

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-518061
(P2017-518061A)

(43) 公表日 平成29年7月6日(2017.7.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1H 5/00 (2006.01)	AO1H 5/00 Z N A A	2 B O 3 O
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4 B O 1 6
AO1H 1/02 (2006.01)	AO1H 1/02 A	4 B O 6 5
AO1H 5/10 (2006.01)	AO1H 5/10	
A23L 19/12 (2016.01)	A23L 19/12 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-573591 (P2016-573591)
 (86) (22) 出願日 平成26年6月17日 (2014.6.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月13日 (2017.2.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/042631
 (87) 国際公開番号 WO2015/195090
 (87) 国際公開日 平成27年12月23日 (2015.12.23)

(71) 出願人 501060862
 ジェイ. アール. シンプロット カンパニ
 ー
 アメリカ合衆国, アイダホ州 83702
 , ボイジー, W. フロント ストリート
 1099
 1099 W. Front Street
 , Boise, Idaho 83702,
 U. S. A.

(74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バレイシヨ栽培品種W8

(57) 【要約】

W8と名付けられたバレイシヨ栽培品種が開示される。本発明は、バレイシヨ栽培品種W8の塊茎、バレイシヨ栽培品種W8の種子、バレイシヨ栽培品種W8の植物および植物部分、バレイシヨ栽培品種W8から産出される食品製品、ならびにバレイシヨ栽培品種W8とそれ自体とを、もしくは別のバレイシヨ変種とを交配することによって、バレイシヨ植物を産生するための方法に関する。本発明はまた、トランスジェニックバレイシヨ植物を産生するための方法、ならびにそれら方法によって産生されるトランスジェニックバレイシヨ植物および部分に関する。本発明はまた、バレイシヨ栽培品種W8に由来するバレイシヨ植物および植物部分、バレイシヨ栽培品種W8に由来する他のバレイシヨ植物もしくは植物部分を産生するための方法、ならびにそれら方法の使用に由来するバレイシヨ植物およびそれらの部分に関する。

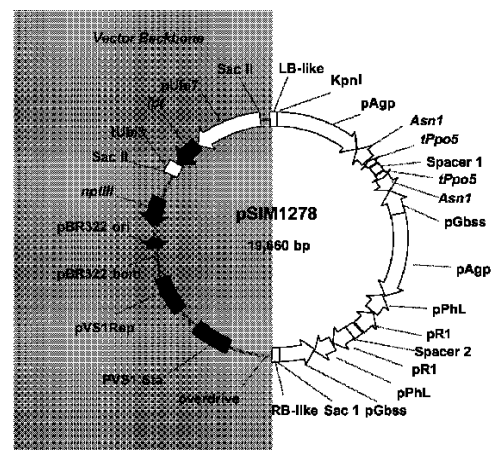


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

パレイショ栽培品種 W 8 のパレイショ塊茎、もしくは塊茎の一部であって、ここで該塊茎の代表的サンプルは、ATCC 受託番号 P T A - 1 2 1 0 7 9 の下で寄託された、パレイショ塊茎、もしくは塊茎の一部。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の塊茎もしくは塊茎の一部を生育させることによって産生される、パレイショ植物、もしくはその一部。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の植物の生理学的小および形態学的特徴の全てを有し、内因性アスパラギンシンセターゼ - 1 遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ - 5 遺伝子の発現の阻害に有効なパレイショ DNA の逆方向反復を、ホスホリラーゼ - L 遺伝子およびジキナーゼ R 1 遺伝子のための内因性パレイショプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種 W 8 に存在する p S I M 1 2 7 8 の挿入領域を含み、パレイショ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 R p i - v n t 1 および内因性液胞インベルターゼ遺伝子 V I n v の発現の阻害に有効なパレイショ DNA の逆方向反復を含む W 8 に存在する p S I M 1 6 7 8 の挿入領域をさらに含む、パレイショ植物。

10

【請求項 4】

請求項 2 に記載の植物から産生される細胞の組織培養物であって、ここで該組織培養物の該細胞は、葉、花粉、胚芽、子葉、胚軸、分裂組織細胞、根、根端、雌蕊、葯、花、幹および塊茎から成る群より選択される植物部分から産生され、該組織培養される細胞は、内因性アスパラギンシンセターゼ - 1 遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ - 5 遺伝子の発現の阻害に有効なパレイショ DNA の逆方向反復を、ホスホリラーゼ - L 遺伝子およびジキナーゼ R 1 遺伝子のための内因性パレイショプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種 W 8 に存在する p S I M 1 2 7 8 の挿入領域を含み、パレイショ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 R p i - v n t 1 および内因性液胞インベルターゼ遺伝子 V I n v の発現の阻害に有効なパレイショ DNA の逆方向反復を含む W 8 に存在する p S I M 1 6 7 8 の挿入領域をさらに含む、組織培養物。

20

【請求項 5】

前記植物は、パレイショ栽培品種 W 8 の生理学的小および形態学的特徴のうちの全てを有する、請求項 4 に記載の組織培養物から再生されるパレイショ植物。

30

【請求項 6】

請求項 1 に記載のパレイショ塊茎、もしくは該塊茎の一部を生育させることによって産生されるパレイショ種子であって、ここで該種子は、内因性アスパラギンシンセターゼ - 1 遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ - 5 遺伝子の発現の阻害に有効なパレイショ DNA の逆方向反復を、ホスホリラーゼ - L 遺伝子およびジキナーゼ R 1 遺伝子のための内因性パレイショプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種 W 8 に存在する p S I M 1 2 7 8 の挿入領域を含み、パレイショ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 R p i - v n t 1 および内因性液胞インベルターゼ遺伝子 V I n v の発現の阻害に有効なパレイショ DNA の逆方向反復を含む W 8 に存在する p S I M 1 6 7 8 の挿入領域をさらに含む、パレイショ種子。

40

【請求項 7】

請求項 6 に記載の種子を生育させることによって産生される、パレイショ植物、もしくはその一部。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のパレイショ植物の組織培養物から再生されるパレイショ植物であって、ここで該再生された植物は、内因性アスパラギンシンセターゼ - 1 遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ - 5 遺伝子の発現の阻害に有効なパレイショ DNA の逆方向反復を、ホスホリラーゼ - L 遺伝子およびジキナーゼ R 1 遺伝子のための内因性パレイショプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種 W 8 に存在する p S I M 1 2 7 8 の挿入

50

領域を含み、バレイシヨ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 R p i - v n t 1 および内因性液胞インペルターゼ遺伝子 V I n v の発現の阻害に有効なバレイシヨ D N A の逆方向反復を含む W 8 に存在する p S I M 1 6 7 8 の挿入領域をさらに含む、バレイシヨ植物。

【請求項 9】

バレイシヨ種子を産生するための方法であって、該方法は、2つのバレイシヨ植物を交配する工程、および結果として得られるバレイシヨ種子を採取する工程を包含し、ここで少なくとも一方のバレイシヨ植物は、請求項 2 に記載のバレイシヨ植物である、方法。

【請求項 10】

バレイシヨ種子を産生するための方法であって、該方法は、2つのバレイシヨ植物を交配する工程、および結果として得られるバレイシヨ種子を採取する工程を包含し、ここで少なくとも一方のバレイシヨ植物は、請求項 7 に記載のバレイシヨ植物である、方法。

10

【請求項 11】

前記種子は、内因性アスパラギンシンセターゼ - 1 遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ - 5 遺伝子の発現の阻害に有効なバレイシヨ D N A の逆方向反復を、ホスホリラーゼ - L 遺伝子およびジキナーゼ R 1 遺伝子のための内因性バレイシヨプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種 W 8 に存在する p S I M 1 2 7 8 の挿入領域を含み、バレイシヨ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 R p i - v n t 1 および内因性液胞インペルターゼ遺伝子 V I n v の発現の阻害に有効なバレイシヨ D N A の逆方向反復を含む W 8 に存在する p S I M 1 6 7 8 の挿入領域をさらに含む、請求項 10 に記載の方法によって産生されるバレイシヨ種子。

20

【請求項 12】

請求項 11 に記載のバレイシヨ種子を生育させることによって産生される、バレイシヨ植物、もしくはその部分。

【請求項 13】

前記種子は、内因性アスパラギンシンセターゼ - 1 遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ - 5 遺伝子の発現の阻害に有効なバレイシヨ D N A の逆方向反復を、ホスホリラーゼ - L 遺伝子およびジキナーゼ R 1 遺伝子のための内因性バレイシヨプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種 W 8 に存在する p S I M 1 2 7 8 の挿入領域を含み、バレイシヨ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 R p i - v n t 1 および内因性液胞インペルターゼ遺伝子 V I n v の発現の阻害に有効なバレイシヨ D N A の逆方向反復を含む W 8 に存在する p S I M 1 6 7 8 の挿入領域をさらに含む、請求項 12 に記載の植物から産生されるバレイシヨ種子。

30

【請求項 14】

前記バレイシヨ植物のうち的一方は、バレイシヨ栽培品種 W 8 であり、第 2 のバレイシヨ植物は、トランスジェニックである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

バレイシヨ種子を産生するための方法であって、該方法は、2つのバレイシヨ植物を交配する工程および結果として得られるバレイシヨ種子を採取する工程を包含し、ここで該バレイシヨ植物のうち的一方は、請求項 7 に記載のバレイシヨ植物であり、第 2 のバレイシヨ植物は、トランスジェニックである、方法。

40

【請求項 16】

前記植物は、内因性アスパラギンシンセターゼ - 1 遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ - 5 遺伝子の発現の阻害に有効なバレイシヨ D N A の逆方向反復を、ホスホリラーゼ - L 遺伝子およびジキナーゼ R 1 遺伝子のための内因性バレイシヨプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種 W 8 に存在する p S I M 1 2 7 8 の挿入領域を含み、バレイシヨ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 R p i - v n t 1 および内因性液胞インペルターゼ遺伝子 V I n v の発現の阻害に有効なバレイシヨ D N A の逆方向反復を含む W 8 に存在する p S I M 1 6 7 8 の挿入領域をさらに含む、請求項 14 に記載の方法によって産生される種子を生育させることによって産生される、バレイシヨ植物、もしくはその一部。

【請求項 17】

50

所望の形質をバレイショ栽培品種W8に導入するための方法であって、ここで該方法は、

(a) W8植物であって、ここで塊茎の代表的サンプルは、ATCC受託番号PTA-121079の下で寄託されたW8植物と、子孫植物を産生するために所望の形質を含む別のバレイショ栽培品種の植物であって、ここで該所望の形質は、雄性不稔性、除草剤抵抗性、昆虫抵抗性、改変された脂肪酸代謝、改変された炭水化物代謝および細菌性の病気、真菌の病気もしくはウイルス性の病気に対する抵抗性から成る群より選択される別のバレイショ栽培品種の植物とを交配する工程；

(b) 該所望の形質を有する1もしくはこれより多くの子孫植物を選択する工程；

(c) 該選択された子孫植物とW8植物とを戻し交配して、戻し交配子孫植物を産生する工程；

(d) 該所望の形質を有する戻し交配子孫植物を選択する工程；ならびに

(e) 工程(c)および工程(d)を2回もしくはこれより多く連続して反復して、該所望の形質を含む選択された第3もしくはより高次の戻し交配子孫植物を産生する工程、を包含する、方法。

【請求項18】

前記植物は、前記所望の形質を有し、内因性アスパラギンシンターゼ-1遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ-5遺伝子の発現の阻害に有効なバレイショDNAの逆方向反復を、ホスホリラーゼ-L遺伝子およびジキナーゼR1遺伝子のための内因性バレイショプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種W8に存在するpSIM1278の挿入領域を含み、バレイショ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子Rpi-vnt1および内因性液胞インベルターゼ遺伝子VInvの発現の阻害に有効なバレイショDNAの逆方向反復を含むW8に存在するpSIM1678の挿入領域をさらに含む、請求項17に記載の方法によって産生されるバレイショ植物。

【請求項19】

前記所望の形質は、除草剤抵抗性であり、該抵抗性は、イミダゾリノン、スルホニルウレア、グリホセート、グルホシネート、L-ホスフィントリシン、トリアジンおよびベンゾニトリルから成る群より選択される除草剤に付与される、請求項18に記載のバレイショ植物。

【請求項20】

前記所望の形質は、昆虫抵抗性であり、該昆虫抵抗性は、Bacillus thuringiensis内毒素をコードするトランスジーンによって付与される、請求項18に記載のバレイショ植物。

【請求項21】

前記所望の形質は、改変された脂肪酸代謝もしくは改変された炭水化物代謝であり、該所望の形質は、フルクトシルトランスフェラーゼ、レバンスクララーゼ、-アミラーゼ、インベルターゼおよびデンプン分枝酵素から成る群より選択されるタンパク質をコードする核酸、またはステアシル-ACPデサチュラーゼのアンチセンスをコードするDNAによって付与される、請求項18に記載のバレイショ植物。

【請求項22】

商用植物製品を産出するための方法であって、該方法は、請求項2に記載の植物もしくはその一部を得る工程、および該商用植物製品を、該植物もしくはその植物部分から産出する工程を包含し、ここで該商用植物製品は、フレンチフライ、ポテトチップス、脱水バレイショ材料、ポテトフレークおよびポテト顆粒から成る群より選択される、方法。

【請求項23】

前記製品は、内因性アスパラギンシンターゼ-1遺伝子および内因性ポリフェノールオキシダーゼ-5遺伝子の発現の阻害に有効なバレイショDNAの逆方向反復を、ホスホリラーゼ-L遺伝子およびジキナーゼR1遺伝子のための内因性バレイショプロモーターの逆方向反復に加えて含む栽培品種W8に存在するpSIM1278の挿入領域を含み、バレイショ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子Rpi-vnt1および内因性液胞インベルターゼ遺伝子VInvの発現の阻害に有効なバレイショDNAの逆方向反復を含むW8に存在する

10

20

30

40

50

p S I M 1 6 7 8 の挿入領域をさらに含む、請求項 2 2 に記載の方法によって產生される商用植物製品。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

本発明は、W 8 と名付けられた新規なパレイショ (potato) 栽培品種、並びに、そのパレイショ変種によって產生された塊茎、植物、植物部分、培養組織物及び種子に関する。本発明は、さらに、パレイショ栽培品種 W 8 から作製された食物製品、例えば、フレンチフライ、ポテトチップス、脱水ポテト材料 (dehydrated potato material) 、ポテトフレーク及びポテト顆粒に関する。本出願において挙げられる全ての刊行物は、本明細書中で、参考によって組み込まれる。

10

【0002】

パレイショは、世界で四番目に重要な食物収穫物であり、断然最も重要な野菜である。パレイショは、現在、米国のほぼ全ての州で、市販用に育てられている。年間のパレイショ生産量は、米国内で 1 8 0 0 万トンを超え、世界中で 3 億トンを超える。パレイショの人気は、主に、その汎用性及び栄養的な価値に起因する。パレイショは、新鮮なまま、冷凍して又は乾燥させて使用されてもよく、又は、粉末、デンプン又はアルコールに加工されてもよい。これらは、炭水化物の複合体を含み、カルシウム、ナイアシン及びビタミン C が豊富である。

20

【0003】

食品産業においてパレイショの品質は、2つの重大な要因により、有害に作用する：(1) パレイショは、揚げる際又は焼く際に迅速に酸化されて発癌物質であるアクリルアミドを形成する非必須アミノ酸であるアスパラギンを大量に含む；及び(2) パレイショは、傷ついたパレイショの損傷プラスチックからポリフェノールオキシダーゼが漏れ出した際に起こる望まざる事象である酵素的褐色化及び変色を、非常に受け易い。細胞質において、酵素は、フェノールを酸化し、これは、迅速に重合体化して、暗色の色素を生成する。塊茎は、大量のリン酸化デンプンを含み、これらの幾らかは、保存の間に分解されて、グルコース及びフルクトースを生成する。これらの還元糖は、1 2 0 を超える温度で加熱された場合に、アミノ酸と反応してアクリルアミドを含むメイラード産物を形成する。デンプンリン酸化に関与する2つの酵素は、水ジキナーゼ R 1 及びホスホリラーゼ - L (R 1 及び P h L) である。褐色化はまた、デンプンのグルコース及びフルクトースへの部分的分解の結果として、非酵素的にも起こる。

30

【0004】

多くのパレイショ栽培品種は、後期胴枯れ病 (late blight) (真菌様卵菌病原体 P h y t o p h t h o r a i n f e s t a n s によって引き起こされる壊滅的な病気) に罹りやすい。パレイショの後期胴枯れ病は、急速に拡大し得かつ壊死し得る葉および幹上の黒色 / 褐色病変によって同定される。ひどい後期胴枯れ病の流行は、P . i n f e s t a n s が増殖し、宿主作物で急速に再生する場合に起こる。

【0005】

今日まで、低アクリルアミド含有量、増大した黒色斑傷耐性、低下した還元糖、および後期胴枯れ病への増大した抵抗性を有する塊茎を產生するパレイショ植物変種は存在しない。従って、毒性化合物の低下したレベルおよび病気への増大した抵抗性を有するが、未知もしくは外来核酸の使用がないパレイショ変種を開発することが必要である。本発明は、この必要性を満たす。

40

【0006】

関連技術及びそれに関連する制限の上記の例は、例示を意図し、排除を意図しない。関連技術の他の限定は、本明細書を読んだ際に、当業者に明らかになる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

50

【0007】

以下の実施形態及びその局面は、システム、ツール及び方法と組み合わせて記載され、これらは、例示を意味し、範囲の限定を意味しない。種々の実施形態において、上記の問題の1つもしくはそれより多くは、軽減されているか又は排除されており、他方で、他の実施形態は、他の改善を指向する。

【0008】

この目的のために、本発明は、パレイショ植物ゲノムに対してネイティブであり、外来性DNA、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) DNA、ウイルスマーカ―又はベクター骨格配列を含まない核酸配列によって、形質転換された新規なパレイショ変種W8を提供する。むしろ、パレイショ変種W8のゲノム内に挿入されたDNAは、パレイショに対してネイティブであるか、又はパレイショに性的に適合する植物であるワイルドポテト (*wild potato*) に対してネイティブである非コードポリヌクレオチドであり、黒色斑傷の発現、アスパラギン蓄積及び老化甘味 (*senescence sweetening*) に関する遺伝子をサイレンシングする。

10

【0009】

従って、1つの実施形態において、本発明は、第1サイレンシングカセット及び第2サイレンシングカセットを含むpSIM1278と呼ばれる植物ベクターを提供し、第1サイレンシングカセットは、アンチセンス方向で、アスパラギンシンターゼ-1遺伝子 (*fAsn1*) の断片とポリフェノールオキシダーゼ-5遺伝子の3'-非翻訳配列とを含む2コピーのDNAセグメントを有し、第2サイレンシングカセットは、アンチセンス方向で、パレイショホスホリラーゼ-L (*pPhL*) 遺伝子の断片とパレイショR1遺伝子の断片とを含む2コピーのDNAセグメントを含む。pSIM1278ベクターは、植物形質転換の前の植物DNAの維持を支持し且つ植物細胞の形質転換の際には植物細胞内に移動しない9,512bpの骨格領域、及び形質転換の際に植物細胞のゲノム内に安定的に組み込まれるネイティブなDNAを含む10,148bpのDNA挿入領域を含む。

20

【0010】

別の実施形態において、本発明は、Rpi-vnt1発現カセット、および植物液胞インベルターゼ遺伝子VInvに関するサイレンシングカセットを含む第2の植物ベクター (*pSIM1678*といわれる) を提供する。Rpi-vnt1遺伝子カセットは、後期胴枯れ病への広い抵抗性を付与するそのネイティブプロモーターおよびターミネーター配列によって調節されるVNT1タンパク質コード領域から成るのに対して、サイレンシングカセットは、植物プロモーターであるpGbsおよびpAgpを対向させることによって隣接されるパレイショVInv遺伝子に由来する配列の逆方向反復から成る。pSIM1678ベクターは、植物形質転換の前に植物DNAの維持を支持し、植物細胞の形質転換の際に植物細胞へと移入されない9,512bp骨格領域、および形質転換の際に植物細胞のゲノムへと安定的に組み込まれるネイティブDNAを含む9,090bp DNA挿入領域を含む。

30

【0011】

異なる実施形態において、本発明は、本発明の一方または両方の植物ベクターによって形質転換した植物細胞を提供する。さらなる実施形態において、本発明は、本発明の植物ベクターによって形質転換した1つもしくはそれより多くの細胞を含むパレイショ植物変種を提供する。本発明の1つの局面において、パレイショ植物変種は、ベクターpSIM1278の2つのサイレンシングカセットのうち少なくとも1つを発現し、ベクターpSIM1678のサイレンシングカセットを発現し、そしてサイレンシングカセットの発現は、植物の塊茎においてアスパラギンシンターゼ-1遺伝子、ポリフェノールオキシダーゼ-5遺伝子及び液胞インベルターゼ遺伝子の下方制御をもたらす。本発明の好ましい局面において、少なくとも1つのサイレンシングカセットを発現するパレイショ植物変種の塊茎は、同じ変種の非形質転換植物の塊茎に存在しない2つもしくはそれより多くの所望の形質を提示する。本発明の最も好ましい局面では、2つもしくはそれより多くの所望の形質が、低アスパラギン蓄積、黒斑傷の低下、熱誘導性アクリルアミド形成の低下、及

40

50

び貯蔵中の還元糖の蓄積低下から成る群より選択される。

【0012】

本発明の異なる局面において、パレイシヨ植物変種は、植物DNAベクターpSIM1278のサイレンシングカセットの両方を発現し、ベクターpSIM1678のサイレンシングカセットを発現し、そしてサイレンシングカセットの発現は、パレイシヨ植物変種の塊茎において、アスパラギンシンターゼ-1遺伝子、ポリフェノールオキシダーゼ-5遺伝子、ホスホリラーゼ-L遺伝子、ジキナーゼR1遺伝子および液胞インペルターゼ遺伝子の下方制御をもたらす。本発明の好ましい局面において、植物DNAベクターpSIM1278の2つのサイレンシングカセットを発現しかつベクターpSIM1678のサイレンシングカセットを発現するパレイシヨ植物変種の塊茎は、同じ変種の非形質転換植物の塊茎に存在しない2つもしくはそれより多くの所望の形質を提示する。好ましい実施形態において、2つもしくはそれより多くの所望の形質が、低アスパラギン蓄積、黒斑傷の減少、保存の間の還元糖の蓄積の低下、及び熱誘導性アクリルアミド形成の低下から成る群より選択される。本発明の1つの局面において、植物DNAベクターpSIM1278の2つのサイレンシングカセットおよび植物DNAベクターpSIM1678のサイレンシングカセットを発現するパレイシヨ植物変種は、Russell Burbank W8変種である。

10

【0013】

本発明の別の局面において、本発明のパレイシヨ植物変種W8は、植物DNAベクターpSIM1678の後期胴枯れ病抵抗性遺伝子(Rpi-vnt1)を発現する。本発明のさらなる局面において、本発明のパレイシヨ植物変種W8は、後期胴枯れ病感染への増大した抵抗性を有する。

20

【0014】

従って、本発明に従い、W8と名付けられたソラナム・ツペロサムL.(Solanum tuberosum L.)の属及び種の新規なパレイシヨ栽培品種が、提供される。従って、本発明は、パレイシヨ栽培品種W8、パレイシヨ栽培品種W8の塊茎、パレイシヨ栽培品種W8の植物、パレイシヨ栽培品種W8の種子、パレイシヨ栽培品種W8から作製された食物製品、並びに、パレイシヨ栽培品種W8を自家受粉することによるか、又はパレイシヨ栽培品種W8を別のパレイシヨ栽培品種と交配することによって産生されるパレイシヨ植物を作製するための、及びパレイシヨ栽培品種W8の変異誘発若しくは形質転換によるバリエーションの作製のための方法に関する。

30

【0015】

従って、栽培品種W8を用いるこのような任意の方法が、本発明の実施形態である：自家受粉、戻し交配、ハイブリッド産生、集団に対する交配など。少なくとも親の一方としてパレイシヨ栽培品種W8を用いて産生される全ての植物が、本発明の範囲内である。好都合にも、このパレイシヨ栽培品種は、他の異なるパレイシヨ植物との交配において使用されて、優れた特徴を有する第1世代(F₁)パレイシヨハイブリッド塊茎、種子及び植物を産生してもよい。

【0016】

別の実施形態において、本発明は、パレイシヨ栽培品種W8の単一若しくは複数遺伝子変換植物を提供する。1つの実施形態において、移入された遺伝子(複数可)は、優性対立遺伝子(複数可)であっても、又は劣性対立遺伝子(複数可)であってもよい。幾つかの実施形態において、移入された遺伝子(複数可)は、除草剤抵抗性、昆虫抵抗性、細菌性、真菌性又はウイルス性の病気に対する抵抗性、雄性稔性、雄性不稔、栄養品質の増大、均一性、並びにデンプン及び他の炭水化物の濃度の増大、傷のつき易さの低下及びデンプンから糖への変換率の低下などの形質を付与する。この遺伝子(複数可)は、天然に存在するパレイシヨ遺伝子であっても、遺伝子操作技術、戻し交配又は変異を通して導入された導入遺伝子であってもよい。

40

【0017】

別の実施形態において、本発明は、パレイシヨ栽培品種W8の組織培養物における使用

50

のための、再生可能な細胞を提供する。1つの実施形態において、組織培養物は、上記のパレイショ植物の生理学的及び形態学的特徴の全てを有する植物を再生すること、並びに、上記のパレイショ植物と実質的に同じ遺伝子型を有する植物を再生することが、可能である。幾つかの実施形態において、このような組織培養物における再生可能細胞は、胚芽、プロトプラスト、分裂組織細胞、カルス、花粉、葉、葯、雌蕊、子葉、胚軸、根、根端 (root tip)、花、種子、葉柄、塊茎、芽又は幹である。なおさらに、本発明は、本発明の組織培養物から再生されたパレイショ植物を提供する。

【0018】

さらなる実施形態において、本発明は、パレイショ植物変種 Russet Burbank W8の塊茎から作製される食物製品を提供する。好ましくは、食物製品は、熱処理製品である。なおより好ましくは、食物製品は、フレンチフライ、ポテトチップス、脱水パレイショ材料、ポテトフレーク又はポテト顆粒である。

10

【0019】

上記の例示的局面及び実施形態に加え、さらなる局面及び実施形態が、以下の記載の研究によって、明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、pSIM1278形質転換ベクターを図示する。左側のベクター骨格領域は、9,512bp長であり、10,149bpの位置にて開始し、19,660bpの位置にて終わる。骨格DNAは、主に、植物形質転換前のDNA挿入物の維持の支持を提供する細菌DNAから成る。隣接する境界配列を含め、DNA挿入領域(右側)は、10,148bp長(1bp~10,148bp)である。DNA挿入物は、ネイティブのDNAのみから成り、形質転換の際にパレイショ遺伝子内に安定的に組み込まれた。

20

【0021】

【図2】図2は、pSIM1278形質転換ベクター内に挿入されたDNA挿入物内のサイレンシングカセットの概略図を提供する。各サイレンシングカセットは、スパーサーによって隔てられた2つの遺伝子断片の2コピーを含む。4つの標的遺伝子、すなわちAsn-1、Ppo-5、Ph1及びR1の断片を含む2コピーのDNAセグメントは、Proとして示される2つの収束プロモーター(convergent promoter)の間に逆方向反復として挿入され、これは、塊茎内で優性に活性である。結果として生じたサイレンシングカセットを含む植物は、塊茎において多様でありポリアデニル化されていない一連のRNA分子を産生し、これらは、企図する標的遺伝子を動的かつ激しくサイレンシングする。RNA分子のサイズは、一般に、使用した2つのプロモーター間の距離よりも短い。何故なら、収束転写は、衝突転写(collisional transcription)をもたらすからである。

30

【0022】

【図3】図3は、本発明のpSIM1678形質転換ベクターを示す。ベクター骨格領域(左側)は、9,091bpの位置にて始まり、18,602bpの位置にて終わるので、9,512bpの長さである。骨格DNAは、植物形質転換前にDNA挿入物の維持の支持を提供する細菌DNAから主に成る。隣接する境界配列を含め、DNA挿入領域(右側)は、9,090bpの長さ(1bpから9,090bpまで)である。DNA挿入物は、ネイティブDNAのみから成る。これは、形質転換の際にパレイショゲノムへと安定的に組み込まれた。

40

【0023】

【図4】図4は、pSIM1278形質転換ベクターに挿入されるDNA挿入物中のサイレンシングカセット(上側の構築物)およびpSIM1678形質転換ベクターに挿入されるDNA挿入物中のサイレンシングカセット(下側の構築物)の概略図を提供する

【0024】

【図5】図5は、Russet Burbank対照(WT)とともに、2つの事象(W3およびW8)に関する圃場生育植物の塊茎から単離された全RNA(20µg)のノーザンブロット分析の結果を示す。ブロットを、Asn1、Ppo5、PhL、R1、およ

50

び V I n v 転写物に特異的なプローブとハイブリダイズした（上側パネル）。内部対照 18 s r R N A に対して特異的なプローブ（中央パネル）およびエチジウムブロミド染色した全 R N A（下側パネル）を、内部対照およびローディング対照として使用した。各プロットは、各サンプルに関する 2 つの独立した生物学的複製物を含む。W 3 = 提出されなかったさらなる事象。

【0025】

【図6】図6は、Russet Burbank対照（WT）とともに、2つの事象（W3およびW8）に関する圃場生育植物の葉から単離された全RNA（20 μg）のノーザンプロット分析の結果を示す。プロットを、Asn1、Ppo5、PhL、R1、およびV I n v 転写物に特異的なプローブとハイブリダイズさせた（上側パネル）。内部対照 18 s r R N A に特異的なプローブ（中央パネル）およびエチジウムブロミド染色した全RNA（下側パネル）を、内部対照およびローディング対照として使用した。各プロットは、各サンプルに関する 2 つの独立した生物学的複製物を含む。W 3 = 提出されなかったさらなる事象。

10

【0026】

【図7】図7は、Russet Burbank対照（WT）とともに、2つの事象（W3およびW8）に関する圃場生育植物の幹から単離された全RNA（20 μg）のノーザンプロット分析の結果を示す。プロットを、Asn1、Ppo5、PhL、R1、およびV I n v 転写物に特異的なプローブとハイブリダイズさせた（上側パネル）。内部対照 18 s r R N A に特異的なプローブ（中央パネル）およびエチジウムブロミド染色した全RNA（下側パネル）を、内部対照およびローディング対照として使用した。各プロットは、各サンプルに関する 2 つの独立した生物学的複製物を含む。W 3 = 提出されなかったさらなる事象。

20

【0027】

【図8】図8は、Russet Burbank対照（WT）とともに、2つの事象（W3およびW8）に関する圃場生育植物の根から単離された全RNA（20 μg）のノーザンプロット分析の結果を示す。プロットを、Asn1、Ppo5、PhL、R1、およびV I n v 転写物に特異的なプローブとハイブリダイズさせた（上側パネル）。内部対照 18 s r R N A に特異的なプローブ（中央パネル）およびエチジウムブロミド染色した全RNA（下側パネル）を、内部対照およびローディング対照として使用した。各プロットは、各サンプルに関する 2 つの独立した生物学的複製物を含む。W 3 = 提出されなかったさらなる事象。

30

【0028】

【図9】図9は、Russet Burbank対照（WT）とともに、2つの事象（W3およびW8）に関する圃場生育植物の花から単離された全RNA（20 μg）のノーザンプロット分析の結果を示す。プロットを、Asn1、Ppo5、PhL、R1、およびV I n v 転写物に特異的なプローブとハイブリダイズさせた（上側パネル）。内部対照 18 s r R N A に特異的なプローブ（中央パネル）およびエチジウムブロミド染色した全RNA（下側パネル）を、内部対照およびローディング対照として使用した。各プロットは、各サンプルに関する 2 つの独立した生物学的複製物を含む。W 3 = 提出されなかったさらなる事象。

40

【0029】

【図10】図10は、ポリフェノールオキシダーゼ活性に関する3つの異なるカテコールアッセイの結果を示す。各アッセイに関して、Russet Burbank対照は、上にあり、変種W8は、下にある。暗褐色は、黒色斑傷減少についての形質が存在しないことを示す。図10からわかるように、W8は、黒色斑傷減少についての形質を有するのに、対照はそれを有さない。

【発明を実施するための形態】

【0030】

発明の詳細な説明

50

以下の記載及び表において、多くの用語が使用される。このような用語が与えられる範囲を含めて、本明細書及び特許請求の範囲の明らか且つ一定した理解を提供するために、以下の定義が提供される：

【0031】

対立遺伝子。対立遺伝子は、1つの形質又は特徴に関する遺伝子の1つもしくはそれより多くの代替形態のいずれかである。二倍体細胞又は生物において、所定の遺伝子の2つの対立遺伝子は、一对の相同染色体上の対応する遺伝子座を占める。

【0032】

アミノ酸配列。本明細書中で使用される場合、植物から単離されたか、植物にネイティブであるか、若しくは植物において天然に存在するか、又は、内在性対応物の核酸配列を含む以外は合成的に作製される、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそれらの断片を含む。

10

【0033】

人為的に操作された。本明細書中で使用される場合、「人為的に操作された」は、手で、又は機械的手段によって、又は遺伝子操作技術によるなどの組換え的手段によって、植物又は植物細胞を移動するか、配置するか、操作する(operate)か、又は制御することにより、操作されない(unmanipulated)天然に存在する対応物と比較して異なる生物学的、生化学的、形態学的、又は生理学的な表現型及び/又は遺伝子型を有する植物又は植物細胞を産生することを意味する。

【0034】

無性繁殖。葉の切断物、幹の切断物、根の切断物、塊茎の芽、匍匐茎、単一植物細胞プロトプラスト、カルスなどから完全な植物を生成することによる子孫の産生であり、配偶子の融合を含まない。

20

【0035】

骨格。移入することを企図するDNA挿入配列を除外した、バイナリーベクターの核酸配列。

【0036】

戻し交配。戻し交配は、ブリーダーが、ハイブリッド子孫を親の一方に戻して繰り返し交配するプロセス、例えば、第1世代ハイブリッド F_1 を F_1 ハイブリッドの親遺伝子型の一方と交配するプロセスをいう。

30

【0037】

細菌輪腐病。細菌輪腐病は、細菌クラビバクター・ミシガネンシス(*Clavibacter michiganense*)亜種によって生じる病気である。細菌輪腐病は、塊茎内の維管束輪の特徴的崩壊にその名を由来する。この輪は、しばしば、クリームイエローから明褐色の、チーズ様の腐敗として現れる。パレイショの外側表面において、重度に侵された塊茎は、わずかにくぼみ、乾燥し、割れた領域を示す。感染塊茎の維管束組織における細菌輪腐病の兆候は、上記よりも明らかでなく、崩壊した散発的に表れる暗色の線としてのみ、又は連続的な黄変色として現れる場合がある。

【0038】

黒色斑傷。損傷した塊茎組織において見出される黒色斑は、細胞の損傷の後に産生される組織を茶色、灰色又は黒色の外観にする、メラニンと呼ばれる色素の結果である。メラニンは、細胞損傷の結果として、フェノール基質及び適切な酵素が互いに接触した際に形成される。この損傷は、細胞を壊すことを必要としない。しかし、この基質と酵素との混合は、通常、組織が衝撃を受けた(impacted)際に必ず起こる。暗色斑は、まず、維管束輪のすぐ下の辺縁組織において生じるが、皮層組織の部分を含むには十分な大きさであり得る。

40

【0039】

境界様配列。「境界様」配列は、改変するために選択された植物種、又は改変するための植物種と性的に適合する植物から単離され、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)の境界配列と同様に機能する。すなわち、本発明の境界様配列は、それが連結

50

するポリヌクレオチドの組み込みを促進し且つ容易にする。本発明のDNA挿入物は、好ましくは境界様配列を含む。DNA挿入物の境界様配列は、5～100bp長、10～80bp長、15～75bp長、15～60bp長、15～50bp長、15～40bp長、15～30bp長、16～30bp長、20～30bp長、21～30bp長、22～30bp長、23～30bp長、24～30bp長、25～30bp長又は26～30bp長の間である。DNA挿入物の左境界配列及び右境界配列は、改変される植物のゲノムから単離され、及び/又はこれに対してネイティブである。DNA挿入物の境界様配列は、任意の公知のアグロバクテリウム由来のT-DNA境界配列に対して、ヌクレオチド配列において同一ではない。従って、DNA挿入物の境界様配列は、アグロバクテリウム種、例えばアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 又はアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) に由来するT-DNA境界配列とは異なる、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ超のヌクレオチドを有し得る。すなわち、本発明のDNA挿入物の境界配列又は境界様配列は、アグロバクテリウム種、例えばアグロバクテリウム・ツメファシエンス又はアグロバクテリウム・リゾゲネス由来のT-DNA境界配列と少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%又は少なくとも50%の配列同一性を有するが、100%の配列同一性は有さない。本明細書で使用される場合、「DNA挿入物の境界」および「DNA挿入物の境界様」との記述用語は、交換可能である。境界様配列は、植物ゲノムから単離され、かつ改変されるか又は変異され得、それにより別のヌクレオチド配列内にヌクレオチド配列を組み込むことができる効率を変化させることができる。他のポリヌクレオチド配列が、本発明の境界様配列に付加されるか、又はこれの内に組み入れられてもよい。従って、DNA挿入物の左境界又はDNA挿入物の右境界は、5'-及び3'-マルチクローニング部位又はさらなる制限部位を有するように、改変されてもよい。DNA挿入物の境界配列は、同伴するベクターからの骨格DNAが植物ゲノム内に組み込まれない確度を高めるために改変されてもよい。

10

20

【0040】

本質的に成る。特定の要素から「本質的に成る」組成物は、これらの要素、並びに、本発明の組成物の基本的及び新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない要素を含むことに限定される。従って、組成物が、本発明の基本的及び新規な特徴に影響を及ぼさない、すなわち、選択された植物種又は選択された植物種と性的に適合する植物由来でない外来性DNAを含まない限り、この組成物は、「本質的に成る」の語によって特徴づけられる本発明の組成物の構成要素であると考えられてもよい。

30

【0041】

子葉。子葉は、種子の葉の種類である。子葉は、種子の食物保存組織を含む。

【0042】

縮重プライマー。「縮重プライマー」は、類似であるが完全な相同性はない配列にハイブリダイズする際に塩基ミスマッチを受け入れ得る、十分なオリゴヌクレオチドバリエーションを含むオリゴヌクレオチドである。

40

【0043】

双子葉植物 (*dicot*)。胚芽が2枚の種葉 (*seed leaf*) 又は子葉を有する、顕花植物。*dicot*の例としては、タバコ、トマト、パレイショ、カンショ、キャッサバ、アルファルファ及びダイズを含むマメ科植物、ニンジン、イチゴ、レタス、オーク、カエデ、クルミ、バラ、ハッカ、カボチャ、ヒナギク及びサボテンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

DNA挿入物。本発明に従い、植物のゲノム内に挿入されるDNA挿入物は、この植物にネイティブであるポリヌクレオチド配列を含むか、又はこの植物に対しネイティブな遺伝子エレメントを有する。1つの例において、例えば、本発明のパレイショ変種W8のp

50

S I M 1 2 7 8 からの D N A 挿入物は、パレイショ又はパレイショに性的に適合する植物であるワイルドポテトにネイティブである 1 0 , 1 4 8 b p の非コードポリヌクレオチドであり、形質転換の際に植物細胞のゲノム内に安定的に組み込まれて、黒色斑傷の発現、アスパラギン蓄積及び老化甘味に關与する遺伝子をサイレンシングする。D N A 挿入物は、好ましくは、2つの発現カセットを含み、p S I M 1 2 7 8 形質転換ベクターと呼ばれる形質転換ベクター内に挿入される。第1カセットは、アスパラギンシンターゼ - 1 遺伝子 (A s n 1) 及びポリフェノールオキシダーゼ - 5 遺伝子 (P p o 5) の両方の断片を、A D P グルコースピロホスホリラーゼ遺伝子 (A g p) の A g p プロモーターと顆粒結合シンターゼ遺伝子 (G b s s) の G b s s プロモーターとの間に逆方向反復として配置して含む。これらのプロモーターは、塊茎内で優性に活性である。第2のカセットの機能は、デンプン関連遺伝子ジキナーゼ - R 1 (R 1) 及びホスホリラーゼ - L 遺伝子 (P h L) のプロモーターをサイレンシングすることである。このカセットは、第1カセットと同じ A g p プロモーター及び G b s s プロモーターと作動可能に連結した、デンプン関連遺伝子ジキナーゼ - R 1 (R 1) 及びホスホリラーゼ - L 遺伝子 (P h L) のプロモーターの断片から成る。第2の D N A 挿入物は、R p i - v n t 1 発現カセットおよび植物液胞インベルターゼ遺伝子 V I n v のサイレンシングカセットを含む p S I M 1 6 7 8 と いわれる形質転換ベクターに由来する。上記 R p i - v n t 1 遺伝子カセットは、後期胴枯れ病への広い抵抗性を付与するためにそのネイティブプロモーターおよびターミネーター配列によって調節される V N T 1 タンパク質コード領域から成るのに対して、上記サイレンシングカセットは、植物プロモーターである p G b s s および p A g p を対向させることによって隣接されるパレイショ V I n v 遺伝子に由来する配列の逆方向反復から成る。これらの発現カセットは、外来性 D N A を含まず、選択された植物種又は選択された植物種と性的に適合する植物のいずれかからの D N A のみから成る。

【 0 0 4 5 】

胚芽。胚芽は、成熟種子内に含まれる未熟な植物である。

【 0 0 4 6 】

外来性。「外来性」は、核酸に関して、その核酸が、非植物生物に由来するか、若しくは形質転換される植物と同一の種でない植物に由来するか、又は形質転換される植物と交配可能でない植物に由来せず、標的植物の種に属さないことを意味する。本発明に従い、外来性 D N A 又は R N A は、真菌、細菌、ウイルス、哺乳類、魚類又は鳥類の遺伝的性質において天然に存在するが、形質転換される植物において天然に存在しない核酸を表す。従って、外来性核酸は、例えば、形質転換植物によって天然に産生されないポリペプチドをコードするものである。外来性核酸は、タンパク質産物をコードする必要はない。本発明に従い、所望の遺伝子内植物は、そのゲノム内に組み込まれる外来性核酸を何ら含まないものである。

【 0 0 4 7 】

遺伝子。本明細書中で使用される場合、「遺伝子」は、コード領域をいい、この領域の 5 ' - 又は 3 ' - であるヌクレオチド配列を含まない。機能的遺伝子は、プロモーター又はターミネーターに作動可能に連結したコード領域である。遺伝子は、形質転換又は種々の繁殖方法を用いて、異なる種又は同じ種のいずれかに由来の種のゲノム内に導入される。

【 0 0 4 8 】

遺伝子変換された(変換)。遺伝子変換された(変換)植物は、戻し交配と呼ばれる植物繁殖技術によって開発された植物をいい、ここで、変種の所望の形態学的及び生理学的特徴の本質的に全てが、この変種内に戻し交配技術を介して、遺伝子操作を介して、又は変異を介して移入された1つもしくはそれより多くの遺伝子に加えて、回復されている。1つもしくはそれより多くの遺伝子座もまた、移入され得る。

【 0 0 4 9 】

遺伝的再構成。遺伝物質の新規な構成を導入する、インビボで並びにインビトロで自発的に起こり得る、遺伝子エレメントの再集合をいう。例えば、異なる染色体遺伝子座にポ

リヌクレオチドと一緒にスプライシングすることは、植物発生及び性的組換え (sexual recombination) の両方の間に、自発的にインビボで起こり得る。従って、非天然の遺伝子改変技術によるインビトロでの遺伝子エレメントの組換えは、インビボで性的組換えを通して起こり得る組換え事象に類似する。

【0050】

ジャガイモシストセンチュウ (Golden nematode)。ジャガイモシストセンチュウとして一般に公知であるグロボデラ・ロストキエンシス (Globodera rostochiensis) は、パレイショ植物の根及び塊茎を冒す植物寄生性線虫である。兆候としては、貧弱な植物成長、しおれ、水ストレス及び栄養不足が挙げられる。

10

【0051】

胚軸。胚軸は、子葉と根との間の、胚芽又は苗の部分である。従って、これは、苗条と根との間の遷移区域と考えられ得る。

【0052】

インフレーム (in frame)。ヌクレオチドトリプレット (コドン) は、植物細胞において、所望の組換えタンパク質の初期のアミノ酸配列に翻訳される。具体的には、本発明は、第2の核酸にリーディングフレーム内で連結した第1核酸を企図し、ここで、第1のヌクレオチド配列は、遺伝子であり、第2のヌクレオチド配列は、プロモーター又は類似の調節エレメントである。

20

【0053】

組み込む。選択された植物種に由来する又は選択された植物と同じ種由来である植物に由来する又は選択された植物種と性的に適合する植物に由来する核酸配列の、選択された植物種の細胞のゲノム内への挿入をいう。「組み込み」は、ネイティブの遺伝子エレメントのみの植物細胞ゲノム内への組み入れをいう。ネイティブの遺伝子エレメントを、例えば相同組換えによって組み込むために、本発明は、このようなプロセスにおける工程として、非ネイティブのDNAを「使用」し得る。従って、本発明は、特定のDNA分子の「使用」と特定のDNA分子の植物細胞ゲノム内への「組み込み」との間を区別する。

【0054】

導入。本明細書中で使用される場合、感染、トランスフェクション、形質転換又は形質移入を含む方法による、細胞への核酸配列の挿入をいう。

30

【0055】

単離された。「単離された」は、その通常のネイティブな環境から物理的に分離されている任意の核酸又は化合物をいう。単離された物質は、例えば、溶媒、バッファ、イオンまたは他の構成要素を含む好適な溶液中で維持されてもよく、精製された形態であっても、精製されていない形態であってもよい。

【0056】

後期胴枯れ病。卵菌 *Phytophthora infestans* によって引き起こされかつパレイショ植物の葉、幹、果実、および塊茎に感染し破壊し得る「パレイショ胴枯れ病 (potato blight)」としても公知のパレイショの病気。

【0057】

リーダー。遺伝子に先行する (すなわち 5' 側である)、転写されるが翻訳されない配列。

40

【0058】

遺伝子座。遺伝子座は、1つもしくはそれより多くの形質、例えば、雄性不稔、除草剤耐性、昆虫抵抗性、病気抵抗性、ワキシードン、改変された脂肪酸代謝、改変されたフィチン酸代謝、改変された炭水化物代謝及び改変されたタンパク質代謝などを付与する。この形質は、例えば、戻し交配、天然若しくは誘発された変異によりこの変種のゲノム内に導入された天然に存在する遺伝子、又は遺伝子形質転換技術を通して導入されたトランスジーンによって付与され得る。遺伝子座は、単一の染色体位置に組み込まれた1つもしくはそれより多くの対立遺伝子を含み得る。

50

【0059】

市場性のある収量 (marketable yield)。市場性のある収量は、直径 2 ~ 4 インチの間である収穫された全ての塊茎の重量である。市場性のある収量は、cwt (ハンドレッドウェイト) (cwt = 100 ポンド) で測定される。

【0060】

単子葉植物 (monocot)。胚芽が 1 枚の子葉又は種葉を有する、顕花植物。monocot の例としては、ターフグラス、トウモロコシ、コメ、カラスムギ、コムギ、オオムギ、ソルガム、ラン、アイリス、ユリ、タマネギ及びヤシが挙げられる。

【0061】

ネイティブな。「ネイティブな」遺伝子エレメントは、形質転換される植物のゲノム内に天然に存在するか、これに由来するか、又はこれに属する、核酸をいう。従って、形質転換される植物又は植物種のゲノムから単離されるか、又は形質転換される植物種と性的に適合するすなわち交配可能である植物又は植物種から単離される任意の核酸、遺伝子、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、mRNA 又は cDNA の分子は、この植物種に「ネイティブ」である、すなわち、この植物種に固有である。言い換えると、ネイティブな遺伝子エレメントは、古典的植物繁殖を通じた植物の改良のために、植物ブリーダーにアクセス可能である全ての遺伝子材料を表す。ネイティブな核酸の任意のバリエーションはまた、本発明に従って、「ネイティブである」と考えられる。この観点で、「ネイティブな」核酸はまた、植物又はその性的に適合する種から単離されかつは改変されるかまたは変異され得、それにより結果として得られたバリエーションが、植物から単離された未改変でネイティブな核酸に対して、ヌクレオチド配列において 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61% 若しくは 60% 超または 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61% 若しくは 60% 類似している。ネイティブな核酸バリエーションはまた、ヌクレオチド配列において、約 60% 未満、約 55% 未満、又は約 50% 未満類似していてもよい。植物から単離された「ネイティブな」核酸はまた、この核酸から転写され、翻訳された、天然に生じたタンパク質産物のバリエーションをコードしてもよい。従って、ネイティブな核酸はまた、核酸が単離された植物において発現される未改変且つネイティブなタンパク質に対して、アミノ酸配列において 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61% 若しくは 60% 超または 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61% 若しくは 60% 類似しているタンパク質をコードし得る。

【0062】

ネイティブな遺伝子エレメント。「ネイティブな遺伝子エレメント」は、本発明に従う選択された植物種ゲノム内に組み入れられて、組み込まれ得る。ネイティブな遺伝子エレメントは、選択された植物種に属する植物又は選択された植物種と性的に適合する植物から単離される。例えば、栽培されたパレイショ (ソラナム・ツペロサム) 内に組み入れられたネイティブな DNA は、S・ツペロサムの任意の遺伝子型に由来しても、又は S・ツペロサムと性的に適合するワイルドポテト種 (例えば、S・デミッサム (S. demissum))

s u m)) の任意の遺伝子型に由来してもよい。

【 0 0 6 3 】

天然に存在する核酸。天然に存在する核酸は、選択された植物種のゲノム内で見出され、DNA分子であっても、又はRNA分子であってもよい。通常植物種のゲノム内に存在する制限部位の配列は、制限部位がゲノムから物理的に単離されなかったとしても、外因性DNA分子、例えばベクター又はオリゴヌクレオチド内で操作され得る。従って、本発明は、ヌクレオチド配列、例えば制限酵素認識配列の合成的作製を、その配列が、形質転換される選択された植物種のゲノム又は選択された植物種と性的に適合する植物におけるゲノム内に天然に存在する限り、許容する。

【 0 0 6 4 】

作動可能に連結した。2つもしくはそれより多くの分子を、これらが植物細胞内で組み合わせて適切に機能する様式で組み合わせること。例えば、プロモーターは、このプロモーターが構造遺伝子の転写を制御する場合、構造遺伝子に作動可能に連結されている。

【 0 0 6 5 】

植物。本明細書中で使用される場合、用語「植物」は、被子植物類及び裸子植物類、例えば、パレイショ、トマト、タバコ、アルファルファ、レタス、ニンジン、イチゴ、テンサイ、キャッサバ、カンショ、ダイズ、トウモロコシ、ターフグラス、コムギ、コメ、オオムギ、ソルガム、カラスムギ、オーク、ユーカリ、クルミ及びヤシが挙げられるが、これらに限定されない。従って、植物は、monocotであってもdicotであってもよい。語「植物」は、本明細書中で使用される場合、有性的に産生されたか無性的に産生されたかに拘わらず、植物細胞、種子、植物子孫 (plant progeny)、繁殖体、並びにこれらのいずれかの派生物 (descendent)、例えば切断物若しくは種子をも、包含する。植物細胞としては、浮遊培養物、カルス、胚芽、分裂組織領域、カルス組織、葉、根、苗条、配偶体、芽胞体、花粉、種子及び小孢子が挙げられる。植物は、種々の成熟段階であり得、ポット内、温室若しくは野外で、液体若しくは固体培養において成長させられても、又は土壌において若しくは好適な培地中で、成長させられてもよい。導入されたリーダー、トレイラー又は遺伝子配列の植物における発現は、一時的であっても、恒久的であってもよい。「選択された植物種」は、これらの「植物」のいずれか1つの種であり得るが、これらに限定されない。

【 0 0 6 6 】

植物部分。本明細書中で使用される場合、用語「植物部分」(又はパレイショ植物若しくはその部分)としては、プロトプラスト、葉、幹、根、根端、葯、雌ずい、種子、胚芽、花粉、胚珠、子葉、胚軸、花、塊茎、芽、組織、葉柄、細胞、分裂組織細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 7 】

植物種。少なくとも何らかの性的適合性を示す、種々の公的に命名された植物種に属する植物の群。

【 0 0 6 8 】

植物形質転換及び細胞培養。広範には、植物細胞が遺伝的に改変され、維持、さらなる成長、及び/又はさらなる発生のために、適切な植物培養培地に移されるプロセスをいう。

【 0 0 6 9 】

的確繁殖。核酸、例えば選択された植物種から又は選択された植物と同じ種の別の植物から又は選択された植物種と性的に適合する種から単離された、ネイティブな遺伝子及び調節エレメントの、個々の植物細胞への安定的導入、並びにその後のこれらの遺伝的に改変された植物細胞の植物全体への再生による、植物の改善をいう。未知の又は外来性の核酸が恒久的に植物ゲノム内に組み入れられないので、本発明の技術は、従来の植物繁殖を通して利用可能である、同じ遺伝物質を用いる。

【 0 0 7 0 】

子孫。本明細書中で使用される場合、少なくとも一方の植物がパレイショ栽培品種 W 8

10

20

30

40

50

を含む2種のバレイショ植物の交配から産生されたF₁バレイショ植物を含み、子孫はさらに、反復親系統 (recurrent parental line) との世代間交配であるその後のF₂、F₃、F₄、F₅、F₆、F₇、F₈、F₉及びW8を含むが、これらに限定されない。
【0071】

定量的形質遺伝子座 (QTL)。定量的形質遺伝子座 (QTL) は、通常は連続的に分布している、ある程度数値的に表すことが可能である形質を、制御する遺伝子座をいう。
【0072】

組換え体。本明細書中で使用される場合、遺伝子がクローニングされ得、DNAが配列決定され得、タンパク質産物が産生され得る、種々の技術を広範に記載する。本明細書中で使用される場合、この用語はまた、遺伝子の植物宿主系の細胞への移入後に産生されているタンパク質もまた、記載する。
【0073】

再生。再生は、組織培養物からの植物の発生をいう。
【0074】

調節配列。植物系において目的の遺伝子の転写又はその結果生じたRNAの翻訳を増大し及び/又は最大化するために、発現ベクター内に含まれ得る、標準的且つ当業者に公知である配列をいう。これらとしては、プロモーター、ペプチド輸送シグナル配列、イントロン、ポリアデニル化、及び転写終結部位が挙げられるが、これらに限定されない。核酸構築物を植物における発現レベルを上げるように改変する方法もまた、全体として当該分野で公知である (例えば、Rogersら, 260 J. Biol. Chem. 373:1~38, 1985; Cornejoら, 23 Plant Mol. Biol. 567:81, 1993を参照されたい)。タンパク質の転写の速度に影響を及ぼすための植物系の操作において、種々の因子が当該分野で公知であり、これらとしては、正又は負に作用する配列であるエンハンサー及びサイレンサーなどの調節配列が挙げられ、並びに、クロマチン構造が、影響を有し得る。本発明は、これらの因子の少なくとも1つが、目的のタンパク質を発現するように植物を操作する際に利用され得ることを提示する。本発明の調節配列は、ネイティブな遺伝子エレメントであり、すなわち、改変されるために選択された植物種から単離される。
【0075】

選択可能マーカー。「選択可能マーカー」は、代表的に、抗生物質、除草剤又は毒性化合物に対しある種の抵抗性を付与するタンパク質をコードする遺伝子であり、形質転換事象を同定するために使用される。選択可能マーカーの例としては、ストレプトマイシン抵抗性をコードするストレプトマイシンホスホトランスフェラーゼ (spt) 遺伝子、マンノース-6-ホスフェートをフルクトース-6ホスフェートに変換するホスホマンノースイソメラーゼ (pmi) 遺伝子、カナマイシン及びゲネチシンの抵抗性をコードするネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (nptII) 遺伝子、ハイグロマイシンに対する抵抗性をコードするハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (hpt又はaphIV) 遺伝子、スルホニルウレア型除草剤に対する抵抗性をコードするアセトラクテートシンターゼ (als) 遺伝子、グルタミンシンターゼの作用を阻害するように作用する除草剤に対する抵抗性をコードする遺伝子、例えばホスフィトリシンすなわちbast (例えば、bar遺伝子) 又は、当該分野で公知の他の類似の遺伝子が挙げられる。
【0076】

センス抑制。トランスジェニック植物における内因性遺伝子の全て又は部分の、1つもしくはそれより多くのさらなるコピーの発現による該内因性遺伝子の発現の低下。
【0077】

比重。本明細書中で使用される場合、「比重」は、密度の表現であり、バレイショ品質の測定値である。塊茎の比重及びデンプン含量と乾燥物質の百分率又は全固体との間の高い相関性が、存在する。より高い比重は、加工製品のより高い回収率及びより良い品質に寄与する。
【0078】

10

20

30

40

50

T - DNA 様。「T - DNA 様」配列は、選択された植物種から、又は選択された植物種と性的に適合する植物から単離される核酸であり、アグロバクテリウム種 T - DNA と少なくとも 75%、80%、85%、90% 又は 95% の配列同一性を共有するが、100% は共有しない。T - DNA 様配列は、各々がヌクレオチド配列を別のポリヌクレオチド内に組み込むことできる、1 つもしくはそれより多くの境界配列若しくは境界様配列を含み得る。

【0079】

総収量。総収量は、全ての収穫塊茎の総重量をいう。

【0080】

トレイラー。遺伝子に続く（すなわち 3' 側である）、転写されるが翻訳されない配列。

10

【0081】

転写 DNA。遺伝子並びにその遺伝子に関連する非翻訳リーダー及びトレイラーの両方を含む DNA であり、これは、先行するプロモーターの作用によって、単一の mRNA として転写される。

【0082】

植物細胞の形質転換。DNA が植物細胞のゲノム内に安定的に組み込まれるプロセス。「安定的」は、細胞ゲノムにおける及び細胞ゲノムによる、ポリヌクレオチドの恒久的な、若しくは非一時的な、保持及び/又は発現をいう。従って、安定的に組み込まれたポリヌクレオチドは、形質転換した細胞ゲノム内の固定物（fixture）であり、該細胞又はその結果生じた形質転換植物の引き続く子孫によって複製されかつ増殖され得るポリヌクレオチドである。形質転換は、天然の条件下又は当該分野で周知の種々の方法を用いる人為的条件下で生じ得る。形質転換は、原核生物宿主細胞又は真核生物宿主細胞への核酸配列の挿入のための、任意の公知の方法に依存し得、その方法としては、アグロバクテリウム媒介型形質転換プロトコル、ウイルス感染、ウイスキー法、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクション、ポリエチレングリコール処理、マイクロインジェクション及び微粒子銃が挙げられる。

20

【0083】

トランスジーン。タンパク質コード領域を含む宿主ゲノム内に挿入される遺伝子。本発明の文脈において、トランスジーンを含むエレメントは、宿主ゲノムから単離される。

30

【0084】

トランスジェニック植物。少なくとも 1 つのトランスジーンを含む遺伝的に改変された植物。

【0085】

バリエーション。本明細書中で使用される場合、「バリエーション」は、特定の遺伝子又はタンパク質の、標準的又は所定のヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列から逸脱する、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を意味すると理解される。用語「アイソフォーム」、「イソ型」及び「アナログ」もまた、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の「バリエーション」形態をいう。1 つまたはそれより多くのアミノ酸の付加、除去若しくは置換、又はヌクレオチド配列の変更により改変されているアミノ酸配列は、「バリエーション」配列と考えられ得る。バリエーションは、置換されたアミノ酸が類似の構造的又は化学的特性を有する「保存的」変更、例えば、ロイシンのイソロイシンによる置き換えを有し得る。バリエーションは、「非保存的」変更、例えば、グリシンのトリプトファンによる置き換えを有し得る。同様な僅かな変動はまた、アミノ酸欠失若しくは挿入、又は両方を含み得る。どのアミノ酸残基が置換され得るか、挿入され得るか、又は欠失され得るかの決定における手引きは、当該分野で周知のコンピュータープログラム、例えば、Vector NTI Suite (Informax, MD) ソフトウェアを用いて見出され得る。

40

【0086】

つる熟成。つる熟成は、炭水化物を利用すること及び光合成すること続ける植物の能力をいう。つる熟成は、1 ~ 5 の段階において評点し、ここで、1 = 死んだつる、及び 5

50

= つるは緑色、未だ開花している。

【0087】

所望の形質のパレイショ植物のゲノム内への挿入は、特に困難を示す。何故なら、パレイショは、四倍体であり、高度に異型接合であり、且つ近交弱勢に感受性であるからである。従って、従来繁殖を用いる処理の間に、より少ないアクリルアミドを産生し、有害なメイラード反応産物がより少ない、トランスジェニックパレイショ植物を効率的に開発することは、非常に困難である。有害なメイラード反応産物としては、以下が挙げられる：
N - ニトロソ - N - (3 - ケト - 1 , 2 - ブタンジオール) - 3 ' - ニトロチラミン (Wangら, Arch Toxicol 70 : 10 ~ 5 , 1995)、5 - ヒドロキシメチル - 2 - フルフラニル (Janzowskiら, Food Chem Toxicol 38 : 801 ~ 9 , 2000)、及び変異誘発特性を有する他のメイラード反応産物 (Shibamoto, Prog Clin Biol Res 304 : 359 ~ 76 , 1989)。

10

【0088】

プロセスの変更、デキストロースの低減、並びにアスパラギナーゼ、シトレート及び競合アミノ酸などの添加物を通してアクリルアミドを低減するために、幾つかの方法が試験されており、研究が進行中である。パレイショ産業を通じたプロセス変更を実施するための所要の資本経費は、数百万ドルにも及ぶ。経費に加え、これらのプロセス変更は、添加物、例えばアスパラギナーゼ若しくはシトレートに伴う潜在的に負である風味を含む、重要な欠点を有する。代表的には、揚げ物製造者は、フレンチフライの加工の間に、所望の金褐色を発色させるためにデキストロースを加えるが、デキストロースはまた、メイラード反応を通してアクリルアミドの形成を増大する。アクリルアミドにおける有意な低減は、単に、プロセスからデキストロースを省くことによってもたらされるが、金褐色のサインは、何らかの他の方法で（例えば、アナトーなどの色素の添加を通して）発色させなければならない。代替の色素の使用は、これらの褐色化反応を通して発する代表的な風味の非存在をもたらす。アスパラギンなどの反応物を低減するための、添加物の使用による別の課題は、凍結保存の間に起こる水分移動であり、これは、表面へのアスパラギンの戻り (return) 及びアクリルアミドの増大をもたらす。最後に、パレイショが傷ついたのちに起こる黒色化は、フレンチフライ及びポテトチップスの加工の際の品質並びに回収率に影響を及ぼす。損傷し傷ついたパレイショは、処理の前に削り取るか、又は取り除かれなければならない。品質の課題又は経済的損失をもたらす。

20

30

【0089】

本発明の「ネイティブ技術」戦略は、黒色斑傷に関与するポリフェノールオキシダーゼ - 5 (PPO - 5) の発現、アクリルアミド形成の前駆体であるアスパラギンの蓄積に関与するアスパラギンシンターゼ - 1 (Asn - 1) の発現を低減すること、スクロースをグルコース及びフルクトースへと変換する酵素液胞インベルターゼの発現、及びノ又は、通常はアスパラギンなどのアミノ酸と反応してアクリルアミドを含む毒性のメイラード産物を形成する還元糖の蓄積に関連する酵素であるホスホリラーゼ - L 及びキナーゼ - R 1 の発現を低減することによる、パレイショの農業特徴及び栄養的価値を改善するための、パレイショ産業の需要に対処する。塊茎におけるこれらの遺伝子の部分的又は完全なサイレンシングは、アクリルアミドを産生する可能性を低下させる。本発明のネイティブな技術の使用は、パレイショ植物から又はパレイショ植物と性的に適合する植物から得た遺伝物質である、非コード調節領域のみを含む「ネイティブな」遺伝物質のみによる、何ら外来性の遺伝物質を植物ゲノム内に組み込むことなくパレイショの形質転換により、市場で価値のあるパレイショ植物変種のゲノム内への所望の形質の組み入れを可能にする。所望の形質は、衝撃誘導型の黒色斑傷に対する高度な耐性、後期胴枯れ病感染に対する抵抗性の増大、アクリルアミド前駆体であるアスパラギンの形成の低減及び還元糖の蓄積の低減、及びその結果としてのアクリルアミドを含む毒性のメイラード産物の蓄積の低減、改善された品質並びに食品色調節を含む。既存のパレイショ変種へのこれらの所望の形質の組み入れは、従来型繁殖を通して達成することは不可能である。何故なら、パレイショは

40

50

、四倍体であり、高度に異型接合であり、且つ近交弱勢に感受性であるからである。

【0090】

本発明において使用される非コードバレイショ植物DNA挿入配列は、バレイショ植物ゲノムに対してネイティブであり、何らアグロバクテリウムDNAを含まない。DNA挿入物のうちの1つは、好ましくは、2つの発現カセットを含み、pSIM1278形質転換ベクターと呼ばれる形質転換ベクター内に挿入される。第1カセットは、アスパラギンシンターゼ-1遺伝子(A sn1)及びポリフェノールオキシダーゼ-5遺伝子(P p o 5)の両方の断片を、ADPグルコースピロホスホリラーゼ遺伝子(A g p)のA g pプロモーターと顆粒結合シンターゼ遺伝子(G b s s)のG b s sプロモーターとの間に逆方向反復として配置して含む。これらのプロモーターは、塊茎内で優性に活性である。第2のカセットの機能は、デンプン関連遺伝子ジキナーゼ-R1(R1)及びホスホリラーゼ-L遺伝子(P h L)のプロモーターをサイレンシングすることである。このカセットは、第1カセットと同じA g pプロモーター及びG b s sプロモーターと作動可能に連結した、デンプン関連遺伝子ジキナーゼ-R1(R1)及びホスホリラーゼ-L遺伝子(P h L)のプロモーターの断片から成る。これらの発現カセットは、外来性遺伝子を含まず、選択された植物種又は選択された植物種と性的に適合する植物のいずれかからのDNAのみから成る。第2のDNA挿入物は、R p i - v n t 1発現カセットおよび植物液胞インペルターゼ遺伝子V I n vのサイレンシングカセットを含むpSIM1678といわれる形質転換ベクターに由来する。R p i - v n t 1遺伝子カセットは、後期胴枯れ病への広い抵抗性を付与するためにそのネイティブプロモーターおよびターミネーター配列によって調節されるVNT1タンパク質コード領域から成るのに対して、サイレンシングカセットは、植物プロモーターであるpG b s sおよびpA g pを対向させることによって隣接されるバレイショV I n v遺伝子に由来する配列の逆方向反復から成る。第1のカセットの機能は、後期胴枯れ病への抵抗性を付与することである一方で、第2のカセットの機能は、液胞インペルターゼ遺伝子をサイレンシングしてグルコースおよびフルクトースを低減することである。

10

20

【0091】

本発明において使用される商業的に価値のあるバレイショ植物変種は、R u s s e t B u r b a n kである。L u t h e r B u r b a n kは、この品種を、1870年代初頭に開発した。植物は、育ちがよく、シーズンを通して連続したつるの成長を有する。幹は太く、突角を成し、細かな斑を有する。葉は、長い~中程度の幅であり、明るい~中程度の緑色である。花は僅かで、白色であり、不稔である。栽培品種は、瘦果病(common scab)に耐性であるが、フザリウム属及びパーティシリウム属の萎ちょう病、葉巻病及び網状壊死、バレイショウイルスY、並びに後期胴枯れ病に感受性である。植物は、コブ、尖頭及びアレイ状突起を有さない塊茎を産生するために、高く且つ均一な土壤水分及び制御された窒素稔性の条件を必要とする。植物がストレスに曝された際、ゼリー末端及びシュガーエンドを発生させる。産生された塊茎は、大きな褐色の皮及び白色の中身であり、良好な長期保存特徴を示し、優れたベーキング及び加工品質についての標準を表す。R u s s e t t B u r b a n k変種は、黒色斑傷を発生し易さが高く、高い遊離のアスパラギン含量及び高い老化甘味能力を有する(A m . J . P o t a t o R e s (1 9 6 6) 4 3 : 3 0 5 ~ 3 1 4)。この変種は、稔性であり、特にフレンチフライの生産のために、北西部及び中西部において広く育てられている。

30

40

【0092】

本発明は、形質転換ベクターpSIM1278によって形質転換され、続いて第二の形質転換ベクターpSIM1678で形質転換が行われ、マーカーよりもむしろポリメラーゼ連鎖反応を用いて同定され、そして首尾よく増殖されている、顕著な市場価値を有するバレイショ変種、すなわちR u s s e t B u r b a n kを、提供する。また、本発明のバレイショ植物変種W8の塊茎から製造された食物製品が、提供される。バレイショ栽培品種W8は、経済協力開発機構(OECD)により、以下の独特の植物変種識別子を有する：S P S - W 8 - 4。

50

【0093】

ネイティブDNAでサイレンシングする標的化された遺伝子は、バレイショ植物変種W8の塊茎において標的化された遺伝子のRNA転写物のレベルを低下させる。バレイショ栽培品種W8は、複数の機構によって塊茎における還元糖のレベルを低下させる発現カセットを含む。pSIM1278での形質転換を通じて、サイレンシングカセットを、デンプン関連遺伝子(R1)およびホスホリラーゼ-L遺伝子(PhL)のプロモーターのために導入した一方で、pSIM1678での形質転換は、インベルターゼ遺伝子(Vinv; Yeら, 2010)のサイレンシングカセットを導入した。一緒になると、これら形質は、デンプンおよびスクロースを還元糖(グルコースおよびフルクトース)へと変換するのを遅らせることによって機能する。

10

【0094】

従って、本発明のバレイショ植物変種W8の塊茎は、揚げるか又は焼く際のアクリルアミド形成の低下に関連する、遊離のアミノ酸アスパラギンおよびグルタミンにおける比の低下を含む、非常に望ましい形質を組み入れる。具体的には、本発明のバレイショ変種W8は、遊離アスパラギン含量の2分の1~4分の1を下回るまでの低下、黒色斑傷に関連する変色の低減及び後期胴枯れ病に対する抵抗性の増大によって特徴づけられる。さらに、本発明のバレイショ変種W8は、保存の間の、デンプンの還元糖であるグルコース及びフルクトースへの分解の遅延を示す。デンプンから糖への変換の不全は、老化甘味及びアクリルアミド形成をさらに低下させ、熱誘導型褐色化を制限する。

20

【0095】

本発明のバレイショ変種W8は、従って、その塊茎が加熱処理の際に有意に少ないアクリルアミドしか産生せず、潜在的に有害な外来性遺伝子を何ら有さないもので、バレイショ産業及び食物市場において非常に価値が高い。

【実施例】

【0096】

本発明は、ネイティブ技術を使用して、ネイティブな非コードDNAを選択されたバレイショ植物変種のゲノム内に組み込み、新規な遺伝子内バレイショ植物変種を開発する。本方法は、形質同定、ベクターの設計、ベクターのアグロバクテリウム内への組み入れ、レシピエントバレイショ変種の選択、植物形質転換、オープンリーディングフレームの非存在の証明、及び新規なバレイショ変種がネイティブなDNAのみを含むことの確認を含む。本発明のバレイショ栽培品種W8は、非形質転換対応物よりも、アクリルアミドを形成する潜在能がより低く、スクロースの量が低く、黒色斑傷に対してより抵抗性である。さらに、本発明のバレイショ栽培品種W8は、後期胴枯れ病に対する抵抗性が増大している。

30

【0097】

実施例1 . pSIM1278形質転換ベクター

本発明において使用される形質転換ベクターpSIM1278は、pSIM106に由来し、これを、0.4-kbバレイショ植物DNA断片(GenBank受託番号AY566555として寄託される)を、プラスミドpVS1及びpBR322由来の細菌の複製起点並びにカナマイシンに対する細菌抵抗性のためのnptIII遺伝子を有するpCAMBIA1301(CAMBIA, Canberra, Australia)の5.9-kb SacII-SphI断片に連結することによって作製した。Ubi-3プロモーター(Garbarino and Belknap, 1994)が先行するアグロバクテリウムipt遺伝子及びそれに続くUbi-3ターミネーターを含む発現カセットを、ベクター骨格内に、2.6-kb SacII断片として導入した(Rommensら, 2004)。2つのサイレンシングカセットを有するネイティブな10-kb DNAセグメントのpSIM106のDNA挿入物への挿入は、pSIM1278を生じた。このベクターを、全ての形質転換に用いた。pSIM1278ベクターマップを、図1に示す。ベクター骨格領域は、9,512bpであり、10,149bpの位置にて開始し、19,660bpの位置にて終わる。骨格DNAは、主に、細菌DNAから成り、植物形

40

50

質転換の前のDNA挿入物の維持の支持を提供する。骨格部分は、植物細胞内に形質移入されない。骨格の種々のエレメントを、表1に記載する。pCAMBIAベクターの一般的構造マップは、<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html>において見出され得る。

【表1】

表1

遺伝子エレメント	起源	受託番号	位置 (pSIM1278)	機能
SacII 制限部位	<i>S. tuberosum</i>	AJ272136.1	19,411-19,416	Ubi7プロモーターとLB隣接配列とを接続するために使用される制限部位
76アミノ酸のパレイシヨ ビキチンモノマー (UBQmon)のコード配 列を含むポリユビキチン プロモーター (Ubi7)	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	U26831.1	17,671-19,410	ipt骨格マーカ-遺伝子の発現を駆動するプロモーター
イソペンテニルトランスフ ェラーゼ (ipt) 遺伝子	<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	NC_002377.1	16,936-17,658	イソペンテニル-AMP(植物におけるサイトカイニン)を形成するためのAMPおよびイソペンテニルピロホスフェートの縮合。植物における異常な生育表現型を生じる(Smigocki and Owens 1988)
ユビキチン-3 遺伝子のタ ーミネーター(tUbi3)	<i>S. tuberosum</i>	GP755544.1	16,230-16,584	ipt遺伝子転写のターミネーター(Garbarino and Belknap 1994)
ネオマイシンホスホトラン スフェラーゼ III (nptIII) 遺伝子	<i>E. coli</i>	FJ362602.1	15,240-16,034	アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(Courvalinら1977)
pBR322の複製起点 (pBR322 ori)	<i>E. coli</i>	J01784.1	14,669-14,949	細菌複製起点
(pBR322 bom)	<i>E. coli</i>	J01749.1	14,269-14,529	<i>E. coli</i> における複製のためのpBR322領域
pVS1レプリコン (pVS1Rep)	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> プラス ミドpVS1	AJ537514.1 (4,501-5,501)	12,859-13,859	<i>Agrobacterium</i> における複製のためのpVS1領域
pVS1分割タンパク質 (partitioning protein) StaA (PVS1 Sta)	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> プラス ミドpVS1	AJ537514.1 (6,095-7,095)	11,266-12,266	pVS1安定性
オーバードライブ (Overdrive)	<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	K00549.1 (103-132)	10,155-10,184	右側境界部位での切断を増強する

【0098】

実施例2. pSIM1278植物DNA挿入物およびそのオープンリーディングフレーム(ORF)

pSIM1278 DNA挿入物領域(pSIM1278において使用される隣接境界配列を含む)は、10,148bpの長さ(1bpから10,148bpまで)である。pSIM1278 DNA挿入物は、ネイティブDNAのみから成り、パレイシヨゲノムへと安定的に組み込まれる。上記pSIM1278 DNA挿入物もしくはその機能的部分は、本発明のパレイシヨ植物変種の中に組み込まれるベクターpSIM1278の唯一の遺伝物質である。上記pSIM1278 DNA挿入物は、図2および以下の表2に記載される。上記LBおよびRB配列(各々25bp)を、*Agrobacterium tumefaciens*に由来するT-DNA境界に類似でありそのように機能するように合成して設計した。GenBank受託AY566555を、境界領域のDNAの供給源を明らかにするために改定した。遺伝子エレメント5および10と記載されるASN1

10

20

30

40

50

は、Chawlaら, 2012においてStAst1といわれる。

【表2 - 1】

表2

遺伝子エレメント	起源	受託番号	位置 (pSIM1278)	意図される機能
1. 左側境界 (LB)部位 1	合成	AY566555 (塩基 1-25)	1 - 25	1本鎖 DNA 挿入物を pSIM1278 から放出するための二 次切断の部位 (van Haaren ら 1989)
2. LB を含む左側境界領域配 列	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet.	AY566555 (塩基 1-187)	1 - 187	LB での二次切断を支える
3. KpnI 制限部位	<i>S. tuberosum</i>	AF393847.1	188 -193	DNA 挿入物と LB 隣接配列との 接続のための部位
4. ADP グルコースピロホスホリ ラーゼ遺伝子 (pAgp) のプロモタ ー (第1のコピー)	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	HM363752	194-2,453	特に塊茎において Asn1 および Ppo5 の断片を含む逆方向反復 の発現を駆動する2つの収束プロ モーターのうちの1つ
5. アスパラギンシンターゼ-1 (Asn1) 遺伝子の断片 (第1の コピーアンチセンス配向)	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	HM363759	2,454-2,858	Asn1 転写物の分解を誘発して、 アスパラギン形成を損なう2本鎖 RNA により生成する(10) (Chawla ら 20123)
6. ポリフェノールオキシダーゼ-5 遺伝子 (Ppo5) の 3'-非翻訳配 列 (アンチセンス配向において 第1のコピー)	<i>S. verrucosum</i>	HM363754	2,859-3,002	Ppo5 転写物の分解を誘発して、 黒色斑発生をブロックする2本鎖 RNA により生成する(9)
7. XbaI 制限部位	<i>S. tuberosum</i>	DQ478950.1	3,003-3,008	スパーサー-1 への第1の Ppo5 コ ピーの接続のための部位
8. スパーサー-1	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	HM363753	3,009-3,166	第1の逆方向反復の間の配列
9. ポリフェノールオキシダーゼ-5 遺伝子 (Ppo5) の 3'-非翻訳配 列 (センス配向において第2のコ ピー)	<i>S. verrucosum</i>	HM363754	3,167-3,310	Ppo5 転写物の分解を誘発して、 黒色斑発生をブロックする2本鎖 RNA により生成する(6)
10. アスパラギンシンターゼ-1 (Asn1) 遺伝子の断片 (センス 配向において第2のコピー)	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	HM363759	3,311-3,715	Asn1 転写物の分解を誘発して、 アスパラギン形成を損なう2本鎖 RNA により生成する(5) (Chawla ら 20123)
11. EcoRI 制限部位	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	X73477	3,716-3,721	Gbss プロモーターへの第2の Asn1 コピーの接続のための部位
12. 顆粒結合デンブシンター ゼ (pGbss) 遺伝子のプロモタ ー (第1のコピー、pAgp の第1 のコピーに対して収束する配 向)	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	HM363755	3,722-4,407	Asn1 および Ppo5 の断片を含有 する逆方向反復の、特に、塊茎 における発現を駆動する2つの収 束プロモーターのうちの1つ
13. SpeI / KpnI 制限部位	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	X95996 / AF393847.1	4,408-4,423	第2の Agp プロモーターへの Gbss プロモーターの接続のためのポリ リンカー部位
14. pAgp, 第2のコピー	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	HM363752	4,424-6,683	PhL および R1 のプロモーターの断 片を含む逆方向反復の発現を、 特に、塊茎において駆動する2つ の収束プロモーターのうちの1つ

10

20

30

40

【表 2 - 2】

遺伝子エレメント	起源	受託番号	位置 (pSIM1278)	意図される機能
15.パレイシヨホスホリラーゼ-L (pPhL)遺伝子のプロモーターの断片 (アンチセンス配向において第1のコピー)	S. tuberosum var. Ranger Russet	HM363758	6,684-7,192	PhL 転写物の分解を誘発して、デンプン分解を介する還元糖の形成を制限する2本鎖 RNA により生成する(20)
16.パレイシヨ R1 遺伝子(pR1)のプロモーターの断片 (アンチセンス配向での第1のコピー)	S. tuberosum var. Ranger Russet	HM363757	7,193-7,724	R1 転写物の分解を誘発して、デンプン分解を介する還元糖の形成を制限する2本鎖 RNA により生成する(19)
17. PstI 制限部位	S. tuberosum var. Ranger Russet	DQ478950.1	7,725-7,730	スパーサー-2 への第1の R1 プロモーター断片の接続のための部位
18. スパーサー-2	S. tuberosum var. Ranger Russet	HM363756	7,731-7,988	第2の逆方向反復の間の配列
19.パレイシヨ R1 遺伝子(pR1)のプロモーターの断片 (センス配向での第2のコピー)	S. tuberosum var. Ranger Russet	HM363757	7,989-8,520	R1 転写物の分解を誘発して、デンプン分解を介する還元糖の形成を制限する2本鎖 RNA により生成する(16)
20.パレイシヨホスホリラーゼ-L (pPhL) 遺伝子のプロモーターの断片(センス配向での第2のコピー)	S. tuberosum var. Ranger Russet	HM363758	8,521-9,029	PhL 転写物の分解を誘発して、デンプン分解を介する還元糖の形成を制限する2本鎖 RNA により生成する(15)
21. pGbss (第2のコピー、pAgp の第2のコピーに対して収束する配向)	S. tuberosum var. Ranger Russet	HM363755	9,030-9,953	PhL および R1 のプロモーターの断片を含む逆方向反復の発現を特に、塊茎において駆動する2つの収束プロモーターのうちの1つ
22. SacI 制限部位	S. tuberosum	AF143202	9,954 - 9,962	DNA 挿入物とRB 隣接配列との接続のための部位.
23. RB を含む右側境界領域配列	S. tuberosum var. Ranger Russet	AY566555 (塩基 231-416)	9,963 - 10,148	RB 様部位での一次切断を支える
24. 右側境界(RB)配列 1	合成	AY566555 (塩基 392-416)	10,124 - 10,148	1本鎖 DNA 挿入物を pSIM1278 から放出するための一次切断の部位 (van Haaren ら 1989)

10

20

30

【 0 0 9 9 】

本発明のパレイシヨ系統 W 8 を作製するために使用される表 2 に記載の DNA 挿入物は、隣接する遺伝子を活性化せず、パレイシヨ植物変種 W 8 の表現型に有害な影響を及ぼさない。加えて、本発明のパレイシヨ植物変種 W 8 は、DNA 挿入物によってコードされるオープンリーディングフレームに関連する新規なタンパク質を産生しない。

【 0 1 0 0 】

実施例 3 . p S I M 1 6 7 8 形質転換ベクター

本発明において使用される形質転換ベクター p S I M 1 6 7 8 を、実施例 1 において p S I M 1 2 7 8 に関して記載される同じ方法を使用して形質転換した。p S I M 1 6 7 8 ベクターマップは、図 3 に示される。ベクター骨格領域は、9 , 0 9 1 b p の位置において始まり、1 8 , 6 0 2 b p の位置において終わるので、9 , 5 1 2 b p である。骨格 DNA は、細菌性 DNA から主に成り、植物形質転換の前に、DNA 挿入物の維持の支持を提供する。骨格部分は、植物細胞に移入されない。骨格の種々のエレメントは、表 1 に記載される。表 1 に示される番号付けシステムは、p S I M 1 2 7 8 に基づくが、骨格配列は、p S I M 1 6 7 8 に関して同一である。

40

【 0 1 0 1 】

実施例 4 . p S I M 1 6 7 8 植物 DNA 挿入物およびそのオープンリーディングフレーム (O R F)

50

pSIM1678 DNA挿入物領域（隣接境界配列を含み、pSIM1678において使用される）は、9,090bpの長さ（1bpから9,090bpまで）である。pSIM1678 DNA挿入物は、ネイティブDNAのみから成り、バレイショゲノムへと安定的に組み込まれる。pSIM1678 DNA挿入物もしくはその機能的部分は、本発明のバレイショ植物変種の中に組み込まれるベクターpSIM1678の唯一の遺物質である。pSIM1678 DNA挿入物は、図3および以下の表3に記載される。表3において、LBおよびRB配列（各25bp）を、*Agrobacterium tumefaciens*に由来するT-DNA境界に類似しそのように機能するように合成して設計した。GenBank受託AY566555を、境界領域に関するDNAの供給源を明らかにするために改訂した。

【表3】

表3

遺伝子エレメント	起源	受託番号	位置 (pSIM1678)	意図される機能
1. 左側境界 (LB) 部位	合成	AY566555 (塩基 1-25)	1 - 25	1本鎖 DNA 挿入物を pSIM1678 から放出するための二次切断の部位
2. LB を含む左側境界領域配列	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet.	AY566555 (塩基 1-187)	1 - 187	LB での二次切断を支える
3. KpnI 制限部位	<i>S. tuberosum</i>	AF393847.1	188 - 193	DNA 挿入物と LB 隣接配列との接続のための部位.
4. 後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 (<i>Rpi-vnt1</i>) のネイティブプロモーター	<i>S. venturii</i>	FJ423044.1	194 - 902	後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 <i>vnt1</i> の発現を駆動する
5. 後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 (<i>Rpi-vnt1</i>)	<i>S. venturii</i>	FJ423044.1	903 - 3,578	<i>Solanum venturii</i> 後期胴枯れ病抵抗性タンパク質遺伝子
6. <i>Rpi-vnt1</i> 遺伝子のネイティブターミネーター	<i>S. venturii</i>	FJ423044.1	3,579 - 4,503	後期胴枯れ病抵抗性遺伝子 <i>vnt1</i> の転写を終わらせる
7. ApaI	<i>S. tuberosum</i>	HM363755	4,504 - 4,509	<i>vnt1</i> ターミネーターと Agp プロモーターとの接続のための部位
8. ADP グルコーススピロホスホリラーゼ遺伝子 (pAgp) のプロモーター	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	HM363752	4,510 - 6,770	酸インペルターゼ遺伝子の断片を含む逆方向反復の発現を駆動する2つの収束プロモーターのうちの1つ
9. BamHI	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	DQ206630	6,771 - 6,776	Agp プロモーターとインペルターゼとの接続のための部位
10. 酸インペルターゼの断片 (センス配向)	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	DQ478950.1	6,777 - 7,455	インペルターゼ転写物の分解の引き金を引く2本鎖 RNA により生成する(12)
11. EcoRI	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	X73477	7,456 - 7,461	インペルターゼ断片(センス)とインペルターゼ断片(アンチセンス)との接続のための部位
12. 酸インペルターゼの断片 (アンチセンス配向)	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	DQ478950.1	7,462 - 7,965	インペルターゼ転写物の分解の引き金を引く2本鎖 RNA により生成する (10)
13. SpeI	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	X95996	7,966 - 7,971	インペルターゼ断片(アンチセンス)と GBSS プロモーターとの接続のための部位
14. 顆粒結合デンブシンターゼ (pGbss) 遺伝子のプロモーター (pAgp に対する収束する配向)	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	HM363755	7,972 - 8,895	インペルターゼ遺伝子の断片を含む逆方向反復の発現を、特に、塊茎において駆動する2つの収束プロモーターのうちの1つ
15. SacI 制限部位	<i>S. tuberosum</i>	AF143202	8,896 - 8,901	DNA 挿入物と RB 隣接配列との接続のための部位.
16. RB を含む右側境界領域配列	<i>S. tuberosum</i> var. Ranger Russet	AY566555 (塩基 231-416)	8,902 - 9,090	RB 様部位での一次切断を支える。
17. 右側境界 (RB) 配列	合成	AY566555 (塩基 392-416)	9,066 - 9,090	1本鎖 DNA 挿入物を pSIM1278 から放出するための一次切断の部位 (van Haaren ら 1989)

10

20

30

40

50

【0102】

実施例5. *Agrobacterium*株およびトランスフェクション

C58由来 *Agrobacterium*株AGL1を、高毒性プラスミドpTiBo542のトランスファーDNAを正確に欠失させることによって開発した(Lazora 1991)。形質転換した植物を、抗生物質チメンチン(これは、*Agrobacterium*の生存を防止し、従って、*Agrobacterium*が存在しない植物を選択する)を含む培地上で生育させた。選択の後、植物は、抗生物質および *Agrobacterium*をととも含まず、パレイショ由来発現カセットが植物ゲノムの中に挿入されている。

【0103】

ストック植物を、3% スクロースおよび2g/l ゲルザン(gelzan)を含む40mlの1/2に希釈された(half-strength)M516(Phytotechnology)培地(増殖培地)を有するマジエンタボックスの中で維持した。4~6mmのパレイショ節間セグメントを、4週齢の植物から切り出し、pSIM1278を有する *Agrobacterium* AGL1株に感染させ、3% スクロースおよび2g/l ゲルザンを含む組織培養培地(共培養培地)に移した。感染した外植片を、2日後に、*Agrobacterium*を除去するために3% スクロース、2g/l ゲルザン、300mg/l チメンチンおよび1.2ml 植物保護培地(Phytotechnology)を含むM404(Phytotechnology)培地(ホルモン非含有培地)へと移した。植物が *Agrobacterium*非含有であるという証拠を、形質転換事象の幹および/もしくは葉の断片を、ニュートリエントブロス-酵母抽出物(NBY培地)上で2週間にわたって28においてインキュベートし(2回反復)、増生がなかったことによって得た。形質転換した植物を輸送し、生きている *Agrobacterium*がない場合にのみ圃場に植えた。上記方法の詳細は、他の箇所に記載される(Richaelら 2008)。

【0104】

*Agrobacterium*は、右側境界(RB)部位での切断において有効であるが、それはしばしば、DNA挿入物を、左側境界(LB)部位での切断によっても、そのプラスミドベクターから十分に放出し損なう(Gelvin 2003)。結論として、いくつかの感染した植物細胞が、DNA挿入物自体を、ならびに骨格マーカ-遺伝子、イソペンテニルトランスフェラーゼ(isopentenyl transferase)(ipt)を含むさらなるプラスミド骨格配列を、植物ホルモンであるサイトカイニン(これは、植物における生育および発生プロセスを一般に調節する)のために受容した。過剰発現は、矮化表現型、異常な葉、もしくはサイトカイニン過剰生成に起因して発根の不能を生じ、これらを、骨格DNAを含む植物に対して選択するために使用した(Richaelら 2008)。2週間毎に、感染した外植片を、いかなる合成ホルモンも欠いている新しい培地に移し、24において16時間の光周期の下で、Percival生育チャンバ中でインキュベートすると、これらが苗条を形成し始めた。多くの苗条は、ipt遺伝子を発現し、サイトカイニン過剰発現表現型を示した；これら苗条を廃棄し、さらなる分析には考慮しなかった。PCR遺伝子型決定によって、残っている苗条のうちの約0.3~1.5%は、DNA挿入物のうちの少なくとも一部を含むと同時に、ipt遺伝子を欠いていることが実証された。

【0105】

上記Russet Burbank W8事象は、異なるプラスミドによる2つの別個の形質転換に由来する挿入物を含む。第1の挿入物であるプラスミドpSIM1278は、塊茎において、最大4種のパレイショ遺伝子Asn1、Ppo5、R1、およびPhLをサイレンシングするように設計された逆方向反復から成る2つのカセットを含む。同様に、第2のプラスミドであるpSIM1678は、塊茎においてVINv遺伝子をサイレンシングするための逆方向反復から成ると同時に、そのネイティブパレイショプロモーターの下でRpi-vnt1遺伝子のコピーをも含むカセットを含む。

10

20

30

40

50

【0106】

事象W8を生成するためのpSIM1278およびpSIM1678によるRussett Burbankの形質転換と関連した上記挿入物の遺伝的および構造的性質決定は、両方の形質転換が、各プラスミドのための単一の組み込み部位を生じることを示した。pSIM1278の形質転換に由来するDNAの構造は、元の挿入物の構造に対して複雑であった。挿入されたDNAは、形質転換の間に再構成を受けたようであり、Asn1/Ppo5サイレンシングカセットのタンデムリピート、続いて、ほぼ完全なpSIM1278構築物、ならびにpR1/pPh1サイレンシングカセットの複製物を含む逆方向反復およびGbsプロモーターと介在Ph1配列とのタンデム複製物から成る構造を生じる。

10

【0107】

この構造は予期されているより複雑であるが、この複製されたサイレンシングカセットはインタクトであり、組織特異的プロモーターの制御下にあるままである。上記構造は、上記生成物の安全性もしくは形質効力(trait efficacy)に負の影響を与えない。

【0108】

W8はまた、組み込みの単一遺伝子座にあるpSIM1678に由来するDNAの単一コピーを含む。pSIM1678のDNA挿入物は、T-DNA左側境界全体およびRpivnt1プロモーターのうちの137bpを除去する330bp欠失を有するほぼインタクトなDNA挿入物を含む。上記プロモーターにおけるこの小さな欠失は、上記遺伝子が後期胴枯れ病抵抗性を付与する能力に影響を与えない。また、Rpivnt1遺伝子と関連するRNA発現を、RT-PCRを使用して実証した。

20

【0109】

実施例6．ベクター骨格DNAの非存在の証拠

以下の方法を使用して、プラスミドの骨格部分が、商業的目的で開発された事象に存在しないことを確立した：1)植物がプラスミド骨格中の陰性選択可能イソペンチルイソメラーゼ(ipit)マーカー遺伝子と関連する表現型を有する場合、それらを廃棄した；2)骨格DNAの非存在を、サザンブロットハイブリダイゼーションで確認した；3)PCRを使用して、上記骨格DNAの断片が存在しないことを確認した。まとめると、サザンブロットおよびPCR分析は、Russett Burbank W8事象が形質転換において使用されるいずれのプラスミドに由来する骨格をも含まないことを示した。

30

【0110】

実施例7．挿入されたDNAの安定性

細菌性T-DNAは、植物への挿入後に、常に安定なわけではない。予期される不安定率(0.5~5.9×10⁻⁴)は、減数分裂と関連し(Muellerら 1987; Connerら 1998)、これはパレイショに関連しない。なぜならパレイショは、植物性に再生するからである。従って、DNA挿入物は、安定であると予期される。種子よりむしろ塊茎を使用して、その後の世代を定義した。なぜなら商業的に植えられるものは塊茎であるからである。

【0111】

遺伝的安定性を、分子アッセイおよび表現型アッセイの両方を使用して評価した。挿入物の構造は、W8パレイショの3世代(G0~G3)にわたって単離したゲノムDNAのサザンブロット分析を使用して安定であると示されたのに対して、表現型安定性は、圃場生育塊茎の第2世代において、ポリフェノールオキシダーゼ活性を測定することによって評価した。この方法は、パレイショの切断表面にカテコールを適用した後にPPOサイレンシングの視覚的証拠を示す。これら研究を実行して、W8における望ましい遺伝的変化が上記形質を維持しながら複数のクローンサイクルにわたって安定なままであることを確保した。

40

【0112】

DNA挿入物の安定性を、サザンブロットを使用して、3連続のクローン世代(G1、G2、およびG3)を元の形質転換体(G0)に対して比較することによって評価した。

50

安定なDNA挿入物は、同じ構造を維持し、従って、上記植物の複数の世代にわたって同じ消化パターンを生じると予期される。W8事象における挿入物の安定性を試験するために、その消化パターンを、pSIM1278およびpSIM1678両方に由来する挿入物の領域にハイブリダイズする2つのプローブ（GBS1およびAGP）、ならびにpSIM1678挿入物に特異的な2つのプローブ（INVおよびVNT1）を使用して比較した。これらプローブがハイブリダイズする上記DNA配列は、パレイショゲノムの中に、ならびに、上記DNA挿入物（複数可）内に含まれるので、内因性バンドおよび挿入物特異的バンドの両方がサザンブロットにおいて予期される。

【0113】

全てのゲノムDNAサンプルを、制限酵素EcoRVで消化し、AGPもしくはGBS1のいずれかに特異的なプローブとハイブリダイズさせた。EcoRVを、これら研究のために選択した。なぜならそれは、両方の挿入物内で消化して、pSIM1278挿入物において推定されるサイズ（例えば、2.3 kb）の内部バンドを伴う特有のバンド形成パターンを提供するからである。W8の全てのサンプル間のバンド形成パターンは、両方のプローブに関して互いに同一であった。Russell Burbank対照に存在する複数のバンドは、W8においても見出されるが、W8は、pSIM1278挿入物およびpSIM1678挿入物に相当するバンドも含む。これらバンドは、分析されるW8の全世代の間で同様に一貫しており、このことは、両方の挿入物の遺伝的安定性を示す。

10

【0114】

第2の分析を、pSIM1678挿入物に特異的な2つのプローブを使用して行った。この分析のために、ゲノムDNAサンプルを、制限酵素XbaIで消化し、VNT1プローブおよびINVプローブとハイブリダイズさせた。XbaIを、これらの研究のための制限酵素として選択した。なぜならそれはpSIM1678を内部で消化し、既知のサイズ（例えば、INVプローブについては4.6 kb）のバンドを生じるからである。繰り返すと、内因性バンドおよび挿入物特異的バンドの両方を、分析した3世代の間で一貫したバンド形成パターンとともに検出した。遺伝的分析および表現型分析は、pSIM1278およびpSIM1678の両方の形質転換から生じる挿入が、3世代にわたって安定であることを示した。3世代にわたって実証された安定性を考慮すれば、安定性は、栄養繁殖のその後のサイクルの間で維持される可能性がある。

20

【0115】

実施例8．遺伝子サイレンシングの効力および組織特異性

サイレンシングを、サイレンシングのために標的化された遺伝子およびプロモーターに由来する配列を含む逆方向反復を導入することによって達成した。2本鎖RNA媒介型サイレンシングに關与する多くの並行経路が存在するものの、これら逆方向反復の転写は、ウイルス防御に關与する細胞機構によってプロセッシングされると考えられる（Fusaroら 2006）。W8パレイショは、3つの特有のカセットを含み、この3つのカセットは、合計5つの異なるパレイショ遺伝子に由来する配列を含む。pSIM1278構築物は、2つの遺伝子サイレンシングカセットから成る（図4、上の構築物を参照のこと）。1つのカセットは、2つの遺伝子、アスパラギンシンターゼ-1（Asn1）およびポリフェノールオキシダーゼ-5（Ppo5）に由来する配列の逆方向反復を含む。第2のカセットは、デンプン関連遺伝子R1（531 bp）およびホスホリラーゼ-L（PhL）（508 bp）のプロモーターに由来する配列を含む。最後のカセットは、pSIM1678構築物を通じて導入された。この構築物は、液胞インベルターゼ（VinV）遺伝子に由来する配列を含む逆方向反復を含む（図4、下の構築物を参照のこと）。

30

40

【0116】

3つ全てのサイレンシングカセットは、光合成活性組織および根と比較して、塊茎において非常に活性であるパレイショのAgp遺伝子およびGbsS遺伝子に由来する、十分に性質決定されかつ組織特異的なプロモーターの同じセットによって調節される（Nakatara 1994；Visserra 1991）。従って、発現および遺伝子サイレンシングは、塊茎において最も有効であり、塊茎に主に限定されると予期された。

50

【0117】

5つ全ての標的遺伝子の発現を、ノーザンブロット分析によって性質決定して、各カセットからの遺伝子サイレンシングの有効性を決定した。Asn1、Ppo5、およびVINvの口バスタなサイレンシングを、塊茎において観察した一方で、R1のサイレンシングは余り有効ではなかった(図5)。PhLのサイレンシングは、対照とW8サンプルとの間の測定可能な差異が観察されなかったので、無効と考えられた。同じpSIM1278構築物での他の事象において、塊茎におけるPhLおよびR1のプロモーターの部分的サイレンシングが観察された(Collinge and Clark 2013)。

【0118】

以前の研究は、Ppo遺伝子サイレンシングが、関連タンパク質の量をウェスタンブロット分析によって検出不能なレベルへと低下させることを示した(Llorenteら 2011)。同様に、R1遺伝子のサイレンシングが、デンプン顆粒に少なくとも部分的に結合される約160kDaタンパク質の蓄積を減少させた(Lorberthら 1998)。

【0119】

標的遺伝子発現を、他の植物組織において評価して、遺伝子サイレンシングの特異性を決定した。W8およびRusset Burbank対照の葉、幹、根、および花から単離されたRNAに対して同様にノーザンブロット分析を行った。図6、図7および図8に示されるように、Russet Burbank対照と比較して葉、幹、もしくは根において標的遺伝子のサイレンシングは存在しなかった。全ての転写物は、VINv遺伝子(これは、全ての葉および幹のサンプル(対照を含む)において弱く発現された)に相当するものを除いて、容易に検出可能であった。

【0120】

いくつかの標的サイレンシングが観察される塊茎以外の唯一の組織は、花のサンプル中にあった。これらサンプルは、Russet Burbank対照と比較してW8においてAsn1転写物のいくらかのサイレンシングを示した。これは、その組織においていくらかの発現の漏れ(leaky expression)に起因し得る(図9)。

【0121】

Russet Burbankへと導入してW8事象を生成した3つの遺伝子サイレンシングカセットのうち2つは、RNAi媒介型サイレンシングのためにそれらの標的転写物をサイレンシングするのに非常に有効であった。これら2つの構築物は、Asn1、Ppo5、およびVINvをW8の塊茎において効率的にサイレンシングした。塊茎へのサイレンシングの特異性は、RNAi機構によって生成されるsiRNAのいくつか(あるとすれば)が他の組織に拡がったかまたはそれらのレベルがそれら組織におけるRNAi応答を引き起こすためには不十分であったことを示す。塊茎以外でのサイレンシングの唯一の証拠は、Asn1のより低いレベルが観察された花にあったが、変化の大きさは、塊茎におけるより遙かに低かった。PhLおよびR1でのプロモーターサイレンシングストラテジーは、最小限の効果を有した。このことは、同じpSIM1278構築物を含む他の事象と一致した(Collinge and Clark 2013)。

【0122】

予期されるように、Asn1、Ppo5、およびVINvと関連したRNA転写物の低下した発現は、さらに裏付けられた。さらに、組成データおよび農業データは、有意なオフターゲット効果もしくは意図しないサイレンシングと関連するいかなる予測外の表現型も明らかにしなかった。例えば、塊茎におけるAsn1の強いサイレンシングは、アミノ酸アスパラギンの蓄積を制限するのに対して、葉もしくは幹におけるAsn1のサイレンシングは、生育および発生に有害に作用し得るが、これはそうではなかった。従って、RNAi応答は、有効かつ特異的であり、これらバレイショ遺伝子のサイレンシングが雑草性もしくは他の植物病虫害特徴に影響を及ぼすという徴候はない。

【0123】

実施例9．バレイショ栽培品種W8性質決定のまとめ

10

20

30

40

50

パレイシヨ変種W8は、後期胴枯れ病に対する抵抗性を増大させること、黒色斑傷に關与する酵素の発現を低減させること、及び反応物、すなわちアスパラギン及び還元糖の濃度を低下させることを通してアクリルアミドを低減することによる、品質を改善する、パレイシヨ産業のニーズに対処する。パレイシヨ変種W8を、パレイシヨ植物ゲノムに対してネイティブであり外来性DNA、アグロバクテリウムDNA、ウイルスマーカ―又はベクター骨格配列を含まない核酸配列によって形質転換した。加えて、農業研究を行い、本形質に關連する特徴を除いて従来対照と同じく生育した事象を確保した。

【0124】

農業特徴

農業試験を行って、Russet Burbank変種W8が、米国においてパレイシヨ生産の主要な地域を代表する複数の場所で生育させた場合に、対照Russet Burbankと比較して等価な表現型を有することを確認した。2012年および2013年に生育させたW8および対照の農業特徴、収量および等級特徴の評価のまとめは、表4および表5に示される。全体的に、結果は、これら特徴に關して、W8と対照との間に大きな差異はないことを確認する。以下の表4および表5において、第1列は、特徴を示し、第2列は、変種を示し、第3列は、試験した植物の数を示し、第4列は、特徴に關するLS平均値を示し、第5列は、p値を示し(太字および下線は、統計的有意差を示す)、第6列は、標準偏差(SD)を示し、第7列は、90%信頼区間(CI)を示し、第8列は、従来変種の平均値の範囲(CVR)を示す。表5において、揚げた塊茎細切り片の色を、USDA Munsellカラーチャートと比較した。ハイシュガー(high sugar)は、フレンチフライ(french fried potato)のMunsellカラーチャートと比較した場合に、最も濃い側面において、3番もしくはこれより濃い基調色(predominate color)を有する揚げ物細切り片(fry strip)を伴う塊茎のパーセンテージである。シュガーエンド(sugar ends)は、3番もしくはより濃い色を試験して、揚げ物細切り片の全幅に關して該細切り片の最も濃い側面において1/4インチ長もしくはこれより長い末端を有する該細切り片を伴う塊茎のパーセンテージである(USDA AMS 1969)。揚げ物0~揚げ物4は、最も濃い側面の基調色が、フレンチフライのMunsellカラーチャートと比較した場合に、それぞれ、0~4の色読み取りであると決定される揚げ物細切り片を伴う塊茎のパーセントである。従って、報告された数字は、Munsellチャートで0、1、2、3、もしくは4のスコアになる揚げ物のパーセンテージである。低くなるほど色はより良好、0が最良である。

10

20

30

【表 4】

表4

特徴	変種	N	平均	P値	SD	90% CI		CVR	
早期出現(%)	対照	41	61.5	.	14.8	57.1	64.9	0.0	93.1
	W8	40	39.5	0.0001	23.3	31.8	44.3		
最終出現(%)	対照	41	87.1	.	10.7	84.4	90.0	10.6	98.1
	W8	40	80.3	0.2060	20.2	74.4	85.1		
幹/植物(#)	対照	39	1.7	.	0.7	1.4	1.8	1.0	3.1
	W8	36	1.7	0.8868	0.7	1.4	1.8		
草勢 (1~5スケール)	対照	37	3.7	.	0.9	3.4	3.9	2.0	5.0
	W8	35	3.0	0.0065	0.8	2.8	3.2		
草丈(cm)	対照	41	45.1	.	14.0	42.7	50.0	31.8	71.6
	W8	38	40.4	0.0098	12.5	38.0	44.9		
つる乾燥 (Vine Desiccation) (%)	対照	37	44.0	.	29.3	37.0	53.3	3.8	100.0
	W8	35	35.5	0.1471	30.7	29.4	46.9		

10

20

【表5】

表5

特徴	変種	N	平均	P値	SD	90% CI		CVR	
全収量 (cwt/a)	対照	41	445.7	.	149.7	397.1	475.9	135.6	733.2
	W8	38	417.9	0.4080	165.4	360.8	451.3		
US#2 収量 (cwt/a)	対照	41	375.7	.	147.5	328.8	406.3	118.9	653.7
	W8	38	312.2	0.0506	144.1	264.2	343.1		
塊茎/植物(#)	対照	41	7.8	.	2.5	7.0	8.3	2.5	19.5
	W8	38	8.4	0.4657	3.2	7.2	8.9		
塊茎<4 oz (%)	対照	9	8.2	.	5.3	4.9	11.5	.	.
	W8	9	15.9	0.2434	6.9	11.7	20.2		
塊茎4~6 oz (%)	対照	41	18.5	.	8.6	16.5	21.0	4.6	41.1
	W8	41	20.5	0.3148	7.1	18.8	22.6		
塊茎 6~10 oz (%)	対照	41	31.1	.	8.7	28.9	33.5	15.3	41.2
	W8	41	28.6	0.3435	8.2	26.1	30.5		
塊茎 10~14 oz (%)	対照	41	19.0	.	8.4	16.7	21.1	1.0	26.8
	W8	41	14.0	0.0071	8.1	11.8	16.0		
塊茎 >14 oz (%)	対照	41	14.3	.	16.9	9.3	18.2	0.0	45.5
	W8	41	8.6	0.0554	11.0	5.8	11.5		
比重	対照	41	1.077	.	0.0	1.1	1.1	0.7	1.2
	W8	41	1.073	0.8058	0.0	1.1	1.1		
ハイシュガー (%)	対照	41	11.0	.	16.9	6.0	14.9	0.0	84.8
	W8	41	1.4	0.0337	7.3	0	3.4		
シュガーエンド (%)	対照	41	19.7	.	18.5	14.7	24.4	0.0	52.6
	W8	41	3.3	<0.0001	6.5	1.2	4.6		
揚げ物0	対照	32	76.5	.	30.9	67.2	85.7	0.0	100.0
	W8	32	94.9	0.0272	19.4	89.1	100.0		
揚げ物1	対照	32	2.9	.	10.5	0.0	6.0	0.0	29.7
	W8	32	1.5	0.6142	6.2	0.0	3.4		
揚げ物2	対照	32	9.9	.	18.9	4.3	15.6	0.0	28.4
	W8	32	1.7	0.0173	7.3	0.0	3.9		
揚げ物3	対照	32	1.9	.	3.7	0.8	3.0	0.0	23.1
	W8	32	0.8	0.4899	3.4	0.0	1.8		
揚げ物4	対照	32	6.3	.	14.8	1.8	10.7	0.0	79.7
	W8	32	1.0	0.2316	5.9	0.0	2.8		
全内部欠陥 (%)	対照	41	1.6	.	2.5	0.8	2.1	0.0	15.5
	W8	41	1.2	0.7205	2.2	0.6	1.8		

10

20

30

40

【0125】

パレイシヨ栽培品種W8についての表4および5に提示されたデータに基づき、非形質転換Russell Burbank変種とパレイシヨ栽培品種W8との間に、早期出現%およびシュガーエンド%を除いて、農業特徴、収量及び等級、並びに生態学的相互作用において、全体として主要な相違はないと結論した。従って、複数年データに基づき、Russell Burbank変種W8は、雑草性又は病虫害の潜在性の結果として、環境における残留性の有意な危険はない。

【0126】

50

後期胴枯れ病抵抗性

多くのパレイシヨ栽培品種は、後期胴枯れ病（真菌様卵菌病原体 *Phytophthora infestans* によって引き起こされる壊滅的な病気）に罹りやすい。パレイシヨの後期胴枯れ病は、急速に拡大し得かつ壊死し得る葉および幹上の黒色/褐色病変によって同定される。ひどい後期胴枯れ病の流行は、*P. infestans* が増殖し、宿主作物で急速に再生する場合に起こる。

【0127】

Rpi-vnt1として公知のパレイシヨ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子を、W8に付加したところ、成功裡に後期胴枯れ病抵抗性が付与された。後期胴枯れ病抵抗性の効力を実証するために、研究を、Russet Burbank変種W8および対照Russet Burbankの葉および塊茎の両方に接種することによって行った。

10

【0128】

試験期間の終わりに、各場所からの評価を取得し、以下の表6および7にまとめる。パレイシヨ後期胴枯れ病への葉の抵抗性の結果を、表6に示す。各株のサイトは、その地域で見出される株に依存して、US-8、US-22もしくはUS-23を含む異なる株接種物を有した。表6、第1列は、変種を示し、第2列は、LS平均%葉後期胴枯れ病感染を示し、第3列は、p値（ここでW8と対照との間の有意差は、太字および下線が付されている）を示し、第4列は、従来変種範囲（これは、従来変種の平均値の範囲である）を示す。

20

【表6】

表6

変種	平均%葉後期胴枯れ病感染	P値	CVR
対照	58.3	<0.0001	18.8 - 100
W8	0.50	.	.

【0129】

表6で示されるように、%葉後期胴枯れ病感染の有意な低下は、Russet Burbank対照と比較して、W8について検出された。このことは、パレイシヨ後期胴枯れ病抵抗性遺伝子がW8において後期胴枯れ病への抵抗性を付与し、葉において有効であるという結論を支持する。

30

【0130】

以下の表7は、%感染によって決定される場合、W8および対照の塊茎後期胴枯れ病感染率の結果を示す。表7、第1列は、後期胴枯れ病分離菌を示し、第2列は、変種を示し、第3列は、平均%後期胴枯れ病塊茎感染を示し、第4列は、P値（ここでW8と対照Russet Burbankとの間の有意差は、太字および下線を付している）を示す。

【表7】

表7

分離菌	変種	平均%後期胴枯れ病塊茎感染	P値
US-22	対照	100.0	.
US-22	W8	51.0	<0.0001
US-8	対照	67.0	.
US-8	W8	21.1	<0.0001

40

【0131】

表7で示されるように、塊茎における%後期胴枯れ病感染の有意な低下は、US-22分離菌およびUS-8分離菌の両方について対照と比較して、W8について検出された。

【0132】

黒色斑傷耐性

50

黒色斑傷は、損傷した塊茎に影響を与える変色であり、バレイショ産業における最も重要な品質問題の1つを表す。この状態は、損傷したプラスチドから細胞質へのポリフェノールオキシダーゼ (Ppo) の漏出の結果である。細胞質において、その酵素がポリフェノールを酸化し、次いで暗色の沈殿物を形成する。pSIM1278 DNA挿入物の2つのサイレンシングカセットのうちの一つは、ソナム・ベルコサム由来の2コピーのPpo5遺伝子の断片を、調節エレメントの間に逆向き反復として配置した。この逆向き反復の発現は、バレイショPpo5遺伝子のサイレンシングを誘発して、黒色斑傷の出現を有意に低減する。

【0133】

バレイショ栽培品種W8及び黒色斑傷に感受性である対照Russet Burbank変種の塊茎を、黒色斑傷耐性について、2つの方法でアッセイした。

10

【0134】

塊茎変色は、カテコールを含むフェノール類を酸化し、迅速に重合体化して色素を生じる化合物を生成する、ポリフェノールオキシダーゼの活性によって起こる。黒色斑傷耐性について試験する間接的な方法は、1mlのカテコール(25mM、50mM MOPS中、pH6.5)を塊茎の切断表面上にピペットで置き、暗褐色沈殿物のPpo依存型発生をモニタリングすることに基づく。暗褐色沈殿物のPpo依存型発生を、20分間後に評価した。バレイショ栽培品種W8についてのカテコールアッセイの結果を、図10に示す。図10に示されるように、Russet Burbank対照は、暗褐色に変色して黒色斑傷を示した。他方で、バレイショ栽培品種W8は、暗褐色に変色せず、このことは、W8が、非形質転換Russet Burbank対照よりも黒色斑傷に対し抵抗性であることを示し、低減した黒色斑形質の効力を支持する。

20

【0135】

傷耐性についてアッセイするための第2の方法は、PPO活性を酵素アッセイで測定することによるものであった。ドーパクロムへのL-DOPAの変換を、 $A_{474nm} \cdot \text{分}^{-1}$ を測定することによって経時的にモニターし、これを $\mu\text{mol} \cdot \text{分}^{-1} \cdot \text{mg dw 塊茎}^{-1}$ の単位へと変換した。表8に示されるように、酵素アッセイは、W8がRusset Burbank対照と比較した場合に、PPO活性において90%減少を有することを示す($0.025 \mu\text{mol} \cdot \text{分}^{-1} \cdot \text{mg dw 塊茎}^{-1}$)。W8塊茎において低下した活性は、Ppo5遺伝子のサイレンシングを通じて低下した黒色斑と関連した。

30

【表8】

表8

変種	PPO 活性 ($\mu\text{mol} \cdot \text{分}^{-1} \cdot \text{mg dw 塊茎}^{-1}$)
Russet Burbank W8	0.0018
Russet Burbank control	0.0258

【0136】

アスパラギンおよびアクリルアミドレベル

40

バレイショ栽培品種W8の塊茎は、より少ない遊離アスパラギンを含んだが、表9に示されるように、収穫時では、対照よりも多くのアスパラギン酸、グルタミンおよびグルタミン酸を含んだ。W8に関する遊離アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミンおよびグルタミン酸の平均値は、全て許容区間(tolerance interval)内であり、文献の範囲を併せ持ち、従って、バレイショの正常範囲内と考えられた。表9、第1列は、mg/100gでアミノ酸を示し、第2列は、変種を示し、第3列は、LS平均を示し、第4列は、P値を示し(ここでW8と対照Russet Burbankとの間の有意差は、太字および下線を付している)、第5列は、試験した植物数を示し、第6列は、範囲を示し、第7列は、許容区間の範囲(TI)を示し、第8列は、Davies (1977)、Shepherdら (2010)およびLisinska and Le

50

s z c z y n s k i (1 9 8 9) から採用された、合わされた文献範囲 (C L R) を示す。

【表 9】

表9

化合物	変種	平均	P値	N	範囲		TI		CLR	
					最小	最大	最小	最大	最小	最大
アスパラギン (mg/100g)	W8	87.8	<u><0.0001</u>	41	62.1	140
	Burbank	300	.	41	198	469	60.0	482	31.2	698
アスパラギン酸 (mg/100g)	W8	45.2	<u>0.0032</u>	41	32.8	63.9
	Burbank	40.4	.	41	27.9	52.7	12.6	72.8	6.4	75.2
グルタミン (mg/100g)	W8	252	<u><0.0001</u>	41	203	335
	Burbank	139	.	41	95.7	198	23.3	260	44.0	540
グルタミン酸 (mg/100g)	W8	51.3	<u><0.0001</u>	41	27.9	75.5
	Burbank	40.8	.	41	26.0	72.0	10.2	80.3	45.0	74.2

10

20

【 0 1 3 7 】

低下したアスパラギン、フルクトースおよびグルコースレベルは、それらがアクリルアミドの形成における反応物であることから、加工バレイショ製品中のアクリルアミドの全体的な低減をもたらす。アクリルアミドを低減するという効力を実証するために、W8および対照 Russet Burbankの圃場生育塊茎を、収穫時に、ならびに通常貯蔵温度(46°F)および低温貯蔵温度(38°F)での3ヶ月間、6ヶ月間および9ヶ月間の貯蔵後に分析した。その結果を、表10および表11に示す。アクリルアミドについて試験する前に、W8および対照 Russet Burbankを、フレンチフライにした。表10は、収穫時および46°Fでの貯蔵後のフレンチフライアクリルアミドレベルをパートパーピリオン(ppb)で示す。表11は、収穫時および38°Fでの貯蔵後のフレンチフライアクリルアミドレベルをパートパーピリオン(ppb)で示す。表10および表11、第1列は、試験を行ったときのタイミングを示し、第2列は、化合物を示し、第3列は、変種を示し、第4列は、LS平均アクリルアミドレベルをppbで示し、第5列は、P値(ここでW8と対照との間の有意差は、太字および下線を付される)を示し、第6列は、同じ貯蔵時間での対照と比較したアクリルアミドの%低下を示し、第7列は、試験した塊茎の数を示し、第8列は、アクリルアミドの範囲をppbで示し、第9列は、許容区間(TI)を示す。

30

【表 10】

表10

タイミング	化合物	変種	平均(ppb)	P値	%低下	N	範囲(ppb)		TI(ppb)	
							最小	最大	最小	最大
新鮮	アクリルアミド	W8	75.3	<u><0.0001</u>	85.0	41	32.7	185	10.0	1035
		Burbank	503	.	.	41	229	971		
46°Fで3ヶ月目	アクリルアミド	W8	86.1	<u><0.0001</u>	80.9	9	74.5	94.3	10.0	599
		Burbank	450	.	.	9	393	514		
46°Fで6ヶ月目	アクリルアミド	W8	68.3	<u>0.0011</u>	83.7	9	50.4	96.2	10.0	688
		Burbank	420	.	.	9	330	528		
46°Fで9ヶ月目	アクリルアミド	W8	115	<u>0.0013</u>	78.2	9	90.7	156	10.0	1047
		Burbank	528	.	.	9	429	740		

40

50

【表 1 1】

表11

タイミング	化合物	変種	平均 (ppb)	P値	%低下	N	範囲(ppb)		TI(ppb)	
							最小	最大	最小	最大
38°Fで6ヶ月目	アクリルアミド	W8	203	<u><0.0001</u>	86.2	3	199	207	1155	1792
		Burbank	1473	.	.	3	1450	1500		
38°Fで9ヶ月目	アクリルアミド	W8	212	<u><0.0001</u>	90.8	3	201	234	761	3839
		Burbank	2300	.	.	3	2160	2380		

【 0 1 3 8 】

10

表 1 0 に示されるように、収穫時点では、W 8 塊茎で作ったフレンチフライは、対照 R u s s e t B u r b a n k より 8 5 % 低いアクリルアミドを含んだ。バレイショを 4 6 ° F で 9 ヶ月間ずっと貯蔵した場合、W 8 におけるアクリルアミドレベルは、対照 R u s s e t B u r b a n k より 7 8 % ~ 8 3 . 7 % 低かった。表 1 1 に示されるように、3 8 ° F で 6 ~ 9 ヶ月間貯蔵した後の W 8 フレンチフライにおけるアクリルアミドレベルは、一貫して対照より遙かに低かった。

【 0 1 3 9 】

還元糖およびインベルターゼサイレンシング

バレイショ栽培品種 W 8 は、複数の機構によって塊茎中の還元糖のレベルを低くし得る発現カセットを含む。p S I M 1 2 7 8 での形質転換を通じて、デンブン関連遺伝子 (R 1) およびホスホリラゼ - L 遺伝子 (P h L) のプロモーターのサイレンシングカセットを導入したのに対して、p S I M 1 6 7 8 での形質転換は、インベルターゼ遺伝子のサイレンシングカセットを導入した (Y e r a 2 0 1 0) 。一緒になると、これら形質は、デンブンおよびスクロースを還元糖 (グルコースおよびフルクトース) へ変換するのを遅らせることによって機能する。R 1 および P h L のサイレンシングは、収穫の 1 ヶ月後に分析した場合に、低下した還元糖レベルを生じた (C o l l i n g e a n d C l a r k 2 0 1 3) が、還元糖の大きな低下は、インベルターゼサイレンシングに関連するようである。R 1 、 P h L 、 および V I n v をサイレンシングすることの全体的な利益は、改善された品質 (特に、色のコントロールに関する) を含み、従って、大部分のフレンチフライもしくはチップスの消費者が要求する望ましい金褐色に寄与する。また、還元糖は、アミノ酸 (例えば、アスパラギン) と反応して、アクリルアミドを含むメイラード産物を生じる。

20

30

【 0 1 4 0 】

p S I M 1 6 7 8 における V I n v 遺伝子サイレンシングカセットは、液胞インベルターゼ (スクロースをグルコースおよびフルクトースへと変換する酵素) の低下したレベルを生じる。インベルターゼのレベルがバレイショにおいて低下される場合、還元糖であるグルコースおよびフルクトースは、スクロースが増大する間の貯蔵中に、特に、フレンチフライ用バレイショのために 4 6 ~ 4 8 ° F の代表的貯蔵温度より低く保持される場合に、低レベルのままである。インベルターゼ活性について試験する前に、塊茎を、3 9 ° F で 1 ヶ月間貯蔵した。W 8 および R u s s e t B u r b a n k 対照の各々について 3 つの複製物を、アッセイのために使用し、活性を、n m o l / 分 / g m 塊茎の単位でグルコースの蓄積によって測定した。表 1 2 に示されるように、W 8 は、対照 R u s s e t B u r b a n k と比較して、低温貯蔵塊茎の液胞インベルターゼ活性において 8 5 % 低下を有した。W 8 塊茎におけるこの低下した液胞インベルターゼ活性は、表 1 3 および表 1 4 に示されるように、V I n v 遺伝子からの低下した R N A 蓄積および還元糖であるグルコースおよびフルクトースの低レベルと関連する。

40

【表 1 2】

表12

変種	インペルターゼ活性 (nmole glu/分/mg 塊茎)	%低下
Russet Burbank W8	1.37	85%
Russet Burbank対照	8.86	

【0141】

長期の低温貯蔵は、フレンチフライおよびポテトチップスへと通年で加工するための高品質パレイショの適切な供給を維持するために必要であるが、低温誘導甘味 (cold-induced sweetening) (CIS) をもたらす。CISは、高温で加工されるパレイショ製品において望ましくない副作用 (風味の変化、望ましくない濃い色およびアクリルアミドの上昇した量が挙げられる) を引き起こす。液胞酸インペルターゼ (VInv) は、非常に低温で貯蔵された塊茎においてグルコースおよびフルクトースの量を増大させるにあたって、CISプロセスにおいて極めて重要な酵素である (Zrennerら 1996)。W8は、VInv遺伝子の抑制された発現を有し、従って、Russet Burbank対照と比較して、低温貯蔵において低下したグルコースおよびフルクトースレベルならびに低いCISを有する。低下した還元糖をもたらす形質の効力を実証するために、W8および非形質転換対照の圃場生育塊茎を、収穫時、ならびに通常貯蔵温度 (46 °F) および低温貯蔵温度 (38 °F) で分析した。

10

20

【0142】

還元糖であるグルコースとフルクトース、および非還元糖であるスクロースを、収穫時に、ならびにその後貯蔵の3ヶ月後、6ヶ月後および9ヶ月後に、W8において試験した。2つの異なる貯蔵温度を使用した (46 °F (これは、冷凍フレンチフライに予定されたRusset Burbankパレイショに代表的には使用される)、および38 °F (おそらく還元糖の高いレベルなしによりよい品質を可能にするVInvのサイレンシングによって可能にされる低温))。収穫時、ならびに全ての貯蔵時点および温度においては、W8塊茎は、表13および表14に示されるように、対照と比較して、還元糖フルクトースおよびグルコースの低レベルを含んだ。収穫時のW8の全ての糖の値は、許容区間内であった。これは、対照と組成上等しいことを示す。表13は、収穫時ならびに46 °Fで3ヶ月間、6ヶ月間もしくは9ヶ月間貯蔵した後のフルクトース+グルコースおよびスクロースに関するパレイショ糖レベルを示し、表14は、38 °Fで6ヶ月間もしくは9ヶ月間貯蔵した場合のフルクトース+グルコースおよびスクロースに関するパレイショ糖レベルを示す。表13および表14、第1列は、試験を行ったときのタイミングを示し、第2列は、変種を示し、第3列は、mg / 100gでLS平均糖レベルを示し、第4列は、P値を示し (ここでW8と対照との間の有意差は、太字および下線で示される)、第5列は、試験した塊茎の数を示し、第6列は、mg / 100gで糖の範囲を示し、第7列は、許容区間 (TI) を示す。

30

【表 1 3】

表13

タイミング	変種	平均	P値	N	範囲		TI	
					最小	最大	最小	最大
フルクトース + グルコース (mg/100g)								
新鮮	W8	38.4	<u>0.0002</u>	41	9.68	106	1.00	424
	対照	146	.	41	14.0	406		
46°Fで3ヶ月目	W8	122	<u>0.0056</u>	9	54.1	210	1.00	996
	対照	483	.	9	298	598		
46°Fで6ヶ月目	W8	116	<u><0.0001</u>	9	20.8	310	1.00	640
	対照	261	.	9	153	459		
46°Fで9ヶ月目	W8	106	<u>0.032</u>	9	79.7	160	1.00	648
	対照	224	.	9	105	372		
スクロース(mg/100g)								
新鮮	W8	395	<u><0.0001</u>	41	161	775	1.00	512
	対照	241	.	41	113	558		
46°Fで3ヶ月目	W8	651	<u><0.0001</u>	9	520	738	1.00	1125
	対照	148	.	9	56.2	228		
46°Fで6ヶ月目	W8	202	<u>0.0021</u>	9	177	229	1.00	345
	対照	97.6	.	9	80.1	144		
46°Fで9ヶ月目	W8	146	<u><0.0001</u>	9	105	201	10.4	103
	対照	56.9	.	9	44.8	77.3		

10

20

【表 1 4】

表14

タイミング	変種	平均	P値	N	範囲		TI	
					最小	最大	最小	最大
フルクトース + グルコース(mg/100g)								
38°Fで6ヶ月目	W8	91.7	<u>0.0002</u>	3	83.7	97.4	1.00	1586
	対照	640	.	3	590	726		
38°Fで9ヶ月目	W8	151	<u><0.0001</u>	3	102	188	183	1586
	対照	754	.	3	703	788		
スクロース(mg/100g)								
38°Fで6ヶ月目	W8	963	<u><0.0001</u>	3	945	986	1.00	661
	Burbank	182	.	3	138	206		
38°Fで9ヶ月目	W8	645	<u><0.0001</u>	3	598	714	1.00	325
	Burbank	152	.	3	137	163		

30

40

【 0 1 4 3】

表 1 3 および表 1 4 に示されるように、全ての W 8 塊茎は、収穫時、ならびに 3 8 ° F および 4 6 ° F の両方での複数の貯蔵時点後に、対照サンプルより多くのスクロースを含んだ。W 8 における V I n v 遺伝子のサイレンシングの結果は、還元糖のより低いレベルおよびスクロースのより高いレベルである。これら変化は、収穫の時点で、および 9 ヶ月までの貯蔵期間全体を通して観察される。W 8 における還元糖は、貯蔵時間とともに増大するが、R u s s e t B u r b a n k 対照より一貫して低いままである。還元糖のより遙かに低いレベルが、3 8 ° F で貯蔵し場合に、対照と比較して W 8 において観察された。このことは、低温貯蔵が、W 8 に関して実現可能であることを示唆する。全ての場合において、還元糖における有意な減少は、スクロースのより高いレベルと結びつけられる。低温貯蔵が、呼吸に由来するより小さな収縮を生じるが、疾患に由来する喪失も低

50

減することが予期される。

【0144】

Russet Burbankパレイショ栽培品種W8は、後期胴枯れ病への増大した抵抗性、黒色斑の原因となる酵素の低下した発現、低下したアスパラギンを介する低下したアクリルアミドおよび還元糖の低下したレベルを有することによって、品質を改善するパレイショ産業の必要性に対処する。

【0145】

本発明のさらなる実施形態

上記の有利な特徴を組み合わせるパレイショ変種をもたらす研究は、主に経験的である。この研究は、大きな投資時間 (investment of time)、労力及び費用を必要とする。パレイショ栽培品種の開発は、しばしば、温室から商用利用までに、8年以上もの時間を費やす。繁殖は、最も重要な特徴を子孫に組み入れるための、優れた親の注意深い選択によって始まる。全ての所望の形質は、通常、1回の交配によって現れることはないので、繁殖は、必ず累積的になる。

10

【0146】

現在の繁殖技術は、親クローンの制御された授粉によって続けられる。代表的には、花粉をゼラチンカプセル内に集め、後に雌親の授粉に使用する。ハイブリッド種子を、温室内に撒き、数千もの個々の苗から塊茎を収穫し、保持する。翌年、各々得られた苗からの1~4個の塊茎を、野外に植え付け、ここでは、ウイルス及び病気の蔓延を回避しよう、細心の注意を払う。この第1年苗収穫物から、選択プロセスを生き抜いた各ハイブリッド個体からの数個の「種」塊茎を、翌年の植え付けのために保持する。第2年の後に、密度測定及び揚げ物試験のためにサンプルを採取し、商用利用のための塊茎の好適性を決定する。この時点までの選択プロセスを生き延びた植物を、次いで、より包括的な一連の揚げ物試験及び密度決定のために、第3年により大きな容量で植える。開発段階第4年に、選択を生き延びたものを幾つかの州 (several states) で野外試験に供し、異なる生育条件に対するその適合性を決定する。やがては、優れた品質を有する変種を、他の農場に移し、市場規模に種子を増やす。一般に、この時点までに、8年以上の作付、収穫及び試験を調査し、新規且つ改善されたパレイショ栽培品種を開発することを企図する。

20

【0147】

特定のタンパク質生成物をコードする遺伝子の単離及び性質決定を可能にした分子生物学技術の出現により、植物生物学分野における科学者らは、特定の様式で植物の形質を変化させるため、植物のゲノムを、外来性遺伝子又は、ネイティブもしくは内因性の遺伝子のさらなるバージョン若しくは改変されたバージョン (恐らくは、異なるプロモーターによって駆動される) を含んで発現するように操作することに、強い関心を持つようになった。このような外来性のさらなるおよび/もしくは改変された遺伝子は、本明細書中で、集合的に、「トランスジーン」と呼ばれる。ここ15~20年にわたり、トランスジェニック植物を産生するための幾つかの方法が開発されてきており、本発明もまた、詳細な実施形態において、特許請求した変種又は系統の形質転換バージョンに関する。

30

【0148】

植物形質転換は、植物細胞において機能する発現ベクターの構築を含む。このようなベクターは、調節配列 (例えば、プロモーター) の制御下の、又は調節配列に作用的に連結した遺伝子を含むDNAを含む。発現ベクターは、1つもしくはそれより多くのこのような作動可能に連結した遺伝子/調節エレメント組み合わせを含み得る。(単数又は複数の) ベクターは、プラスミドの形態であってもよく、単独で用いるか、又は他のプラスミドと組み合わせて用い、以下に記載されるような、トランスジーンをパレイショ植物 (複数可) の遺伝物質内に組み入れる形質転換方法を用いて、形質転換パレイショ植物を提供することができる。

40

【0149】

従来型植物繁殖は、代表的に、新規且つ改善された特徴を有する変種を作製するための、植物染色体の無作為組換えに依存する。標準的な周知の技術に従い、遺伝子及び調節工

50

レメントを含む遺伝子「発現カセット」を、アグロバクテリウムの単離された運搬DNA（「T-DNA」）の境界内に挿入し、植物ゲノム内に組み込む。T-DNA材料のアグロバクテリウム媒介型移入は、代表的に、以下の標準的手順を含む：（１）そのうちの少なくとも１つが外来性起源である遺伝子エレメントのインビトロ組換えにより、形質転換の選択のための発現カセットを産生すること、（２）この発現カセットを、しばしば、外来性DNAを含む少なくとも１つの他の発現カセット共に、T-DNA境界配列によって隣接されるアグロバクテリウムDNAの通常数百塩基対から成るバイナリーベクターのT-DNA領域内に挿入すること、（３）しばしば、アグロバクテリウム由来のさらなるバイナリーベクター配列の幾つか又は全てを伴い、T-DNA境界の間に位置する配列を、植物細胞内に移入すること、並びに（４）所望の形質、例えば、収量の増加、成長力の改善、病気及び昆虫に対する抵抗性の増強、又はストレス下で生存する能力の増強を示す、安定的に形質転換した植物細胞を選択すること。

10

【0150】

従って、遺伝子操作方法は、外来性の、非固有の、プロモーター及びターミネーターなどの調節エレメントを含む核酸、並びに新規な形質の発現に關与するか又は形質転換体のウイルス、細菌及び植物からの同定及び選択のためのマーカーとしての機能する遺伝子の導入に依存する。マーカー遺伝子は、代表的に、細菌供給源に由来し、抗生物質抵抗性又は除草剤抵抗性を付与する。古典的繁殖方法は、骨が折れ、時間がかかり、新しい変種は、代表的に、比較的穏やかな改善しか示さない。

20

【0151】

「アンチセンス」技術において、ネイティブの遺伝子の配列は、逆向きにされて、トランスジェニック植物における遺伝子の発現をサイレンシングする。しかし、逆向きDNAは、通常、プロモーターとターミネーターとの間に挿入された新規且つ性質決定されていないオープンリーディングフレームを含み、該フレームは、植物の発育に干渉し、かつ/又は栄養的価値を減じるので、所望されない場合がある、外来性アミノ酸配列をコードする。

【0152】

パレイショ形質転換のための発現ベクター：マーカー遺伝子

発現ベクターは、調節エレメント（例えば、プロモーター）に作動可能に連結した少なくとも１つの遺伝子マーカーを含み、該マーカーは、陰性選択、すなわち、選択的マーカー遺伝子を含まない細胞の成長の阻害によって又は陽性選択、すなわち、遺伝子マーカーによってコードされる産物についてのスクリーニングによってのいずれかで、回収される。多くの、植物形質転換のために一般的に使用される選択可能マーカー遺伝子は、形質転換分野において周知であり、例えば、抗生物質又は除草剤であり得る選択的化学薬剤を代謝的に解毒する酵素をコードする遺伝子、又は阻害剤に非感受性である改変された標的をコードする遺伝子を含む。幾つかの陽性選択方法もまた、当該分野で公知である。

30

【0153】

植物形質転換のための、１つの一般に使用される選択可能マーカーは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（nptII）遺伝子であり、これは、植物調節シグナルの制御下にある場合、カナマイシンに対する抵抗性を付与する。Fraleyleら、Proc Natl Acad Sci U S A, 80:4803 (1983)。別の一般に使用される選択可能マーカー遺伝子は、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を付与する、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子である。Vanden Elzenら、Plant Mol Biol, 5:299 (1985)。

40

【0154】

抗生物質に対する抵抗性を付与する細菌起源のさらなる選択可能マーカー遺伝子は、ゲンタマイシンアセチルトランスフェラーゼ、ストレプトマイシンホスホトランスフェラーゼ及びブレオマイシン抵抗性決定因子であるアミノグリコシド-3'-アデニルトランスフェラーゼが挙げられる。Hayfordら、Plant Physiol, 86:1216 (1988), Jonesら、Mol Gen Genet, 210:86 (19

50

87), Svabら, *Plant Mol. Biol.* 14:197(1990) Hill
leら, *Plant Mol. Biol.* 7:171(1986)。他の選択可能マー
カー遺伝子は、グリホサート、グルホシネート又はプロモキシニルなどの除草剤に対する抵
抗性を付与する。Comairら, *Nature* 317:741~744(1985),
Gordon-Kammら, *Plant Cell* 2:603~618(1990)及
びStalkerら, *Science* 242:419~423(1988)。

【0155】

細菌起源でない植物形質転換のための選択可能マーカー遺伝子としては、例えば、マウ
スジヒドロ葉酸レダクターゼ、植物5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェート
シンターゼ及び植物アセトラクテートシンターゼが挙げられる。Eichholtzら, 10
Somatic Cell Mol. Genet. 13:67(1987), Shahら
, *Science* 233:478(1986), Charestら, *Plant Ce
ll Rep.* 8:643(1990)。

【0156】

植物形質転換のための別のクラスのマーカー遺伝子は、抗生物質などの毒性物質に対す
る抵抗性のための形質転換細胞の直接的な遺伝子選択よりもむしろ、推定形質転換植物細
胞のスクリーニングを必要とする。これらの遺伝子は、特定の組織における遺伝子の発現
を定量するか、又はその発現の空間的パターンを可視化するのに特に有用であり、常習的
にレポーター遺伝子と呼ばれる。何故なら、これらは、遺伝子発現の調査のために、遺伝
子又は遺伝子調節配列に融合し得るからである。推定形質転換細胞をスクリーニングする 20
ための、一般的に使用される遺伝子としては、
- グルクロニダーゼ(GUS)、
- ガ
ラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ及びクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ
が挙げられる。Jefferson, R.A., *Plant Mol. Biol. Rep*
. 5:387(1987), Teeriら, *EMBO J.* 8:343(1989), K
onczら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:131(1987
) , DeBlockら, *EMBO J.* 3:1681(1984)。

【0157】

植物組織の破壊を必要としない、GUS活性を可視化するためのインビボ方法が、利用
可能である。Molecular Probes publication 2908,
IMAGENE GREEN, p. 1~4(1993)及びNalewayら, *J. Ce
ll Biol.* 115:151a(1991)。しかし、GUS活性を可視化するため
のこれらのインビボ方法は、低い感度、高い蛍光バックグラウンド、及び選択可能マー
カーとしてのルシフェラーゼ遺伝子の使用に関連する制限ゆえに、形質転換細胞を回収する
ために有用であることが証明されていない。

【0158】

より近年、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子が、原核細胞及び真核細
胞における遺伝子発現のマーカーとして、利用されている。Chalfieら, *Scie
nce* 263:802(1994)。GFP及びGFPの変異体は、スクリーニング可
能マーカーとして使用され得る。

【0159】

パレイショ形質転換のための発現ベクター：プロモーター

発現ベクター内に含まれる遺伝子は、調節エレメント、例えばプロモーターを含むヌク
レオチド配列によって駆動されなければならない。幾つかの種類のプロモーターが、単独
で又はプロモーターと組み合わせて使用され得る他の調節エレメントと同じく、形質転換
分野で周知である。

【0160】

本明細書中で使用される場合、「プロモーター」は、転写の開始から上流のDNA領域
であって、RNAポリメラーゼ及び転写を開始する他のタンパク質の認識及び結合に関与
する領域に対する言及を含む。「植物プロモーター」は、植物細胞における転写を開始可
能であるプロモーターである。発生制御下のプロモーターの例としては、特定の組織、例 40

10

20

30

40

50

えば、葉、根、種子、繊維、木部道管、仮道管又は厚壁組織において優先的に転写を開始するプロモーターが挙げられる。このようなプロモーターは、「組織好適」と呼ばれる。特定の組織においてのみ転写を開始するプロモーターは、「組織特異的」と呼ばれる。「細胞型」特異的プロモーターは、主に、1つもしくはそれより多くの器官の特定の細胞型、例えば、根又は葉における脈管細胞において、発現を駆動する。「誘導型」プロモーターは、環境制御下にあるプロモーターである。誘導型プロモーターによる転写に作用し得る環境条件の例としては、嫌気条件又は光の存在が挙げられる。組織特異的、組織好適、細胞型特異的及び誘導型のプロモーターは、「非構成的」プロモーターのクラスを構成する。「構成的」プロモーターは、殆どの環境条件下で活性であるプロモーターである。

【0161】

A. 誘導型プロモーター

誘導型プロモーターは、パレイショにおける発現のための、遺伝子に作動可能に連結される。場合により、誘導型プロモーターは、パレイショにおける発現のための遺伝子に作動可能に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列に、作動可能に連結される。誘導型プロモーターにより、転写の速度が、誘導剤に応答して増加する。

【0162】

任意の誘導型プロモーターが、本発明において使用され得る。Wardら, *Plant Mol. Biol.* 22:361~366 (1993)を参照されたい。誘導型プロモーターの例としては、銅に応答するACEI系由来のもの(Mettら, *PNAS* 90:4567~4571 (1993));ベンゼンスルホンアミド除草剤毒性軽減剤に
 20
 応答するトウモロコシ由来のIn2遺伝子(Hersheyら, *Mol. Gen. Genetics* 227:229~237 (1991)及びGatzら, *Mol. Gen. Genetics* 243:32~38 (1994))、又はTn10由来のTetリプレッサー(Gatzら, *Mol. Gen. Genetics* 227:229~237 (1991))が挙げられるがそれらに限定されない。特に好ましい誘導型プロモーターは、通常は植物が応答しない誘導剤に
 30
 応答するプロモーターである。例示的な誘導型プロモーターは、ステロイドホルモン遺伝子からの誘導型プロモーターであり、その転写活性は、グルココルチコステロイドホルモンによって誘導される。Schenarら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:0421 (1991)。

【0163】

B. 構成的プロモーター

構成的プロモーターは、パレイショにおける発現のための遺伝子に作動可能に連結されるか、又は構成的プロモーターは、パレイショにおける発現のための遺伝子に作動可能に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列に、作動可能に連結される。

【0164】

多くの異なる構成的プロモーターが、本発明において利用され得る。例示的な構成的プロモーターとしては、植物ウイルス由来のプロモーター、例えば、CaMV由来の35S
 40
 プロモーター(Odelら, *Nature* 313:810~812 (1985))及びコメアクチン(McElroyら, *Plant Cell* 2:163~171 (1990));ユビキチン(Christensenら, *Plant Mol. Biol.* 12:619~632 (1989)及びChristensenら, *Plant Mol. Biol.* 18:675~689 (1992));pEMU(Lastら, *Theor. Appl. Genet.* 81:581~588 (1991));MAS(Veltenら, *EMBO J.* 3:2723~2730 (1984))及びトウモロコシH3ヒストン(Lepetitら, *Mol. Gen. Genetics* 231:276~285 (1992)及びAtanassovaら, *Plant Journal* 2(3):291~300 (1992))などの遺伝子に由来するプロモーターが挙げられるがそれらに限定されない。

【0165】

Brassica napus ALS3構造遺伝子に対し5'側であるALSプロモーター、Xb

10

20

30

40

50

a 1 / N c o l 断片 (又はこの X b a 1 / N c o l 断片に類似したヌクレオチド配列) は、特に有用な構成的プロモーターを表す。P C T 出願 W O 9 6 / 3 0 5 3 0 を参照されたい。

【 0 1 6 6 】

C . 組織特異的又は組織好適プロモーター

組織特異的プロモーターは、パレイショにおける発現のための、遺伝子に作動可能に連結される。場合により、組織特異的プロモーターは、パレイショにおける発現のための遺伝子に作動可能に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列に、作動可能に連結される。組織特異的プロモーターに作動可能に連結した目的の遺伝子によって形質転換された植物は、特異的組織において、トランスジーンのプロモーター産物を、独占的に又は優先的に産生する。

10

【 0 1 6 7 】

組織特異的又は組織好適プロモーターのいずれかは、本発明において利用され得る。例示的な組織特異的又は組織好適プロモーターとしては、ファゼオリン遺伝子由来のものなどの根好適プロモーター (Muraiら, Science 23: 476 ~ 482 (1983)) 及び Sengupta-Gopalanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3320 ~ 3324 (1985); cab 又は rubisco 由来のものなどの葉特異的及び光誘導型プロモーター (Simpsonら, EMBO J. 4 (11): 2723 ~ 2729 (1985)) 及び Timkoら, Nature 318: 579 ~ 582 (1985); LAT52 由来のものなどの葯特異的プロモーター (Twelleyら, Mol. Gen. Genetics 217: 240 ~ 245 (1989)); Zm13 由来のものなどの花粉特異的プロモーター (Guerreroら, Mol. Gen. Genetics 244: 161 ~ 168 (1993)) 又は apg 由来のものなどの小孢子好適プロモーター (Twelleyら, Sex. Plant Reprod. 6: 217 ~ 224 (1993)) が挙げられるがそれらに限定されない。

20

【 0 1 6 8 】

タンパク質を細胞内区画に標的化するためのシグナル配列

トランスジーンによって産生されたタンパク質の葉緑体、液胞、ペルオキシソーム、グリオキシソーム、細胞壁若しくはミトコンドリアなどの細胞内区画への輸送、又はアポプラストへの分泌のための輸送は、目的のタンパク質をコードする遺伝子の 5' 及び / 又は 3' 領域への、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列の作動可能な連結によって達成される。構造遺伝子の 5' 及び / 又は 3' 末端における配列の標的化は、タンパク質合成及びプロセッシングの間に、コードされたタンパク質が最終的に区画化される場所を決定し得る。

30

【 0 1 6 9 】

シグナル配列の存在は、ポリペプチドを、細胞内小器官若しくは細胞内区画、又はアポプラストへの分泌について、方向づける。多くのシグナル配列が、当該分野で公知である。例えば、Beckerら, Plant Mol. Biol. 20: 49 (1992); Close, P. S., Master's Thesis, Iowa State University (1993); Knox, C., ら, Plant Mol. Biol. 9: 3 ~ 17 (1987); Lernerら, Plant Physiol. 91: 124 ~ 129 (1989); Frontesら, Plant Cell 3: 483 ~ 496 (1991); Matsuokaら, Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 834 (1991); Gouldら, J. Cell. Biol. 108: 1657 (1989); Creissenら, Plant J. 2: 129 (1991); Kalderon, ら, Cell 39: 499 ~ 509 (1984); Steifel, ら, Plant Cell 2: 785 ~ 793 (1990) を参照されたい。

40

【 0 1 7 0 】

外来性タンパク質遺伝子及び農業用遺伝子

本発明に従うトランスジェニック植物により、外来性タンパク質が、商業的量で産生さ

50

れ得る。従って、形質転換植物の選択及び増殖のための、当該分野で周知の技術は、複数のトランスジェニック植物を生じ、これは、従来様式で収穫され、次いで、外来性タンパク質が、目的の組織又はバイオマス全体から抽出され得る。植物バイオマスからのタンパク質抽出は、例えば、以下によって議論される公知の方法によって達成され得る：Henry and Orr, *Anal. Biochem.* 114: 92~6 (1981)。

【0171】

好ましい実施形態に従い、外来性タンパク質の商業的生産のために提供されたトランスジェニック植物は、パレイショ植物である。別の好ましい実施形態において、目的のバイオマスは、種子又は塊茎である。より高いレベルの発現を示す比較的少数のトランスジェニック植物について、遺伝子マップが、まずは従来 of RFLP、PCR及びSSR分析を介して作成され得る。該遺伝子マップにより、組み込まれたDNA分子のおよその染色体位置が同定される。この点に関する例示的方法論についてはGlick and Thompson, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* CRC Press, Boca Raton 269: 284 (1993)を参照されたい。染色体位置に関するマップ情報は、主題のトランスジェニック植物の所有権保護のために有用である。認定されない増殖が行われ、他の生殖質との交配がなされた場合には、組み込み領域のマップは、疑わしい植物についての類似のマップと比較され得、後者が主題の植物と共通の素性 (common parentage) を有するかどうかを決定する。マップ比較は、ハイブリダイゼーション、RFLP、PCR、SSR及び配列決定を含み得、これらの全ては従来技術である。

10

20

【0172】

同様に、本発明を用いて、農業遺伝子が、形質転換植物において発現され得る。より詳細には、植物は、農業目的の種々の表現型を発現するように遺伝子操作され得る。この点に関係する例示的な遺伝子としては、いかに示すカテゴリーのものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0173】

1. 有害生物または病気に対する抵抗性を付与し、以下をコードする遺伝子：

A. 植物の病気に抵抗性の遺伝子。植物防御は、多くの場合、植物における病気抵抗性遺伝子の産物 (R) と病原体における対応する無発病性 (Avr) 遺伝子の産物との間の特異的相互作用によって活性化される。植物変種は、クローニングされた抵抗性遺伝子 (複数可) によって形質転換されて、特定の病原体株に対して抵抗性であるように植物を操作し得る。例えば、Jonesら, *Science* 266: 789 (1994) (cloning of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*); Martinら, *Science* 262: 1432 (1993) (tomato Pto gene for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* encodes a protein kinase); Mindrinosら *Cell* 78: 1089 (1994) (*Arabidopsis* RSP2 gene for resistance to *Pseudomonas syringae*) を参照されたい。

30

40

【0174】

B. 有害生物、例えばダイズシストセンチュウに対する抵抗性を付与する遺伝子。例えば、PCT出願WO 96/30517; PCT出願WO 93/19181を参照されたい。

【0175】

C. パチルス・スリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) タンパク質、その誘導体又はその上にモデリングした合成ポリヌクレオチド。例えば、Bt - 内毒素遺伝子のクローニング及びヌクレオチド配列を開示するGeiserら, *Gene* 48: 109 (1986)を参照されたい。さらに、 - 内毒素遺伝子をコードするDNA分子が、*American Type Culture Collecti*

50

on, Manassas, Virginiaから、例えば、ATCC受託番号40098、67136、31995及び31998の下で購入可能である。

【0176】

D. レクチン。例えば、幾つかのクリビア・ミニアータ (*Clivia miniata*) マンノース結合レクチン遺伝子のヌクレオチド配列を開示するVan Dammeら, *Plant Molec. Biol.* 24:25 (1994)を参照されたい。。

【0177】

E. アビジンなどのビタミン結合タンパク質。PCT出願US 93/06487を参照されたい。これは、昆虫有害生物に対する殺幼虫剤としての、アビジン及びアビジンホモログの使用を教示する。

10

【0178】

F. 酵素インヒビター、例えば、プロテアーゼインヒビター若しくはプロテイナーゼインヒビター又はアミラーゼインヒビター。例えば、Abeら, *J. Biol. Chem.* 262:16793 (1987) (コメシステインプロテイナーゼインヒビターのヌクレオチド配列)、Huubら, *Plant Molec. Biol.* 21:985 (1993) (タバコプロテイナーゼインヒビターIをコードするcDNAのヌクレオチド配列)、Sumitaniら, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1243 (1993) (ストレプトマイセス・ニトロスポレウス (*Streptomyces nitrosporeus*) - アミラーゼインヒビターのヌクレオチド配列) 及び米国特許5,494,813 (Hepher and Atkinson, issued February 27, 1996)を参照されたい。

20

【0179】

G. エクジステロイド又は幼若ホルモンなどの昆虫特異的ホルモン、それらのバリエーション、それらに基づく模倣物、又はそのアンタゴニスト若しくはアゴニスト。例えば、Hammockら, *Nature* 344:458 (1990)による、クローニングした幼若ホルモンエステラーゼ (幼若ホルモンの不活性化剤) のバキュロウイルス発現の開示を参照されたい。

【0180】

H. 発現の際に、影響を受けた有害生物の生理機構を破壊する、昆虫特異的ペプチド又はニューロペプチド。例えば、Regan, *J. Biol. Chem.* 269:9 (1994) (発現クローニングが昆虫利尿ホルモンレセプターをコードするDNAを生じる)、及びPrattら, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163:1243 (1989) (アロスタチンは、ジプロテラ・プンタータ (*Diploptera punctata*) において同定される) の開示を参照されたい。また、Tomalskiらに対する米国特許5,266,317 (昆虫特異的な麻痺性ニューロトキシンをコードする遺伝子を開示する) も参照されたい。

30

【0181】

I. 天然において蛇、スズメバチなどによって産生される昆虫特異的毒物。例えば、Pangら, *Gene* 116:165 (1992)を、サソリ昆虫毒ペプチドをコードする遺伝子の植物における異種発現の開示について参照されたい。

40

【0182】

J. モノテルペン、セスキテルペン、ステロイド、ヒドロキサム酸、フェニルプロパノイド誘導体又は殺昆虫活性を有する別の非タンパク質分子の過剰蓄積に關与する酵素。

【0183】

K. 生物学的活性分子の翻訳後修飾を含む改変に關与する酵素、例えば、天然又は合成のいずれかである、解糖酵素、タンパク分解酵素、脂肪分解酵素、ヌクレアーゼ、シクラーゼ、トランスアミナーゼ、エステラーゼ、ヒドロラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、ホスホリラーゼ、ポリメラーゼ、エラスターゼ、キチナーゼ及びグルカナーゼ。PCT出願WO 93/02197 (Scottら)を参照されたい。これは、カラーゼ (callase) 遺伝子のヌクレオチド配列を開示する。キチナーゼコード配列を含むDNA分子が、

50

例えば、ATCCから、受託番号39637及び67152の下で得られ得る。また、Kramerら, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23:691 (1993) (タバコイモムシキチナーゼをコードするcDNAヌクレオチド配列を教示する)、並びに、Kawalleckら, *Plant Molec. Biol.* 21:673 (1993) (パセリubi4-2ポリユビキチン遺伝子のヌクレオチド配列を提供する)も参照されたい。

【0184】

L. シグナル伝達を刺激する分子。例えば、Botellaら, *Plant Molec. Biol.* 24:757 (1994) による、リョクトウカルモジュリンcDNAクローンのヌクレオチド配列の開示、及びGriessら, *Plant Physiol.* 104:1467 (1994) (トウモロコシカルモジュリンcDNAクローンのヌクレオチド配列を提供する)を参照されたい。

10

【0185】

M. 疎水性モーメントペプチド。PCT出願WO 95/16776 (真菌植物病原体を阻害するタキプレシンのペプチド誘導体を開示する)、並びに、PCT出願WO 95/18855 (病気抵抗性を付与する、合成抗微生物ペプチドを教示する)を参照されたい。

【0186】

N. 膜パーミアーゼ、チャネルフォーマー又はチャネルブロッカー。例えば、Jaynesら, *Plant Sci.* 89:43 (1993) の、トランスジェニックタバコ植物をシュドモナス・ソラナセアラム (*Pseudomonas solanacearum*) に対して抵抗性にする、セクロピン-溶解性ペプチドの異種発現の開示を参照されたい。

20

【0187】

O. ウイルス侵襲性タンパク質又はそれに由来する複合毒素。例えば、形質転換植物細胞におけるウイルスコートタンパク質の蓄積は、ウイルス感染及び/又はコードタンパク質遺伝子が由来するウイルスにより、並びに関連のウイルスによりもたらされる病気発症に対する抵抗性を付与する。Beachyら, *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:451 (1990) を参照されたい。コートタンパク質媒介型抵抗性は、アルファモザイクウイルス、キュウリモザイクウイルス及びタバコモザイクウイルスに対する形質転換植物に付与されている。

30

【0188】

P. 昆虫特異的抗体又はそれに由来するイムノトキシン。従って、昆虫の腸における重要な代謝機能に対し標的化された抗体は、影響を受けた酵素を不活化し、昆虫を死滅させる。Taylorら, *Abstract #497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions* (Edinburgh, Scotland) (1994) (トランスジェニックタバコにおける一本鎖抗体断片の産生を介した酵素不活性化)を参照されたい。

【0189】

Q. ウイルス特異的抗体。例えば、Tavladorakiら, *Nature* 366:469 (1993) (組換え抗体遺伝子を発現するトランスジェニック植物が、ウイルス攻撃から保護されることを示す)を参照されたい。

40

【0190】

R. 病原体又は寄生生物により天然で産生される発生停止タンパク質。従って、真菌エンド-1,4-D-ポリガラクトナーゼは、植物細胞壁ホモ-1,4-D-ガラクトナーゼを可溶化することにより、真菌のコロニー形成及び植物栄養放出を容易にする。Lambら, *Bio/Technology* 10:1436 (1992) を参照されたい。マメエンドポリガラクトナーゼ阻害タンパク質をコードする遺伝子のクローニング及び性質決定は、Toubartら, *Plant J.* 2:367 (1992) によって記載される。

50

【0191】

S. 植物により天然で産生される発生停止タンパク質。例えば、Logemannら, *Bio/Technology* 10:305(1992)は、オオムギリボソーム不活性化遺伝子を発現するトランスジェニック植物が、真菌の病気に対し増大した抵抗性を有することを示している。

【0192】

T. 全身獲得抵抗性(SAR)応答に関する遺伝子及び/又は病因関連遺伝子。Briggs, S. *Current Biology*, 5(2)(1995)。

【0193】

U. 抗真菌遺伝子。Cornelissen and Melchers, *Plant Physiol.*, 101:709~712(1993); Parijsら, *Planta* 183:258~264(1991)及びBushnellら, *Can. J. of Plant Path.* 20(2):137~149(1998)を参照されたい。

10

【0194】

V. フィトフトラ・ブライト(*Phytophthora blight*)に対する抵抗性を付与する遺伝子、例えば、R1、R2、R3、R4及び他の抵抗性遺伝子。Naess, S. K., et al., (2000) Resistance to late blight in *Solanum tuberosum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 101:697~704及びLi, X., et al., (1998) Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor. Appl. Genet.* 96:1121~1128を参照されたい。

20

【0195】

2. 除草剤に対する抵抗性を扶養する遺伝子、例えば:

A. 成長点又は分裂組織を阻害する除草剤、例えば、イミダゾリノン又はスルホニルウレア。このカテゴリーにおける例示的な遺伝子は、例えば、それぞれLeeら, *EMBO J.* 7:1241(1988)及びMikiら, *Theor. Appl. Genet.* 80:449(1990)に記載されるように、変異体ALS及びAHAS酵素をコードする。

30

【0196】

B. グリホセート(それぞれ変異体5-エノールピルビルシキメート(enolpyruvylshikimate)-3-ホスフェートシンターゼ(EPSP)及びaroA遺伝子によって、抵抗性が損なわれる)、並びにグルホシネート(ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)及びストレプトマイセス・ヒグロスコピカス(*Streptomyces hygroscopicus*)PATバー遺伝子)及びピリジノキシ又はフェノキシプロピオン酸及びシクロヘキソンなど(ACCアーゼインヒターコード遺伝子)の他のホスホノ化合物。例えば、グリホセート抵抗性を付与し得るEPSPの形態のヌクレオチド配列を開示する、Shah, らに対する米国特許4,940,835を参照されたい。変異体aroA遺伝子をコードするDNA分子は、ATCC受託番号39256の下で得られ得、変異体遺伝子のヌクレオチド配列は、Comaiに対する米国特許4,769,061に開示される。Kumadaらに対する欧州特許出願0333033、及びGoodmanらに対する米国特許4,975,374は、L-ホスフィノトリシンなどの除草剤に対する抵抗性を付与するグルタミンシンターゼ遺伝子のヌクレオチド配列を開示する。PAT遺伝子のヌクレオチド配列は、Leemansらに対する欧州出願0242246において提供される。De Greefら, *Bio/Technology* 7:61(1989)は、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ活性についてコードするキメラバー遺伝子を発現する、トランスジェニック植物の産生を記載する。フェ

40

50

ノキシプロピオン酸及びシクロヘキソン、例えばセトキシジム及びハロキシホップに対する抵抗性を付与する遺伝子の例は、Acc 1 - S 1、Acc 1 - S 2 及び Acc 2 - S 3 遺伝子である：Marshallら、Theor. Appl. Genet. 83: 435 (1992)に記載される。

【0197】

C. 光合成を阻害する除草剤、例えばトリアジン (psbA 及び gs+ 遺伝子) 又はベンゾニトリル (ニトリラーゼ遺伝子)。Przibillaら、Plant Cell 3: 169 (1991) は、変異体 psbA をコードするプラスミドによる、クラミドモナスの形質転換を記載する。ニトリラーゼ遺伝子についてのヌクレオチド配列は、Stalker に対する米国特許 4, 810, 648 に開示され、これらの遺伝子を含む DNA 分子は、ATCC 受託番号 53435、67441 及び 67442 の下で利用可能である。グルタチオン S - トランスフェラーゼをコードする DNA のクローニング及び発現は、Hayesら、Biochem. J. 285: 173 (1992) に記載される。

10

【0198】

D. 複数の型の除草剤に抵抗性であるアセトヒドロキシ酸シンターゼ酵素を発現する植物を作製することが見出されており、該アセトヒドロキシ酸シンターゼが、種々の植物内に導入されている。Hattoriら、Mol. Gen. Genet. 246: 419, 1995 を参照されたい。除草剤に対する耐性を付与する他の遺伝子としては、ラットシトクロム P4507A1 と酵母 NADPH - シトクロム P450 オキシドレダクターゼとのキメラタンパク質をコードする遺伝子 (Shiotaら、Plant Physiol., 106: 17, 1994)、グルタチオンレダクターゼ及びスーパーオキシドジスムターゼについての遺伝子 (Aonoら、Plant Cell Physiol. 36: 1687, 1995)、並びに種々のホスホトランスフェラーゼについての遺伝子 (Dattaら、Plant Mol. Biol. 20: 619, 1992) が挙げられる。

20

【0199】

E. プロトボルフィリノゲンオキシダーゼ (protox) が、全ての植物の生存のために必要な葉緑素の産生のために必要である。protox 酵素は、種々の除草剤化合物のための標的として働く。これらの除草剤はまた、存在する全ての異なる種の植物の成長も阻害し、それらの全体的破壊をもたらす。これらの除草剤に対して抵抗性である改変された protox 活性を有する植物の開発は、米国特許 6, 288, 306; 6, 282, 837; 5, 767, 373 及び国際公開 WO 01/12825 に記載される。

30

【0200】

3. 付加価値形質を付与するか又はこれに寄与する遺伝子。例えば：

A. 改変された脂肪酸代謝。例えば、ステアシル - ACP デサチュラーゼのアンチセンス遺伝子による、植物のステアリン酸含量を増大するように該植物を形質転換することによるもの。Knultzonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2625 (1992) を参照されたい。

【0201】

B. 低下したフィテート含量 - 1) フィターゼをコードする遺伝子の導入は、フィテートの分解を増強し、形質転換植物に、より多くの遊離のホスフェートを追加する。例えば、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) フィターゼ遺伝子のヌクレオチド配列の開示については、Van Hartingsveldtら、Gene 127: 87 (1993) を参照されたい。2) フィテート含量を低下させる遺伝子を導入することもできた。トウモロコシにおいて、例えば、これは、低レベルのフィチン酸によって特徴づけられるトウモロコシ変異体に関与する単一の対立遺伝子に関連する DNA をクローニングし、次いで再導入することによって、達成され得た。Raboyら、Maydica 35: 383 (1990) を参照されたい。

40

【0202】

C. 例えば、デンプンの分枝パターンを改変する酵素をコードする遺伝子で植物を形質転換することによりもたらされた、改変された炭水化物組成。Shirozaraら、J. B

50

acteriol. 170: 810 (1988) (ストレプトコッカス (*Streptococcus*) ミュータンスフラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列)、Steinmetzら, *Mol. Gen. Genet.* 20: 220 (1985) (バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) レバンスクララーゼ遺伝子のヌクレオチド配列)、Penら, *Bio/Technology* 10: 292 (1992) (バチルス・リケニホニス (*Bacillus licheniformis*) - アミラーゼを発現するトランスジェニック植物の産生)、Elliottら, *Plant Molec. Biol.* 21: 515 (1993) (トマトインベルターゼ遺伝子のヌクレオチド配列)、Sogaardら, *J. Biol. Chem.* 268: 22480 (1993) (オオムギ - アミラーゼ遺伝子の部位特異的変異誘発) 及び Fisherら, *Plant Physiol.* 102: 1045 (1993) (トウモロコシ胚乳デンプン分枝酵素 II) を参照されたい。

10

【0203】

D. FAD - 2 遺伝子改変を介したオレイン酸の上昇及び / 又は FAD - 3 遺伝子改変を介したリノレン酸の低下。米国特許 6,063,947; 6,323,392; 及び国際公開 WO 93/11245 を参照されたい。

【0204】

4. 雄性不稔を制御する遺伝子

A. タベータム特異的プロモーターの制御下及び化学的 N - Ac - PPT の適用によるデアセチラーゼ遺伝子の導入。国際公開 WO 01/29237 を参照されたい。

20

【0205】

B. 種々の雄ずい特異的プロモーターの導入。国際公開 WO 92/13956 及び WO 92/13957 を参照されたい。

【0206】

C. バルナーゼ遺伝子及びバルスター遺伝子の導入。Paulら, *Plant Mol. Biol.* 19: 611 ~ 622, 1992 を参照されたい。

【0207】

バレイショ形質転換の方法

植物形質転換のための多くの方法が開発されており、それらとしては、生物学的及び物理的植物形質転換プロトコールが挙げられる。例えば、Mikiら, 「Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants」 in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds. (CRC Press, Inc. Boca Raton, 1993) pages 67 ~ 88 を参照されたい。加えて、発現ベクター並びに植物細胞又は組織の形質転換及び植物の再生のためのインビトロ培養方法が、利用可能である。例えば、Gruberら, 「Vectors for Plant Transformation」 in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) pages 89 ~ 119 を参照されたい。

30

40

【0208】

A. アグロバクテリウム媒介型形質転換 - 発現ベクターを植物内に導入するための1つの方法は、アグロバクテリウムの天然の形質転換システムに基づく。例えば、Horschら, *Science* 227: 1229 (1985) を参照されたい。A. ツメファシエンス及び A. リゾゲネスは、植物細胞を遺伝的に形質転換する、植物病原性土壌細菌である。A. ツメファシエンス及び A. リゾゲネスの Ti 及び Ri プラスミドは、それぞれ、植物の遺伝的形質転換に關与する遺伝子を有する。例えば、Kado, C. I., *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 1 (1991) を参照されたい。アグロバクテリウムベクター系及びアグロバクテリウム媒介型遺伝子移入のための方法の記載は、G

50

ruberら, 上掲, Mikiら, 上掲 および Moloneyら, Plant Cell Reports 8:238(1989)によって提示される。また、1996年10月8日に発行された米国特許5,563,055(Townsend and Thomas)も参照されたい。

【0209】

B. 直接遺伝子移入 - 集合的に直接遺伝子移入と呼ばれる植物形質転換の幾つかの方法が、アグロバクテリウム媒介型形質転換の代替法として開発されている。微小射出(microprojectile)の植物表面での一般に適用可能な方法は、1~4μmである。発現ベクターを、植物細胞壁及び細胞膜を貫くのに十分な300~600m/秒の速さに微小射出を加速する微粒銃(biolistic)デバイスにより、植物組織内に導入する。Sanfordら, Part. Sci. Technol. 5:27(1987); Sanford, J. C., Trends Biotech. 6:299(1988); Kleinら, Bio/Tech. 6:559~563(1988); Sanford, J. C. Physiol Plant 7:206(1990); Kleinら, Biotechnology 10:268(1992)。1991年5月14日に発行された米国特許5,015,580(Christou, ら)、及び1994年6月21日に発行された米国特許5,322,783(Tomes, ら)もまた、参照されたい。

10

【0210】

DNAの植物への物理的送達のための別の方法は、標的細胞の超音波処理である。Zhangら, Bio/Technology 9:996(1991)。あるいは、リボソーム及びスフェロプラスト融合が、発現ベクターを植物内に導入するために使用されている。Deshayesら, EMBO J., 4:2731(1985); Christouら, Proc Natl. Acad. Sci. USA 84:3962(1987)。CaCl₂沈殿、ポリビニルアルコール又はポリ-L-オルニチンを用いるDNAのプロトプラスト中への直接取り込みもまた、報告されている。Hainら, Mol. Gen. Genet. 199:161(1985)及びDraperら, Plant Cell Physiol. 23:451(1982)。プロトプラスト及び全細胞並びに組織の電圧ポレーションもまた、記載されている。Donnら, In Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, p 53(1990); D'Halluinら, Plant Cell 4:1495~1505(1992)及びSpencerら, Plant Mol. Biol. 24:51~61(1994)。

20

30

【0211】

パレイシヨ標的組織の形質転換後、上記の選択可能マーカー遺伝子の発現は、当該分野で周知の再生及び選択方法を用いた形質転換細胞、組織及び/又は植物の優先的選択を可能にする。

【0212】

形質転換のための上述の方法が、代表的に、トランスジェニック変種を産生するために使用される。次いで、新規なトランスジェニック変種を産生するために、トランスジェニック変種を、別の(形質転換されていない又は形質転換されている)変種に交配させ得る。あるいは、特定のパレイシヨ系統に上述の形質転換技術を用いて操作した遺伝的形質を、植物繁殖分野で周知の従来型戻し交配技術を用いて、別の系統に移してもよい。例えば、戻し交配アプローチを使用し、操作した形質を、公の、非エリート変種からエリート変種へと移動させてもよく、又は、そのゲノム内に外来性遺伝子を含む変種からこの遺伝子を含まない単数または複数の変種へと移動させてもよい。本明細書中で使用される場合、「交配する」は、単純にXをYによってかけ合わせることをいっても、又は文脈に依存して、戻し交配のプロセスをいってもよい。

40

【0213】

当業者は、用語パレイシヨ植物が、本発明の文脈で使用される場合、これはまたW8の

50

本質的に識別可能な特徴を保持する派生変種、例えば、この変種の遺伝子変換植物又はそこに組み入れられた1つもしくはそれより多くの付加価値遺伝子（例えば、除草剤又は有害生物抵抗性）を有するトランスジェニック誘導体をも含むことを理解する。戻し交配方法は、特徴を改善するか、又は特徴を変種に導入するために、本発明と共に使用され得る。用語「戻し交配」は、本明細書中で使用される場合、ハイブリッド子孫を反復親に戻す1、2、3、4、5、6、7、8、9回またはそれ超の繰り返し交配をいう。1つもしくはそれより多くの所望の特徴のために遺伝子（複数可）を与える親パレイショ植物を、非反復親又はドナー親と呼ぶ。この用語は、非反復親が、戻し交配プロトコールにおいて1回使用され、繰り返されないという事実をいう。非反復親からの単数または複数の遺伝子が移入されている親パレイショ植物は、戻し交配プロトコールにおいて、数ラウンドも使用されるので、反復親として公知である。代表的な戻し交配プロトコールにおいて、目的の元の変種（反復親）は、移入される目的の遺伝子（複数可）を有する第2の変種（非反復親）と交配される。この交配から得られた子孫を、次いで、再び反復親にかけ合わせ、このプロセスを、変換した植物において、非反復親から移入された1つもしくはそれより多くの遺伝子に加えて反復親の所望の形態学的及び生理学的特徴を本質的に全て回復したパレイショ植物が得られるまで繰り返す。

10

【0214】

好適な反復親の選択は、戻し交配手順を成功させるために重要な工程である。戻し交配プロトコールの目標は、元の変種における1つまたはそれより多くの形質又は特徴を、改変することまたは置換することである。これを達成するために、反復変種の1つもしくはそれより多くの遺伝子を、非反復親由来の所望の遺伝子（複数可）により、改変するか、置換するか、又は補充する一方で、所望の遺伝子の残りの全ては本質的に保持し、従って、元の変種の所望の生理学的及び形態学的構造（constitution）を保持する。特定の非反復親の選択は、戻し交配の目的に依存する。主要な目的の一つは、幾つかの商業的に望ましい、農業的に重要な形質を、植物に付加することである。正確な戻し交配プロトコールは、改変されるか又は加えられた特徴若しくは形質に依存して、適切な試験プロトコールを決定する。移入される特徴が優性対立遺伝子である場合は戻し交配方法は単純化されるが、劣性対立遺伝子もまた、移入され得る。この場合、所望の特徴が首尾よく移入されたかを決定するために、子孫の試験を導入する必要がある。

20

【0215】

このように、トランスジーンは、種々の確立された、当業者に周知の組換え方法のいずれかを用いて、植物へと導入され得る。例えば、以下である：Gressel, 1985, *Biotechnologically Conferring Herbicide Resistance in Crops: The Present Realities, In Molecular Form and Function of the Plant Genome*, L. van Vloten-Doting, (ed.), Plenum Press, New York; Huttner, S. L., 5, 1992, *Revising Oversight of Genetically Modified Plants*, *Bio/Technology*; Klee, H., 5, 1989, *Plant Gene Vectors and Genetic Transformation: Plant Transformation Systems Based on the use of Agrobacterium tumefaciens, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*; Koncz, C., 5, 1986, *The Promoter of T_L-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector*; *Molecular and General Genetics*; Lawson, C., 5, 1990, *Engineering Resistance to Mixed Virus Infection in a Commerci*

30

40

50

al Potato Cultivar: Resistance to Potato Virus X and Potato Virus Y in Transgenic Russet Burbank, Bio/Technology; Mitsky, T. A., 5, 1996, Plants Resistant to Infection by PLRV. 米国特許 5, 510, 253; Newell, C. A., 5, 1991, Agrobacterium-Mediated Transformation of Solanum tuberosum L. Cv. Russet Burbank, Plant Cell Reports; Perlak, F. J., 5, 1993, Genetically Improved Potatoes: Protection from Damage by Colorado Potato Beetles, Plant Molecular Biology, これらの全ては、この目的のために、本明細書中に参考として組み込まれる。

10

【0216】

新規な変種の開発のためには通常選択されないが、戻し交配及び遺伝子操作技術によって改善され得る多くの形質が、同定されている。これらの形質は、トランスジェニックであってもなくてもよい；これらの形質の例としては、除草剤抵抗性；細菌性の病気、真菌性の病気又はウイルス性の病気に対する抵抗性；昆虫抵抗性；デンプンおよび他の炭水化物の濃度における均一性若しくは増大；栄養品質の向上；塊茎が傷を負う傾向の低下；及びデンプンの糖への変換の割合の低下が挙げられるが、これらに限定されない。これらの遺伝子は、核を通して遺伝的に受け継がれる。これらの形質の幾つかは、以下に記載される：米国特許 5, 500, 365、米国特許 5, 387, 756、米国特許 5, 789, 657、米国特許 5, 503, 999、米国特許 5, 589, 612、米国特許 5, 510, 253、米国特許 5, 304, 730、米国特許 5, 382, 429、米国特許 5, 503, 999、米国特許 5, 648, 249、米国特許 5, 312, 912、米国特許 5, 498, 533、米国特許 5, 276, 268、米国特許 4, 900, 676、米国特許 5, 633, 434 及び米国特許 4, 970, 168。

20

【0217】

寄託情報

J. R. Simplot Company 所有の、上で開示し添付の特許請求の範囲で挙げたバレイショ栽培品種 W8 の塊茎寄託は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 によってなされた。寄託日は、2014年3月11日であった。微小塊茎の25個のバイアルの寄託物を、J. R. Simplot Company によって維持された同じ寄託物から、本出願の提出日の前に受け取った。全ての制限は、特許の付与の際に不可逆的に取り除かれ、この寄託は、37 C.F.R. §§ 1.801~1.809 の全ての要件を満たすことを意図する。ATCC 受託番号は、PTA-121079 である。寄託物は、30年間の期間にわたって、又は最後の要求から5年間にわたって、又は、より長い場合には特許の権利行使可能期間にわたって、寄託当局によって維持され、必要に応じて、その期間の間、取り換えられる。

30

40

【0218】

多くの例示的局面及び実施形態が上で議論されているが、当業者は、特定の改変、交換、追加及びその部分的組み合わせを、認識する。従って、以下の添付の特許請求の範囲は、以後、全てのこのような改変、交換、追加及び部分的組み合わせを、その真の精神及び範囲内であるように、含むと解釈されることが、意図される。

【 図 6 】

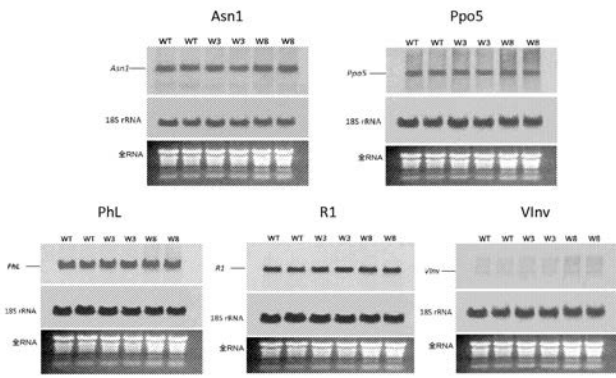


FIG. 6

【 図 7 】

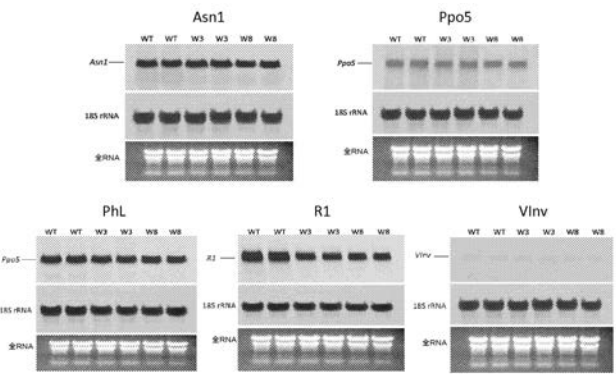


FIG. 7

【 図 1 0 】

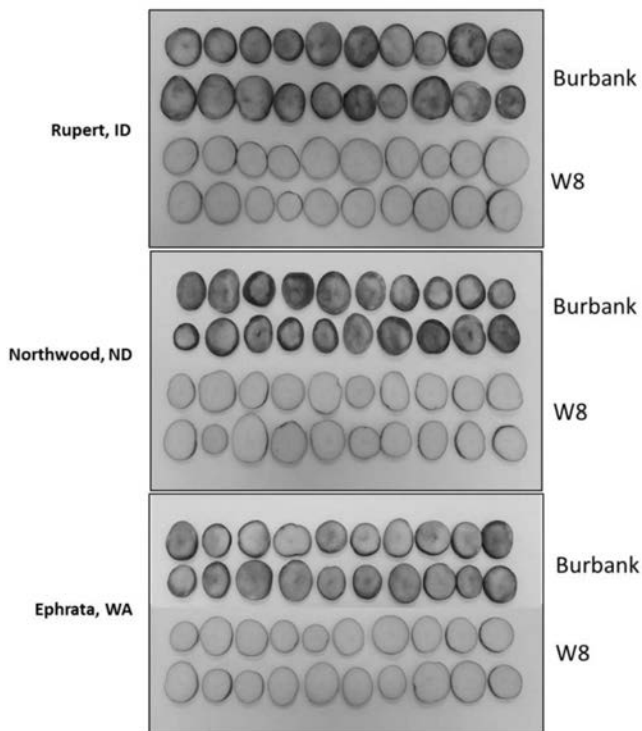


FIG. 10

【 図 8 】

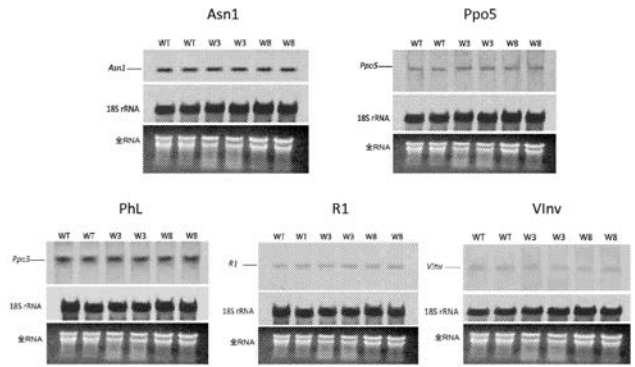


FIG. 8

【 図 9 】

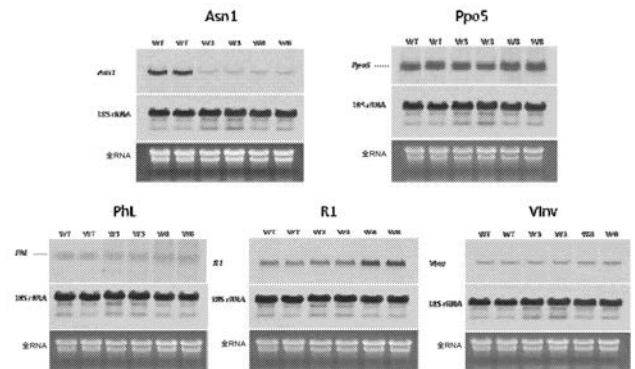



FIG. 9

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/42631
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: -----go to Extra Sheet for continuation-----		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
	<input checked="" type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 14/42631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01H 5/00 (2014.01) CPC - A01H 5/04 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) CPC: A01H 5/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: A01H 5/04 (text search) USPC: 800/317.2, 295, 298, 260, 263, 285, 286; 435/419 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase; Google Scholar; Google Patents Search terms: potato, plant part, seed, tissue culture, transgenic, antisense, siRNA, RNAi, asparagine synthetase-1, polyphenol oxidase-5, phosphorylase-L, dikinase R1, late blight resistance Rpi-vnt1, vacuolar invertase VInv, pSIM1278, pSIM1678, loss of vector backbone, non-incorp		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 8,710,311 B1 (CLARK et al.) 29 April 2014 (29.04.2014). Especially col 2 para 14-27, col 3 in 8-132, col 3 in 30-40, col 9 in 35-40, col 21 in 24-26, col 22 in 19-23, col 35 in 58-61, Claims 19-23.	1-23
Y	FOSTER et al. Rpi-vnt1.1, a Trm-2(2) homolog from Solanum venturii, confers resistance to potato late blight. Mol Plant Microbe Interact May 2009 Vol 22 No 5 Pages 589-600. Especially pg 595 col 1 para 5.	1-23
Y	US 2010/0199386 A1 (BHASKAR et al.) 05 August 2010 (05.08.2010). Especially para [0018], [0040].	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 December 2014 (16.12.2014)		Date of mailing of the international search report 02 JAN 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/42631

Continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-16, 22-23, drawn to a potato tuber, or a part of a tuber, of potato cultivar W8, wherein a representative sample of said tuber was deposited under ATCC Accession No. PTA-121079.

Group II: Claims 17-21, drawn to a method of introducing a desired trait into potato cultivar W8, wherein the method comprises:
 (a) crossing a W8 plant, wherein a representative sample of tubers was deposited under ATCC Accession No. PTA-121079, with a plant of another potato cultivar that comprises a desired trait to produce progeny plants, wherein the desired trait is selected from the group consisting of male sterility, herbicide resistance, insect resistance, modified fatty acid metabolism, modified carbohydrate metabolism and resistance to bacterial disease, fungal disease or viral disease;
 (b) selecting one or more progeny plants that have the desired trait;
 (c) backcrossing the selected progeny plants with W8 plants to produce backcross progeny plants;
 (d) selecting for backcross progeny plants that have the desired trait; and
 (e) repeating steps (c) and (d) two or more times in succession to produce selected third or higher backcross progeny plants that comprise the desired trait.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group II requires particular method steps, not required of Group I.

The common technical feature of Groups I and II is a potato tuber of potato cultivar W8, deposited as ATCC PTA-121079, defined as (from claim 3; note: no sequence is provided in instant application to define the transgenic potato cultivar W8) comprising the insert region of pSIM1278 that is present in cultivar W8 which contains inverted repeats of potato DNA effective for inhibition of expression of the endogenous asparagine synthetase-1 gene and the endogenous polyphenol oxidase-5 gene in addition to inverted repeats of the endogenous potato promoters for the phosphorylase-L and dikinase RI genes and further comprising the insert region of pSIM1678 that is present in W8 which contains the potato late blight resistance gene Rpi-vnt1 and inverted repeats of potato DNA effective for inhibition of expression of the endogenous vacuolar invertase gene Vinv.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is obvious over US 8,710,311 B1 to CLARK et al. (hereinafter "Clark"), in view of the publication titled "Rpi-vnt1.1, a Tm-2(2) homolog from Solanum venturii, confers resistance to potato late blight" by FOSTER et al. (hereinafter "Foster") [Mol Plant Microbe Interact May 2009 Vol 22 No 5 Pages 589-600], in further view of US 2010/0199386 A1 to BHASKAR et al. (hereinafter "Bhaskar").

-----continued on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/42631

continued from previous sheet

Clark discloses a potato cultivar with the insert region of pSIM1278 that is present in cultivar W8 which contains inverted repeats of potato DNA effective for inhibition of expression of the endogenous asparagine synthetase-1 gene and the endogenous polyphenol oxidase-5 gene in addition to inverted repeats of the endogenous potato promoters for the phosphorylase-L and dikinase R1 genes (col 2 In 14-27; a plant vector, referred to as pSIM1278, that comprises a first silencing cassette containing two copies of a DNA segment comprising, in anti-sense orientation, a fragment of the asparagine synthetase-1 gene (Asn1) and the 3'-untranslated sequence of the polyphenol oxidase-5 gene; and a second silencing cassette containing two copies of a DNA segment comprising, in anti-sense orientation, a fragment of the potato phosphorylase-L (pPhL) gene and a fragment of the potato R1 gene. The pSIM1278 vector comprises a 9,511 bp backbone region that supports maintenance of the plant DNA prior to plant transformation and is not transferred into plant cells upon transformation of the plant cells, and a 10,147 bp DNA insert region comprising native DNA that is stably integrated into the genome of the plant cells upon transformation"). Clark does not teach the insert region of pSIM1678 that is present in W8 which contains the potato late blight resistance gene Rpi-vnt1 and inverted repeats of potato DNA effective for inhibition of expression of the endogenous vacuolar invertase gene VInv. However, transgenic plants containing the potato late blight resistance gene Rpi-vnt1 and methods of making such a plant are well known in the art, as exemplified by the teaching of Foster (pg 595 col 1 para 5; " Potato cv. Desiree was transformed with plasmid pSLJ21152 which contained Rpi-vnt1.1 under the control of its native promoter and terminator. In total, 37 S. tuberosum cv. Desiree plants capable of growth on kanamycin were selected as putative Rpi-vnt1.1 transformants. Following transfer to the glasshouse, leaves from 29 plants were excised and used in a detached leaf assay with P. infestans isolates 90128 and BPC2006 3928A (superblight, blue 13) to determine whether the transgene conferred blight resistance (Fig. 4). Of the 29 transformants tested, 24 were confirmed as being resistant and did not show any signs of blight infection"). Additionally, Bhaskar discloses a potato antisense construct (RNAi) effective in inhibition of expression of the endogenous invertase gene VInv (para [0018]; " the invention is directed to methods for silencing vacuolar invertase in a transgenic potato plant or transgenic sweet potato plant comprising decreasing the level of VI activity compared to its level in a control, non-transgenic potato plant or non-transgenic sweet potato plant by reducing the level of an mRNA in the transgenic potato plant or transgenic sweet potato plant, wherein the mRNA is encoded by a polynucleotide having at least 90% sequence identity to a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:4, and by expression of an RNAi construct comprising a fragment of at least 20 contiguous nucleotides of a sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:4"; para [0040]; FIG. 4 shows the correlation of chip color with the amount of VInv transcript. All the chips were obtained from tuber samples taken at 60 day storage either at 20 C. or at 4C. (direct chipping from cold storage). Representative tuber samples were collected from VI RNAi lines representing various levels of transcripts as described in Table 6. RNAi line #10 has no VI transcript reduction and produced a poor chip score of 8.0 at 60 day chipping stored at 4 C. RNAi line #1 has 99% VI transcript reduction and produced a good chip score of 3.0 at 60 day chipping (tubers stored at 4C.). An artisan of ordinary skill in the art would have recognized the value of generating potato cultivars with multiple desirable agronomic traits, as is well known in the art, and would have further recognized the value of combining traits generated by the pSIM1278 vector [reducing expression of the enzyme responsible for black spot bruise and to reduce acrylamide through lowering the concentration of the reactants, namely asparagine and reducing sugars] taught by Clark, with the further additional traits of late blight resistance [blocking fungus Phytophthora infestans infection] and lack of endogenous vacuolar invertase activity [reducing cold storage induced sweetening] because it would have produced a more desirable commercial product. Consequently, it would have been obvious to combine the agronomic traits encoded in vector pSIM1278, as taught by Clark, with introducing late blight resistance transgenically, as taught by Foster, with RNAi inhibition of endogenous vacuolar invertase activity, as taught by Bhaskar, because it would have generated a potato cultivar with favorable agronomic traits.

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

(72)発明者 リシェール, クレグ
 アメリカ合衆国 アイダホ 8 3 7 0 2, ボイジー, メイン ストリート 9 9 9, スイート 1 3 0 0

(72)発明者 ヤン, ファ
 アメリカ合衆国 アイダホ 8 3 7 0 2, ボイジー, メイン ストリート 9 9 9, スイート 1 3 0 0

(72)発明者 ラスムッセン, ジョリン
 アメリカ合衆国 アイダホ 8 3 7 0 2, ボイジー, メイン ストリート 9 9 9, スイート 1 3 0 0

(72)発明者 ドゥアン, ファイ
 アメリカ合衆国 アイダホ 8 3 7 0 2, ボイジー, メイン ストリート 9 9 9, スイート 1 3 0 0

(72)発明者 シャンポーレット, ニコラス
 アメリカ合衆国 アイダホ 8 3 7 0 2, ボイジー, メイン ストリート 9 9 9, スイート 1 3 0 0

(72)発明者 バルムス, アレクシ
 アメリカ合衆国 アイダホ 8 3 7 0 2, ボイジー, メイン ストリート 9 9 9, スイート 1 3 0 0

(72)発明者 イェ, ジンソン
 アメリカ合衆国 アイダホ 8 3 7 0 2, ボイジー, メイン ストリート 9 9 9, スイート 1 3 0 0

Fターム(参考) 2B030 AB02 AD05 AD08 CA01 CA14
 4B016 LG06 LP03 LP07 LP08 LP13
 4B065 AA89X AB01 BA02 CA53