

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成21年5月21日(2009.5.21)

【公表番号】特表2008-534023(P2008-534023A)

【公表日】平成20年8月28日(2008.8.28)

【年通号数】公開・登録公報2008-034

【出願番号】特願2008-504678(P2008-504678)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 0 1 H 1/00 (2006.01)

A 0 1 H 5/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 H 1/00 A

A 0 1 H 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成21年3月26日(2009.3.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

関心のあるDNA分子を植物細胞または植物のゲノムに導入し、次いで該関心のあるDNA分子のサブ配列を除去するための方法であって、

a. 前記植物細胞のゲノムに前記関心のあるDNA分子を導入し、その際前記関心のあるDNA分子は、同方向反復において配列された2つのDNA配列によりフランキングされた前記DNA分子の前記サブ配列を含みそして、同方向反復において配置された前記2つのDNA配列の付近に、好ましくは間に位置したレアクリーピング二本鎖DNA切断誘導(DSB)酵素のための少なくとも1つの認識部位を更に含み；

b. 前記関心のあるDNA分子が前記ゲノムに組み込まれている植物細胞を選択しそして該植物細胞から植物を再生させ；

c. 該植物をDSB酵素コードキメラ遺伝子を含む第2植物と交配させ、その際該キメラ遺伝子は、下記の作用的に連結されたDNAセグメント：

i. 小孢子特異的プロモーター；

ii. 前記認識部位を認識する二本鎖DNA切断誘導酵素をコードするDNA領域；

iii. 転写終結およびポリアデニル化領域；

を含み；

d. 前記関心のあるDNA分子および前記DSB酵素コードキメラ遺伝子を含む子孫植物(F1植物)を選択し；

e. 該子孫植物を他の植物と交配させ、その際該子孫植物は花粉ドナーとして使用され；

f. 前記DSB酵素コードキメラ遺伝子を含む子孫植物の集団(F2集団)を選択し；そして、

g. 前記DNA分子のサブ配列が同方向反復において配置された前記2つのDNA配列間で相対的組換えにより欠失させられている子孫植物を選択する；

工程を含む方法。

## 【請求項 2】

h . 前記 DNA 分子の前記サブ配列が欠失している前記子孫植物を他の植物と交配させ ;そして

i . 子孫植物 ( F 3 植物 ) の集団を得、そして前記レアクリーピング D S B I 酵素コードキメラ遺伝子を含むしていない植物を選択する、  
工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記関心のある DNA 分子の前記サブ配列が選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカー遺伝子を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 D S B 誘導酵素が、

## 【表 1】

I-Sce I, I-Chu I, I-Dmo I, I-Cre I, I-Csm I,  
PI-Fli I, Pt-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, PI-Ctr I, PI-Aae I, PI-BSU  
I, PI-DhaI, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mfl I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-  
Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I, PI-Mtu I, PI-  
Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, PI-Pho I,  
PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko IもしくはPI-Tsp I

または Znフィンガー DNA 結合ドメインおよび DNA 開裂ドメインを含むキメラエンドヌクレアーゼの群から選ばれるエンドヌクレアーゼである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 D S B 誘導酵素が I - S c e I である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記二本鎖 DNA 切断誘導酵素をコードする前記 DNA 領域が、配列番号 1 または配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記小孢子特異的プロモーターが配列番号 3 のヌクレオチド配列またはその機能的フラグメントから選ばれるプロモーターフラグメントを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記関心のある DNA 分子の前記サブ配列が、前記 D S B I 酵素のための 2 つの認識部位によりフランキングされている、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記 D S B I 酵素コードキメラ遺伝子がヌクレオチド 1 9 4 1 から 3 9 1 3 までの配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

植物のゲノムにおけるターゲット DNA 配列を関心のある DNA 配列と交換するための方法であって、下記の工程 :

a . 植物の細胞のゲノムにおける予め選ばれた部位において第 1 二本鎖 DNA 切断を誘導し、その際該予め選ばれた部位は、前記ターゲット DNA 配列内に位置しているかまたは前記ターゲット DNA 配列の付近に位置しており ;

b . 関心のある DNA 分子を前記植物細胞に導入し、その際該 DNA 分子は、

i . 前記ターゲット DNA 配列をフランキングしそして好ましくは前記植物細胞のゲノムにおける前記予め選ばれた部位をフランキングしている DNA 領域に対して少なくとも

も 80% 配列相同性を有する 2 つのフランキング DNA 領域の間に位置した前記関心のある DNA 配列；

i i . 前記フランキング DNA 領域の間に位置した選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカー遺伝子であって、同方向反復配列において位置した前記フランキング DNA 領域の 1 つと、部分的フランキング DNA 領域として示された前記フランキング DNA 領域の前記 1 つの少なくとも一部の別のコピーとの間に更に位置している、選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカー遺伝子；

i i i . 同方向反復において位置した前記フランキング DNA 領域の前記 1 つと前記部分的フランキング DNA 領域との間に位置した D S B I 酵素のための認識部位；  
を含み；

c . 前記選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカーを含む植物細胞の集団を選択し；

d . 前記選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカーが前記フランキング DNA 領域を通じて相同的組換えにより導入されている植物細胞を選択し、そして該植物細胞から植物を再生させ；

e . 前記選択可能なマーカー遺伝子を含む前記再生された植物またはその子孫植物を D S B I 酵素コードキメラ遺伝子を含む植物と交配させ、その際該キメラ遺伝子は、下記の作用可能に連結された DNA セグメント；

i v . 小孢子特異的プロモーター；

v . 前記関心のある DNA 内に位置した前記認識部位を認識する二本鎖 DNA 切断誘導酵素をコードする DNA 領域；

v i . 転写終結およびポリアダニル化領域；

を含み；

f . 前記選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカー遺伝子および前記 D S B I 酵素コードキメラ遺伝子を含む子孫植物 ( F 1 植物 ) を選択し；

g . 前記子孫植物を他の植物と交配させ、その際該子孫植物は花粉ドナーとして使用され；

h . 前記 D S B I 酵素コードキメラ遺伝子を含む子孫植物の集団 ( F 2 集団 ) を選択し；そして、

i . 前記選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカー遺伝子が、前記フランキング DNA 領域の前記 1 つと前記フランキング DNA 領域の前記 1 つの一部を含む部分的フランキング DNA 領域との間の相同的組換えにより欠失させられている子孫植物を選択する；

工程を含む方法。

【請求項 1 1】

前記予め選ばれた部位における前記第 1 二本鎖切断が、第 1 D S B I 誘導酵素の導入により誘導され、その際前記第 1 D S B I 誘導酵素は、前記関心のある DNA 内に位置した D S B I 誘導酵素のための前記認識部位を認識しない、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記第 1 D S B I 酵素および前記関心のある DNA 内に位置した前記認識部位を認識する前記 D S B I 酵素が、

## 【表 2】

I-Sce I, I-Chu I, I-Dmo I, I-Cre I, I-Csm I,  
 PI-Fli I, Pt-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, PI-Ctr I, PI-Aae I, PI-BSU  
 I, PI-DhaI, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mfl I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-  
 Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I, PI-Mtu I, PI-  
 Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, PI-Pho I,  
 PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko Iもしくは PI-Tsp I

または Z nフィンガー DNA 結合ドメインおよび DNA 開裂ドメインを含むキメラエンドヌクレアーゼの群から選ばれる 2 つの異なる D S B I 酵素である、請求項 1 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記関心のある DNA 内に位置した D S B I 誘導酵素のための前記認識部位を認識する前記 D S B 誘導酵素が I - S c e I である、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記二本鎖 DNA 切断誘導酵素をコードする前記 DNA 領域が、配列番号 1 または配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

前記小孢子特異的プロモーターが配列番号 3 のヌクレオチド配列またはその機能的フラグメントから選ばれるプロモーターを含む、請求項 1 0 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記 D S B I コードキメラ遺伝子がヌクレオチド 1 9 4 1 から 3 9 1 3 までの配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 0 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法により得ることができる植物。

## 【請求項 1 8】

請求項 1 0 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法により得ることができる植物。

## 【請求項 1 9】

下記の作用可能に連結された DNA セグメント：

i . 小孢子特異的プロモーター；

i i . 前記関心のある DNA 内に位置した前記認識部位を認識する二本鎖 DNA 切断誘導酵素をコードする DNA 領域；

i i i . 転写終結およびポリアデニル化領域；

を含む D S B I 酵素コードキメラ遺伝子を含む植物。

## 【請求項 2 0】

前記小孢子特異的プロモーターが配列番号 3 のヌクレオチド配列またはその機能的フラグメントから選ばれるプロモーターフラグメントを含む、請求項 1 9 に記載の植物。

## 【請求項 2 1】

前記二本鎖 DNA 切断誘導酵素をコードする前記 DNA 領域が、配列番号 1 または配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 9 に記載の植物。

## 【請求項 2 2】

前記 D S B I 酵素コードキメラ遺伝子が、ヌクレオチド 1 9 4 1 からヌクレオチド 3 9 1 3 までの配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 9 に記載の植物。

## 【請求項 2 3】

下記の作用可能に連結された DNA セグメント：

- i . 小胞子特異的プロモーター ;
  - ii . 前記関心のある D N A 内に位置した前記認識部位を認識する二本鎖 D N A 切断誘導酵素をコードする D N A 領域 ; および
  - iii . 転写終結およびポリアデニル化領域 ;
- を含むキメラ遺伝子。

【請求項 2 4】

前記 D N A 領域が、

【表 3】

I-Sce I, I-Chu I, I-Dmo I, I-Cre I, I-Csm I, PI-Fli I, Pt-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, PI-Ctr I, PI-Aae I, PI-BSU I, PI-DhaI, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mfl I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I, PI-Mtu I, PI-Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, PI-Pho I, PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko IもしくはPI-Tsp I

または Z nフィンガー D N A 結合ドメインおよび D N A 開裂ドメインを含むキメラエンドヌクレアーゼから選ばれる二本鎖 D N A 切断誘導酵素をコードする、請求項 2 3 に記載のキメラ遺伝子。

【請求項 2 5】

配列番号 1 または配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む請求項 2 3 に記載のキメラ遺伝子。

【請求項 2 6】

前記小胞子特異的プロモーターが、配列番号 3 のヌクレオチド配列またはその機能的フラグメントからのプロモーターフラグメントを含む、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載のキメラ遺伝子。

【請求項 2 7】

前記ターゲット配列内のまたはその付近の予め選ばれた部位における二本鎖切断の誘導により植物細胞のゲノム内のターゲット D N A 配列を関心のある D N A 配列と交換するための D N A ベクターであって、

a . 前記ターゲット D N A 配列をフランキングしそして前記予め選ばれた部位をフランキングしている D N A 領域に対する少なくとも 8 0 % 配列相同性を有する 2 つのフランキング D N A 領域間に位置する前記関心のある D N A 配列 ;

b . 前記フランキング D N A 領域の間に位置した選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカー遺伝子であって、同方向反復において位置した、前記フランキング D N A 領域の 1 つと前記フランキング D N A 領域の前記 1 つの一部を含む部分的フランキング D N A 領域との間に更に位置している選択可能なもしくはスクリーニング可能なマーカー遺伝子 ; および

c . 同方向反復において位置した前記フランキング D N A 領域の前記 1 つと前記部分的フランキング D N A 領域との間に位置した D S B I 酵素のための認識部位 ;

を含む D N A ベクター。