

【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 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

A 01 H 1/00 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 N 5/00 C

A 01 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 2 6 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 2 6 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 2 6 ヌクレオチド配列を含む第1ヌクレオチド配列；

(ii) Ms 2 6 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；

(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、

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0.1SSC、0.1%(w/v) SDSの洗浄の非常にストリンド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、シアノ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 830 から 914 ;
- (f) 配列番号 7 の塩基 917 から 962 ;
- (g) 配列番号 7 の塩基 875 から 954 ;
- (h) 配列番号 7 の塩基 935 から 954 ;
- (i) 配列番号 7 の塩基 875 から 924 ;
- (j) 配列番号 19 ;
- (k) 配列番号 20 ; 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】0112

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0112】

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Ms 26 - 8 . 1 cDNA 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。cDNA / 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。Mu 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、cDNA の主要 ORF は、予想されるタンパク質コード ORF と一致した。ゲノムクローンの位置 1089 に Met 開始コドン候補が存在する。ゲノムクローンに関する cDNA 相同性は、ヌクレオチド 1094 から開始する。したがって、Ms 26 - 8 . 1 は、完全長クローンを表すものではなく、Met 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 450 に対し有意の相同性を示した。P 450 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。Ms 26 タンパク質は、真核細胞の P 450 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 24) 、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。Ms 26 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 51 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 25) として見つかった。ジオキシゲン結合ドメイン AG R D T T (配列番号 35) は、アミノ酸 320 - 325 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 27) アミノ酸 397 - 409 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、19071651) 。2 番目に相同性が高い配列は、Arabidopsis thaliana および Vicia sativa に認められる、脂肪酸オメガ - ヒドロキシル化による P 450 にもっとも近縁であることが明らかになった。Ms 26 ' - 0406 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、不稳定性をもたらしたと考えられる。図 18 の比較を参照されたい (Ms 26 cDNA は配

列番号 14 ; 稳性エキソン 5 領域は配列番号 15 、および、不稳性エキソン 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

選択可能なマークー、雄性不稳遺伝子 Ms45 、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、 PHP18091 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 35SBAR 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ィルス (CaMV) 35S プロモーター、およびターミネーター (Frank et al. 1980 , Cel121 : 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 . トウモロコシ特異的プロモーター 5126 (ヌクレオチド 985 - 1490 、アクセス番号 I_75204) の調節の下における、トウモロコシ雄性稳性遺伝子のコード領域を含む 5126 : Ms45 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、じゃがいもブロティナー阻害剤 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 . Ms45 : Ms45 を含む、 3.34kb NcoI DNA 断片が、 pUC8 において 35S : PAT の上流においてクローニングされ、 PHP6641 を作製した。 PHP6641 から得られた Ms45 : Ms45 - 35S : PAT を含む、 4.7kb HindIII / EcoRI DNA 断片を pSB11 にクローニングして、 PHP10890 を作製した (Cigan et al. Sex. Plant Reprod. (2001) 14 : 135 - 142) 。 PHP10890 における、天然の Ms45 プロモーターを、トウモロコシ 5126 プロモーターを含む、 528bp の HindIII / NcoI 断片と置換して、 PHP11943 を作製した。

6 . PG47 プロモーターを含む 2.87kb の HindIII / NcoI 断片を、 DAM コード領域、 PinII ターミネーター、および、 PHP10404 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、 0.8kb の NcoI / HindIII 断片と

連結し、PG47:DAM遺伝子融合(35Sエンハンサーと共に)を含む、3.67kbのHindIII断片を作製した。次に、この3.67kbのHindIII断片を、PHP11943のHindIII部位にクローンし、PHP18071を作製した。このPHP18071を、プラスミドpSB1を担うAgrobacterium株LB4404の中に、3親交配によって導入した(Ishida et al., Nature Biotechnol. (1996) 14: 745-750)。この、PHP18071およびpSB1の共同組み込み体をPHP18091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】

【0141】

【図1】図1は、雄性稔性遺伝子Ms26の配座マップである。

【図2】図2Aは、Mu8プローブとハイブリダイズする、ms26::Mu8ファミリーのサザーンプロットであり、図2Bは、ms26から単離したPstI断片とハイブリダイズするms26-m2::Mu8ファミリーのサザーンプロットである。

【図3】図3は、Ms26遺伝子から単離されたPstI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4A-4Dは、Ms26の配列である(cDNAは配列番号1、タンパク質は配列番号2および34である)。

【図5】図5A-5Cは、Ms26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6A-6Dは、Ms26のゲノム配列(配列番号7の残基1051-1450、1501-2100、および2201-3326)と、Ms26のcDNA(配列番号1)との比較である。

【図7】図7A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7Bは、小胞子発生の発現段階を示すゲルである。

【図8】図8は、Ms26のプロモーター全長である(配列番号5)。

【図9】図9は、Ms26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10】図10は、Ms26プロモーターの必須領域(配列番号6)を示す。

【図11】図11は、Ms26の必須プロモーター断片の選ばれた小(9-10bp)領域において、制限酵素リンクアセチル化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12A】図12Aおよび12Bは、ソルガム円錐花序のMs26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Ms26 cDNA(配列番号1の残基201-750)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Ms26タンパク質(配列番号2の残基87-244)との比較である。

【図12B】図12Aおよび12Bは、ソルガム円錐花序のMs26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Ms26 cDNA(配列番号1の残基201-750)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Ms26タンパク質(配列番号2の残基87-244)との比較である。

【図13】図13は、雄性不稔性遺伝子ms26のマッピングを表す。

【図14】図14は、ms26-ref(配列番号8)の欠損領域と、野生型Ms26(配列番号9)との配列比較を示す。

【図15】図15は、ms26-ref内部のトランスポゾン配列を示す(配列番号10)。

【図16】図16は、ms26-refの全体配列(配列番号11)を示す。

【図17】図17A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17B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、Ms26cDNAの領域（配列番号14、および28-29）、稔性植物（配列番号15、および30-31）および不稔性植物（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Ms26cDNA（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稔性遺伝子を含む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稔性遺伝子、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。