

【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7月2日(2009.7.2)

【公表番号】特表2008-543341(P2008-543341A)

【公表日】平成20年12月4日(2008.12.4)

【年通号数】公開・登録公報2008-048

【出願番号】特願2008-518379(P2008-518379)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 0 1 H 1/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/00 C

A 0 1 H 1/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成21年5月11日(2009.5.11)

【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】

雄性不稔性植物のホモ接合体劣性状態を維持する方法であって、

(a) Ms 26 遺伝子のホモ接合体劣性対立遺伝子を含み、雄性不稔性である第 1 植物を準備すること；

(b) Ms 26 遺伝子のホモ接合体劣性対立遺伝子を含む第 2 植物に、ヘミ接合性状態の構築体を導入することであって、該構築体は、

(i) 該第 1 植物において発現されると雄性稔性を回復する、Ms 26 ヌクレオチド配列を含む第 1 ヌクレオチド配列；

(ii) Ms 26 の劣性対立遺伝子を含み、かつ該構築体を含まない該第 2 植物において生存可能な雄性配偶子が生産されるように、発現されると、該第 2 植物における生存可能な雄性配偶子の機能または形成を抑制する、第 2 ヌクレオチド配列を含むことと；

(c) 該第 2 植物の雄性配偶子によって該第 1 植物を受精させ、該第 1 植物の該ホモ接合体劣性状態を維持する子孫を生産することと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記第 1 ヌクレオチド配列が、雄性植物細胞に発現を優先的に指向させる第 3 ヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 ヌクレオチド配列が、

a) 配列番号 2、4、または 18 のアミノ酸配列のいずれか一つをコードする配列；

b) 配列番号 1、3、7、または 17 のうちのいずれかの配列；

c) 該配列のいずれかに対し少なくとも 90% の同一性を有する配列；

d) 65 における 0.1 SSC、0.1% (w/v) SDS の洗浄の非常にストリンジェントな条件下で該配列のいずれかにハイブリダイズする配列；および、

e) 植物の雄性稔性にとって重要である機能的配列である、該配列のうちのいずれかの配列の断片、
から成る群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 ヌクレオチド配列が、雄性植物細胞に発現を優先的に指向させる第 3 ヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 3 ヌクレオチド配列が、誘発性の物質または状態の存在下においてのみ機能する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 3 ヌクレオチド配列が、5 1 2 6、M s 2 6、および M s 4 5 の雄性組織調節配列から成る群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 2 ヌクレオチド配列が、雄性植物細胞に発現を優先的に指向させる第 4 ヌクレオチド配列に連結される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 2 ヌクレオチド配列が、D A M メチラーゼ遺伝子、Z e a m a y s アルファアミラーゼ遺伝子、および細胞毒素コード遺伝子のヌクレオチド配列から成る群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 2 ヌクレオチド配列が、植物の雄性配偶子に発現を優先的に指向させる第 3 ヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 4 ヌクレオチド配列が、ポリガラクトツロナーゼ 4 7 遺伝子、Z m 1 3 遺伝子、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子、カルモジュリン結合タンパク質遺伝子、アクチン脱重合因子遺伝子、プロルフィリン遺伝子、および硫化ペンタペプチドフィトスルフォキン遺伝子の調節領域から成る群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記構築体を有する植物細胞の選択のために使用することが可能な産物をコードする第 5 ヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 5 ヌクレオチド配列が、赤色蛍光遺伝子、シアン蛍光タンパク質遺伝子、黄色蛍光タンパク質遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子、アントシアニン p 1 遺伝子、およびフォスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼコード遺伝子から成る群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 5 ヌクレオチド配列が、ポリガラクトツロナーゼ 4 7 遺伝子、Z m 1 3 遺伝子、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子、カルモジュリン結合タンパク質遺伝子、アクチン脱重合因子遺伝子、プロルフィリン遺伝子、および硫化ペンタペプチドフィトスルフォキン遺伝子から成る群から選択される調節領域に作動可能に連結されている、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記構築体を有する植物を特定することによって前記第 2 植物を選択することをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 3 ヌクレオチド配列が、

- (a) 配列番号 5 ;
- (b) 配列番号 6 ;
- (c) 配列番号 7 の塩基 1 から 1 0 8 8 ;
- (d) 配列番号 7 の塩基 8 3 0 から 9 6 2 ;

- (e) 配列番号 7 の塩基 8 3 0 から 9 1 4 ;
- (f) 配列番号 7 の塩基 9 1 7 から 9 6 2 ;
- (g) 配列番号 7 の塩基 8 7 5 から 9 5 4 ;
- (h) 配列番号 7 の塩基 9 3 5 から 9 5 4 ;
- (i) 配列番号 7 の塩基 8 7 5 から 9 2 4 ;
- (j) 配列番号 1 9 ;
- (k) 配列番号 2 0 ; および、

(l) 連結された配列の雄性組織発現にとって必須の機能的断片である、該配列のうちのいずれかの配列の断片、
から成る群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 2】

実施例 5

配列と発現分析

S B M u 2 0 0 - 3 . 1 ゲノムクローンおよび M s 2 6 - 8 . 1 c D N A クローを、L o f t s t r a n d L a b s L i m i t e d に配列決定してもらった。S a n g e r , F . , N i c k e n , S . , C o u l s o n A . R . (1 9 7 7) “ D N A s e q u e n c i n g w i t h c h a i n t e r m i n a t i n g i n h i b i t o r s ” P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 4 : 5 4 6 3 - 5 4 6 7 。これらの配列を図 4 と 5 に記載する。比較は図 6 に載せる。c D N A / ゲノム比較は、ゲノムクローンの中には 5 個のイントロンがあることを明らかにする。M u 8 の挿入はエキソン 1 で起こっている。各コドンの第 3 位置におけるコドンの優勢および非ランダム性について試験したところ、c D N A の主要 O R F は、予想されるタンパク質コード O R F と一致した。ゲノムクローンの位置 1 0 8 9 に M e t 開始コドン候補が存在する。ゲノムクローンに関する c D N A 相性は、ヌクレオチド 1 0 9 4 から開始する。したがって、M s 2 6 - 8 . 1 は、完全長クローンを表すものではなく、M e t 開始コドン候補までの 5 塩基を欠く。データベース探索から、酵母、植物、および哺乳類に見出される P 4 5 0 に対し有意の相性を示した。P 4 5 0 酵素は、広く研究され、三つの特徴的タンパク質ドメインが明らかにされている。M s 2 6 タンパク質は、真核細胞の P 4 5 0 に特徴的な、いくつかの構造的モチーフを含む。その中には、ヘム結合ドメイン F x x G x R x C x G (ドメイン D、配列番号 2 4)、ドメイン A A / G G X D / E T T / S (ジオキシゲン - 結合性)、ドメイン B (ステロイド - 結合性)、およびドメイン C が含まれる。M S 2 6 では、高度に保存されるヘム結合性モチーフが、C 末端から 5 1 アミノ酸離れたところに F Q A G P R I C L G (配列番号 2 5) として見つかった。ジオキシゲン結合ドメイン A G R D T T (配列番号 3 5) は、アミノ酸 3 2 0 - 3 2 5 の間に配されていた。ステロイド結合性ドメインは、L V Y L H A C V T E T L R (配列番号 2 7) アミノ酸 3 9 7 - 4 0 9 と認められた。Gene bank データベースにおいて検出されたもっとの有意性の高い相同配列は、コメから演繹されたタンパク質配列である (Gene bank アクセス番号、1 9 0 7 1 6 5 1)。2 番目に相性が高い配列は、A r a b i d o p s i s P 4 5 0 遺伝子候補 (C Y P 7 0 4 B 1) である。この機能も未知である。図 1 7 A は、C Y P 7 0 4 B 1 (配列番号 1 2) と、M s 2 6 (配列番号 1 3) との配列整列を示す。いくつかの P 4 5 0 遺伝子の系統樹分析を行ったところ、A r a b i d o p s i s t h a l i a n a および V i c i a s a t i v a に認められる、脂肪酸オメガ - ヒドロキシル化に与る P 4 5 0 にもっとも近縁であることが明らかになった。m s 2 6 ' - 0 4 0 6 欠失突然変異において誘発された翻訳フレームシフトが、ヘム結合ドメインの活性を破壊し、不稔性をもたらしたと考えられる。図 1 8 の比較を参照されたい (M s 2 6 c D N A は配

列番号 14 ; 稈性エキソン 5 領域は配列番号 15、および、不稈性エキソン 5 領域は、配列番号 16)。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0130

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0130】

実施例 8

選択可能なマーカー、雄性不稈遺伝子 Ms 45、および花粉傷害性遺伝子を含む植物形質転換ベクターの構築

図 22 に示す、PHP 18091 と表示される構築体を、下記の DNA 成分を集合することによって作製する。

1. プラスミド pSB11 バックボーン DNA (35SGUS および 35S BAR 遺伝子を担う EcoRI 断片を欠く pSB31、Ishida et al., Nature Biotechnol. (1996) 14: 745 - 750)。この DNA バックボーンは、pBR322 由来の T-DNA 境界部配列、および複製起点を含む。

2. カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター、およびターミネーター (Frank et al., 1980, Cell 21: 285 - 294 のそれぞれ、ヌクレオチド 6908 - 7432 および 7439 - 7632) の転写調節の下における、Streptomyces viridochromogenes の、酵素フォスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) (アクセス番号 A02774 のヌクレオチド 6 - 557、Strauch et al., 欧州特許出願公開第 0275957 - A) をコードする 35S: PAT 遺伝子。

3. トウモロコシ葯特異的プロモーター 5126 (ヌクレオチド 985 - 1490、アクセス番号 I75204) の調節の下における、トウモロコシ雄性稈性遺伝子のコード領域を含む 5126: Ms 45 遺伝子 (ヌクレオチド 1392 - 3343、アクセス番号 AF360356、Albertsen et al., Am. J. Bot. (1993) 80: 16)。

4. トウモロコシ花粉特異的プロモーター PG47 (ヌクレオチド 1 - 2870、アクセス番号 X66692、Allen and Lonsdale, Plant J. (1993) 3: 261 - 271) によって駆動される、E. coli DN A (アデノシン - N⁶) メチルトランスフェラーゼ (DAM) のコード領域を含む PG47: DAM (ヌクレオチド 195 - 1132、Brooksら、Nucleic Acids Res (1983) 11: 837 - 851)。この遺伝子の転写は、じゃがいもプロテイナーゼ阻害剤 II (PinII) ターミネーター (ヌクレオチド 2 - 310、An et al., Plant Cell (1989) 1: 115 - 122) によって終結される。

5. Ms 45: Ms 45 を含む、3.34 kb NcoI DNA 断片が、pUC8 において 35S: PAT の上流においてクローンされ、PHP 6641 を作製した。PHP 6641 から得られた Ms 45: Ms 45 - 35S: PAT を含む、4.7 kb HindIII / EcoRI DNA 断片を pSB11 にクローンして、PHP 10890 を作製した (Cigan et al., Sex. Plant Reprod. (2001) 14: 135 - 142)。PHP 10890 における、天然の Ms 45 プロモーターを、トウモロコシ 5126 プロモーターを含む、528 bp の HindIII / NcoI 断片と置換して、PHP 11943 を作製した。

6. PG47 プロモーターを含む 2.87 kb の HindIII / NcoI 断片を、DAM コード領域、PinII ターミネーター、および、PHP 10404 から得られた 35S エンハンサー (Unger, et al., Transgenic Res. (2001) 10: 409 - 422) を含む、0.8 kb の NcoI / HindIII 断片と

連結し、P G 4 7 : D A M 遺伝子融合 (3 5 S エンハンサーと共に) を含む、3 . 6 7 k b の H i n d I I I 断片を作製した。次に、この 3 . 6 7 k b p の H i n d I I I 断片を、P H P 1 1 9 4 3 の H i n d I I I 部位にクローンし、P H P 1 8 0 7 1 を作製した。この P H P 1 8 0 7 1 を、プラスミド p S B 1 を担う A g r o b a c t e r i u m 株 L B A 4 4 0 4 の中に、3 親交配によって導入した (I s h i d a e t a l . , N a t u r e B i o t e c h n o l . (1 9 9 6) 1 4 : 7 4 5 - 7 5 0) 。この、P H P 1 8 0 7 1 および p S B 1 の共同組み込み体を P H P 1 8 0 9 1 と名づけた。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【 0 1 4 1 】

【図 1】図 1 は、雄性稔性遺伝子 M s 2 6 の配座マップである。

【図 2】図 2 A は、M u 8 プローブとハイブリダイズする、m s 2 6 : : M u 8 ファミリーのサザンプロットであり、図 2 B は、m s 2 6 から単離した P s t I 断片とハイブリダイズする m s 2 6 - m 2 : : M u 8 ファミリーのサザンプロットである。

【図 3】図 3 は、M s 2 6 遺伝子から単離された P s t I 断片とハイブリダイズさせたノーザンプロット分析ゲルである。

【図 4】図 4 A - 4 D は、M s 2 6 の配列である (c D N A は配列番号 1、タンパク質は配列番号 2 および 3 4 である) 。

【図 5】図 5 A - 5 C は、M s 2 6 のゲノム配列である (また、配列番号 7 とも呼ばれる) 。

【図 6】図 6 A - 6 D は、M s 2 6 のゲノム配列 (配列番号 7 の残基 1 0 5 1 - 1 4 5 0、1 5 0 1 - 2 1 0 0、および 2 2 0 1 - 3 3 2 6) と、M s 2 6 の c D N A (配列番号 1) との比較である。

【図 7】図 7 A は、種々の植物組織における発現を示すノーザン分析ゲルを示し、図 7 B は、小孢子発生の発現段階を示すゲルである。

【図 8】図 8 は、M s 2 6 のプロモーター全長である (配列番号 5) 。

【図 9】図 9 は、M s 2 6 プロモーターの選ばれた領域の欠失の後に見られるルシフェラーゼ活性を示す棒グラフである。

【図 1 0】図 1 0 は、M s 2 6 プロモーターの必須領域 (配列番号 6) を示す。

【図 1 1】図 1 1 は、M s 2 6 の必須プロモーター断片の選ばれた小 (9 - 1 0 b p) 領域において、制限酵素リンカー走査による置換後に見られる、ルシフェラーゼ活性を示す棒グラフである。

【図 1 2 A】図 1 2 A および 1 2 B は、ソルガム円錐花序の M s 2 6 オーソログのヌクレオチド配列 (配列番号 3) と、トウモロコシ M s 2 6 c D N A (配列番号 1 の残基 2 0 1 - 7 5 0) との比較、および、ソルガムタンパク質配列 (配列番号 4) と、トウモロコシ M s 2 6 タンパク質 (配列番号 2 の残基 8 7 - 2 4 4) との比較である。

【図 1 2 B】図 1 2 A および 1 2 B は、ソルガム円錐花序の M s 2 6 オーソログのヌクレオチド配列 (配列番号 3) と、トウモロコシ M s 2 6 c D N A (配列番号 1 の残基 2 0 1 - 7 5 0) との比較、および、ソルガムタンパク質配列 (配列番号 4) と、トウモロコシ M s 2 6 タンパク質 (配列番号 2 の残基 8 7 - 2 4 4) との比較である。

【図 1 3】図 1 3 は、雄性不稔性遺伝子 m s 2 6 のマッピングを表す。

【図 1 4】図 1 4 は、m s 2 6 - r e f (配列番号 8) の欠損領域と、野生型 M s 2 6 (配列番号 9) との配列比較を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、m s - r e f 内部のトランスポゾン配列を示す (配列番号 1 0) 。

【図 1 6】図 1 6 は、m s 2 6 - r e f の全体配列 (配列番号 1 1) を示す。

【図 17】図 17 A は、CYP704B1、P450 遺伝子（配列番号 12）の領域と、Ms26（配列番号 13）の領域の間の、翻訳タンパク質配列の整列を示す。図 17 B は、選ばれた P450 遺伝子の系統樹分析を示す。

【図 18】図 18 は、ヘム結合ドメインのフレームシフトを示す。ここには、Ms26 cDNA の領域（配列番号 14、および 28 - 29）、稈性植物（配列番号 15、および 30 - 31）および不稈性植物（配列番号 16、および 32 - 33）のエキソン 5 のゲノム領域の、翻訳配列の整列が示される。

【図 19】図 19 は、コメの Ms26 cDNA（配列番号 17）およびタンパク質（配列番号 18）を示す。

【図 20】図 20 は、トウモロコシ（配列番号 5 の残基 650 - 1091）、ソルガム（配列番号 19）、およびコメ（配列番号 20）の整列を示す。

【図 21】図 21 は、トウモロコシ Ms26 タンパク質（配列番号 21）、コメ Ms26 タンパク質（配列番号 18）、ソルガム Ms26 タンパク質（配列番号 22）の整列を、共通配列と共に示す。

【図 22】図 22 は、花粉プロモーター、細胞傷害性遺伝子、および選択可能マーカーと共に Ms45 稈性遺伝子を含む PHP18091 のプラスミドマップである。

【図 23】図 23 は、花粉プロモーターを有する Ms26 稈性遺伝子、細胞傷害性遺伝子、および選択可能マーカーを含む PHP24101 のプラスミドマップである。

【図 24】図 24 は、Zea mays の - アミラーゼ 1 コード領域の配列（配列番号 26（DNA）および 36（タンパク質））を示す。