgtgggttt	1980
acccttcac	caacacttt	agcccttat	ttctcatgg	aaataagcca	tcggcccat	2040
cactccaaaca	cagggtccct	tgaccgtat	gaagtttgc	tcccaaaacc	aaatccaaa	2100
gttgcattgt	tttccaagta	ctaaacaac	cctctaggaa	ggctgtttc	tcttcgtc	2160
acactcacaa	taggtggcc	tatgttatta	gccttcaatg	tctctgttag	accctatgt	2220
agtttgc	gccactacca	cccttatgt	cccataatatt	ctaaccgtga	gaggcttctg	2280
atctatgtct	ctgatgttc	ttgttttct	gtgacttact	ctctctaccg	tgttgcacc	2340
ctgaaagggt	tggttggct	gttatgttgc	tatgggggtc	cttgcgtcat	tgtgAACGGT	2400
tttcttgc	ctatcacata	tttgccggcac	acacacttgc	ccttgcctca	ttacgatca	2460
tcagaatggg	actggctgaa	gggagcttgc	gcaactatgg	acagagatta	tggattctg	2520
aacaagggt	ttcatacat	aactgtatgc	catgtggc	accatctt	ctctacaatg	2580
ccacatttacc	atgcataatg	ggcaaccat	gcaatcaagc	caatattgg	tgatgtactac	2640
caatttgtat	acacaccatt	ttacaaggca	ctgtggagag	aagcgagaga	gtgcctctat	2700
gtggagccag	atgaggaaac	atccggagaag	ggcgtgtatt	gttacaggaa	caagtattga	2760
tggcgcaacc	aatggccat	atggggatgt	atggaaagt	tgtcatgtat	tagtacataa	2820
tttagttagat	gttataataa	atggatttgc	ccgcgttaatg	actttgtgt	tattgtgaaa	2880
cagttgttg	cgatcatgg	tataatgtaa	aaataatttct	gttatttaatt	acatgtggaa	2940
agtgttctgc	ttatagctt	ctgcctaaaa	tgcacgtgc	acgggacaat	atcattggta	3000
attttttaa	aatctgat	ggggctactc	ataataactt	ccataggaca	tcaaagacat	3060
gttgcattga	ctttaagcag	aggttcatct	agaggattac	tgcataggct	tgaactacaa	3120
gtatatttaa	ggacggagac	aacttttagt	cttaccacgtc	gttttacaa	gttattaaaa	3180
tcaatgtat	cttattaaaa	ctgaaaattt	gtatattaaat	gctattggaa	aattaaaata	3240
tagcaaacac	ctaaatttgg	ctgattttta	gattcaattt	taataattaa	tcttaattaa	3300
acttttaatt	tataatata	gttttgcatt	atataatgtt	ttttttttt	ttattgagg	3360
tgaaacata	taataaggaa	cattgtttaa	tattgtataa	ccactaagat	cgacttagta	3420
ttacagtatt	tggatgattt	gtatgagata	ttcaaaactt	actctctatca	taatagagac	3480
aaaagttat	actgtatgg	gagaaaaaaa	aatgttattt	ggagcatatg	gtatgataag	3540
acggataaaa	atatgtcg	gctggagag	ctaattgtt	ttttgtgtaa	gttttcaagt	3600
gacaactt	catgtgaga	acacataat	attttctact	tacctatccc	acataaaaata	3660
ctgattttaa	taatgtat	aaataatgt	taaaatattt	gatttttgc	taagagaaat	3720
aaggaaaaac	taaattattct	catggaaaaaa	tcagcttgc	ggagtagaaa	ctttctgatt	3780
ataattttaa	tcaagttaa	ttcatttctt	taattttattt	attagttacaa	aatcatttctc	3840
ttgaatttt	agatgtatgt	tgtatgtt	tagtaattt	ttttttttat	aataaaaattt	3900
aaggcgtcaa	atttcattca	aataatctgt	ttcgtgggt	taagtcgtt	atttcatttctt	3960
atcttaat	acacgcaaa	gaaaaataaa	aaataaaaattt	cgaggaagcg	cagcagcagc	4020
tgataccacg	ttgggtgcg	aaactgtat	aaagccgttgc	cattgtgtt	ttttttgtatc	4080
atcttcacaa	tcacatctcc	agaaacacaaa	gaagagtgac	catttttctt	gttattccac	4140
ttgcgtttag	tttctacttt	cttctcttc	tcttcattcc	tcatttttcc	4200	
ctcaaaacaat	caatcaattt	tcattcagat	tcgtaaattt	ctcgattaga	tcacgggggtt	4260
aggtctccca	ctttatctt	tcccaagctt	ttcttttcc	ccctttccct	gtctgccccca	4320
taaaatttgc	gatccggaaac	gaactgggtt	tttgaattt	acttagattt	ttgacaaaattt	4380
cgaagtgtgc	atgcactgtat	gogacccact	ccccctttt	tgcattaaac	aattatgaat	4440
tgagggtttt	tttgcgtatca	tcattgttgc	aattgaatca	tatttaggttt	agatttct	4497

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

30

10

20

<400> 2
gtaaaaataaa ttgtgcctgc acctcgggat atttcatgtg gggttcatca tatttggta 60
ggaaaaagaaa ctcccgaaat tgaattatgc atttatatat ccttttccat ttctagatt 120
cctgaaggt taggtgttagg cacttagta gtagctacaat tacagactt tcctcttatt 180
gataaacaataa tggctgttaa gcccagtag agacgatca caacatttcg tgctggttac 240
tttttgtttt atggctatga ttcaactctc tcaatctct ccattcattt ttagtggtc 300
attatctta gattttcac tacctggttt aaaattgagg gattgttagt ctgtggtagc 360
attatacaca ttcaagaaaa caactgaaac tcaactgaac ttgtttatac tttgacacagc 420

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

<400> 3
acaaggccct tagcctatgc tgccaataat ggataccaaac aaaagggttc ttcttttgc 60
tttgatccta gcgcctctcc accgtttaag attgcagaaa tcagagttc aataccaaaaa 120
cattgtctgg tcaagaatcc atggagatcc ctgcgttgc ttctcgaaaact ggcttcttg 180
attgtctgcatt tggtgcgtgc agcaatttcac ttgcacactt gctaatctat 240
tgccccatcc aaggcacaat gttctgggtt ctcttgcgtt ttggacatgat tggtaataa 300
tttttgtgtt tcttacttctt tttttttttt ttttgtttat gatataatc tcacacattt 360
ttctgtttagt tcatttcttc ttcatgttgc tttagacaaac ttaaaatttga gatctttatt 420
atgtttttttt ttagatgtta aagtgtttt tcatttttttcc attttttttt gatgtttttt 480
aacagtggcc atggaaagctt ttcaagatgc cctttgttgc atagcttgc gggacacatc 540
ttgcatttcc caatttttgc gccataccat ggatgggttgc ttcatacttgc ttttttttttt 600
tggccatttgc tcattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 660
gaaggccgtt tgaaaaataa agaaatccca tctggatgtt gaaaatttttactatttttgc 720
ttcatctgtt gttgcagttt cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 780
ttcgagaaaa taagaaatca catctggat gtggaaatgtt taacttttttgc ttcttgatgtt 840
aacgtggaaa aaccacattt tggtttttttt gggacacatc tttttttttt tttttttttt 900
attgtttttttt atggatgtttt cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 960
cattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1020
ttcttgatcc aattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1080
cttccttgagg ctgttttttgc acatgggtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1140
gaagatttttcc aagaatctgc acacgttgc aagacttcat tttttttttt tttttttttt 1200
atgtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1260
tattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1320
agttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1380
caccatgttgc gggatgttttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1440
tgctttatca tctcttcattt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1500
ccatattttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1560
tcaatttttcc aattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1620
gcagatgttttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1680
gaaacttttttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1740
ttaaatgttgc gatgtatataa tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1800
acttttttttcaaa tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1860
acccatccattt actttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1920
tttactttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1980
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2040
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2100
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2160
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2220
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2280
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2340

gatttttttt	tcatgacatt	atgtaatctt	ttaaaaagcat	gtaatatttt	tatTTTGTGA	2400
aaataaaat	aatgtatcat	attagtctca	gaatgtataa	accaataata	atTTTATCAC	2460
taaaaagaat	tctaatttag	tccataaata	agtaaaacaa	gtgacaatta	tatTTTATAT	2520
ttacttaatg	tgaataata	cttgaacatt	ataataaaac	ttaatgacag	gagatattac	2580
atagtccat	aaagatattt	taaaaaataa	aatcattaat	acactgtact	actatataat	2640
attcgatata	tatTTTAAc	atgattctca	atagaaaaat	tgtattgatt	atatTTTATT	2700
agacatgaat	ttacaagccc	cgttttcat	ttatagctct	tacctgtgt	ctattgttt	2760
gcttcgtgt	ttttgttgt	caaggactt	agatgtcaca	atattaatac	tagaagtaaa	2820
tattatgaa	aacatgtacc	ttacccaac	aaagaaaagt	tggtaagtgg	caacacacgt	2880
gttgcatttt	tggcccagca	ataacacgtg	ttttgttgt	gtactaaaat	ggacaggaat	2940
ggagttatTTT	aagagggtggc	ctcaccactg	tggatcgta	ctatggtgt	atcaataaca	3000
ttcaccatga	cattggcacc	catgttatcc	accatcttt	cccccaaatt	cctcattatc	3060
acctcggtga	agcggjacat	tttattgttt	attcacctaa	aaacaataaca	attagtacat	3120
ttgttttate	tcttggaaag	tagtcattt	cagttgcgtg	attctaatgc	tctctccatt	3180
ctttaatcat	gttttcacac	ccacttcatt	taaaaataaga	acgtgggtgt	tatTTTATT	3240
tctattcact	aacatgagaa	attaacttat	ttcaagtaat	atTTTAAAA	tatTTTATG	3300
cttattatTTT	attacaataa	attatgtata	ttaagtttat	tgatTTTATA	ataattatat	3360
taaaaattata	tcgatattaa	tttttgattc	actgatagt	ttttatattg	ttagtactgt	3420
gcatttttt	taaaatggc	ataaataata	tatgtaacca	gctcactata	ctatactggg	3480
agcttgggt	tgaaagggtt	tcccaaccct	ccttctagg	tgtacatgt	ttgataactc	3540
tggtacccTC	ttatatcaat	ataaaattata	ttttgtgtat	aaaaaaacat	ggtaaaccat	3600
taaattcttC	ttttaaaaaa	aaaactgtat	ctaaactttt	tattttaaa	aagaagtctg	3660
agatataacaa	taaactaaca	ctcatttgg	ttcactgcag	acacaaggag	caaaaccagt	3720
tcttggagat	tactaccgt	agccagaaag	atctgcggca	ttaccatttc	atctaataaa	3780
gtatTTAATT	cagagtatga	gacaagacca	cttcgttaat	gacactggag	atgttgttta	3840
ttatcagact	gattctctgc	tcctccactc	gcaacgagac	ttagtttcaa	actTTTTGGG	3900
ttattttta	ttgattctag	ctactcaa	tactttttt	ttaatgttat	gttttttggg	3960
gtttaaacgtt	ttctgaacaa	cttgcaattt	actgcata	agagacatgg		4010
10						
<210> 4						
<211> 192						
<212> DNA						
<213> Glycine max						
<400> 4						
gtaataaattt	ttgtgtttt	tactctttt	tttttttttt	tgtttatgt	atgtaatctca	60
cacattgttc	tgttatgtca	tttcttcctc	atttggcttt	agacaactta	aatttggat	120
ctttatTTATG	ttttgtctta	tatggtaaag	tgattcttca	ttatTTTATT	cttcattgtat	180
tgaattgtac	ag					192
<210> 5						
<211> 348						
<212> DNA						
<213> Glycine max						
<400> 5						
gttagttcat	actggctttt	ttgtttgttc	atttgcatt	gaaaaaaaaat	cttttggtga	60
ttaaattttt	tttataatgt	gtttggaaagc	ccgtttgaga	aaataagaaaa	tcgcacatctgg	120
aatgtgaaag	ttataactat	ttagcttcat	ctgtcggtgc	aagttctttt	attggttaaa	180
ttttatTTAGC	gtgcttaggaa	accattcga	gaaaataaga	aatcacatct	ggaatgtgaa	240
atttataact	gttagcttct	gagtaaacgt	ggaaaaacca	cattttggat	ttggaaaccaa	300
attttatTTG	ataaaatgaca	accaaattga	ttttgtatgga	ttttgcag		348
<210> 6						
<211> 142						
20						

<210> 5						
<211> 348						
<212> DNA						
<213> Glycine max						
<400> 5						
gttagttcat	actggctttt	ttgtttgttc	atttgcatt	gaaaaaaaaat	cttttggtga	60
ttaaattttt	tttataatgt	gtttggaaagc	ccgtttgaga	aaataagaaaa	tcgcacatctgg	120
aatgtgaaag	ttataactat	ttagcttcat	ctgtcggtgc	aagttctttt	attggttaaa	180
ttttatTTAGC	gtgcttaggaa	accattcga	gaaaataaga	aatcacatct	ggaatgtgaa	240
atttataact	gttagcttct	gagtaaacgt	ggaaaaacca	cattttggat	ttggaaaccaa	300
attttatTTG	ataaaatgaca	accaaattga	ttttgtatgga	ttttgcag		348
<210> 6						
<211> 142						
30						

<211> 18
<212> DNA
<213> Synthetic Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 9
ataacaagcca 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
caucaucauc auggatccca tgtctctcta tgcaag 36

<210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 13
acgaattcct cgaggtaaat taaattgtgc ctgc 34 30
<210> 14

<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
gatecgatgcc cggggtaata attttgtgt 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 agttcataact ggct 24

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 18
cgcatcgatt gaaaaatcca tcaaa 25 30
<210> 19

<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
 caucaucauc auctcgagga attcgtccat ttttagtacac 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
 caucaucauc auctcgagga attctgcagt gaatccaaat g 41

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

 <400> 23
 actatagggc acgcgtggc gacggcccg gctggtcctc ggtgtgactc agccccaaat 60
 gacgccaacc aaacgcgtcc taactaagggt gtagaagaaa cagatgttat ataagtatac 120
 catataagag gagagtggat ggagaacac ttctcctttt tttttctcttg ttgaatattga 180
 aagtgttttc cgggaaataaa ataaaaataaa ttaaaatctt acacactcta ggttaggtact 240
 tc当地ttaa tccacactt gacttatat atgtttaaa aataattata atgcgtactt 300
 acttctcat tataactaat ttaacatcga tgattttatt ttctgtttctt cttctttcca 360

cctacataca	tccaaaattt	tagggtgcaa	tcttaagttt	attaacacat	gttttagct	420
gcatgtgcc	tttgtgtgt	ctcacccaaat	tgcatcttc	tctttatatg	ttgtatttga	480
attttccacac	catatgtaaa	caagattacg	tacgtgtcca	tgtcaaaata	caaatgcgt	540
cttatactgg	caatttgcata	aacagccgtc	cattttttct	ttttctcttt	aactatata	600
getctagaat	ctctgaagat	tcctctgcca	tcgaattttct	ttcttggtaa	caacgtcg	660
gttatgttat	tattttattt	tatcatata	tatttcttat	tttggcgaa	720	
gtatgtcata	ttttgatcg	gacaattaga	ttgtatgt	ggagtaggaa	tatcactt	780
aaacattgtat	tagtctgt	gcaatattgt	cttcttttc	ctcccttatt	aatatattt	840
gtcgaagg	taccacaagg	ttgattcg	ttttttgtcc	cttcttttac		900
ctcaggattt	ttagtcttc	atggattata	agatcactga	gaagtgtat	catgtat	960
taagcaccat	agctgttct	cttgaattt	tttggtgt	attgtat	tttcagcg	1020
ggcttccct	gtagctgcta	caatggact	gtatatctat	tttttgcat	gttttcat	1080
tttcttttac	ttaatcttca	ttgcttggaa	attaaaaaa	caatataata	taatgtt	1140
tttgaactat	tgcatttca	tgtatataac	ttattca	actcttattt	tttttctgg	1200
agaatttatt	ttaaattgaa	ggataaattt	agaggcaata	cttgttaattt	gacctgtcat	1260
aattacacag	gaccctgtt	tgtgcctttt	tgtctctgtc	tttgggtttt	catgttag	1320
tcacacagat	attttagtagt	tgttctgtat	acaagccca	cacgtataact	aaaccagtg	1380
acccaaatgt	catggcctta	caccttgc	atgcgagtct	gtgacacaaac	ccctggttt	1440
catttgc	tgtgtacgc	cgtcgccctt	gtttgtttt	atatgtat	tgataccat	1500
aaattattat	atcatttata	tggtctggac	cattacgt	actcttattt	acatgtat	1560
gagtttttta	attaaaaaaa	tcaatgaaat	ttaactacgt	agcatcat	agagataatt	1620
gactagaaat	ttgatgactt	attcttctt	aatcatattt	tcttgtattt	atagccccgc	1680
tgcccctttt	aaactcccg	gagagtataa	aactgcac	aatattacaa	gat	1734
<210> 24						
<211> 405						
<212> DNA						
<213> Glycine max						
<400> 24						
gtatgtatgt	aaattttttt	gtgcctgcac	cccaggat	ttcatgtggg	attcatcatt	60
tatttggaa	aactctccaa	attgaatcgt	gcattttat	tttttttcca	tttcttagatt	120
tcttgcaggc	ttatgttata	ggcacccata	attatcagca	cttctctcta	ttgataaaca	180
atggctgtt	ataccacagt	agagaacgt	cacaacattt	tgtgtctgg	accttttgg	240
ttatggcata	gatttca	tctctaatct	gtcacttccc	tccatttattt	ttgtacttct	300
catattttt	acttcctgt	tgaaaaattgt	agttcttgc	gtacatacta	gtatttagaca	360
ttcagcaaca	acaactgaac	tgaacttctt	tatactttga	cacag		405
<210> 25						
<211> 98						
<212> DNA						
<213> Glycine max						
<400> 25						
gtgagtgtatt	tttttacttg	gaagacaaca	acacatttatt	attataat	ggttcaaaac	60
aatgactttt	tctttatgtat	gtgaacttca	tttttttag			98
<210> 26						
<211> 115						
<212> DNA						
<213> Glycine max						
<400> 26						
gtaactaaat	tactcctaca	ttgttacttt	ttcctccctt	tttttattat	ttcaatttctc	60
caattggaaa	tttgaatata	tatcataat	tatgtat	tttgatcat	tgca	115
						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

atacaaggcca	ctaggcatgg	taaattaaat	tgtgcctgca	cctcgggata	tttcatgtgg	60
ggttccatcat	attttgttag	gaaaagaaaac	tcccggaaattt	gaattatgca	tttatataatc	120
ctttttcatt	tctagatttc	ctgaaggcctt	aggtgttaggc	acctagctag	tagctacaat	180
atcagcaatt	ctctcttattt	ataaaacaattt	ggctgtatag	ccgcagtaga	ggacgatcac	240
aaacattttgt	gctgggtactt	ttttgtttta	tggtcatgat	ttcactctct	ctaactctc	300
cattcattt	gtagtgttca	ttatcttttag	atttttcact	acctgggtta	aaatttgaggg	360
atttgtgttc	tgttgttaca	tatttacacat	ttagaaaaac	aactgaaact	caactgaact	420
tgtttatact	ttgacacagg	gtcttagcaaa	ggaaaacaaca	atgggaggtt	gaggtcgtgt	480
ggccaaagtg	gaagttcaag	ggaagaagcc	tctctcaagg	gttccaaaca	caaagccacc	540
attcacttgtt	ggccaaactca	agaaaagacat	ttcaccacac	tgccttcagc	gtccctctt	600
cacttcattt	tcctatgtt	tttatgtacct	ttcatttgc	ttcattttct	acatgccccac	660
cacctacttc	caccccttc	ctcaaccctt	ttcccttattt	gcatggccaa	tcaagccgaa	720
ttctgcagat	atccatcaca	tggcggcgn	tggngnaggn	ntntanaggg	cccaatttcc	778

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

<400> 28

gtaatctcac	tctcacactt	tctttataca	tcgcacaccca	gtgtgggtta	tttgcaacct	60
acaccgaaat	aatgccttat	aattaatggg	gttaaacat	gtccaagtcc	aatattttgt	120
tcacttattt	gaacttgaac	atgtgttag				148

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

<400> 29

gtatcccaat	taacacaattt	tgtttcatta	acattttaaag	agaattttttt	tttccaaaata	60
gttttcggaaa	ttaagccaaat	accaaggccaa	ttgttagatc	tacgctgtt	cttggttttaa	120
agtccaaattt	atgaccaaat	tgtctcaca	agtccaaacc	gtccactattt	ttattttcac	180
ctactttata	gcccaatttg	tcattttgtt	acttcagaaa	agagaacccc	atttttagta	240
aatatatttt	ttatgtat	ttgttagttt	aacataaaaac	atatttatgt	gcagttttgc	300
catcccttca	aagaagatag	aaacttactc	catgttactc	tgtctatatg	taatttcaca	360
g						361

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

<400> 30

gcgcgcgcgt	tatgtatgcta	aatttttttg	tgccttg			36
------------	-------------	------------	---------	--	--	----

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

<400> 31

gcggaaattcc	tgtgtcaaag	tataaagaag				30
-------------	------------	------------	--	--	--	----

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

<400> 32

catgctttct	gtgtttctc					19
------------	-----------	--	--	--	--	----

<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 フイラツティ , ジョアン・ジエイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・95616、デイビス、ラツセル・ブルバード・36757

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