

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成25年1月24日(2013.1.24)

【公表番号】特表2012-531216(P2012-531216A)

【公表日】平成24年12月10日(2012.12.10)

【年通号数】公開・登録公報2012-052

【出願番号】特願2012-518040(P2012-518040)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

A 01 H 5/00 (2006.01)

A 01 G 1/00 (2006.01)

A 01 G 7/06 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 N 5/00 1 0 3

A 01 H 5/00 A

A 01 G 1/00 3 0 1 Z

A 01 G 7/06 A

【手続補正書】

【提出日】平成24年11月22日(2012.11.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の機能的に連結されたDNA断片：

a) 植物で発現可能な構成的プロモーター；

b) 5'UTRをコードするDNA領域；

c) 植物置換ヒストン遺伝子のイントロン1をコードするDNA領域；

d) トランジットペプチドをコードするDNA領域；

e) グリホサート耐性5'-エノールピルビルシキミ酸-3'-リン酸シンターゼ(EPSPS)をコードするDNA領域；ならびに

f) 植物細胞で機能的な3'転写終結およびポリアデニル化領域を含む、キメラDNA分子を含む植物細胞または植物。

【請求項2】

前記構成的プロモーターがCaMV 35Sプロモーターである、請求項1に記載の植物細胞または植物。

【請求項3】

前記イントロン1が、配列番号9のnt692~1100もしくはnt2984~3064または配列番号10のnt555~668を含む、請求項1または2のいずれか一項に記載の植物細胞または植物。

【請求項4】

前記グリホサート耐性EPSPSをコードするDNA領域が、配列番号8のアミノ酸配列をコードする、請求項1~3のいずれか一項に記載の植物細胞または植物。

【請求項5】

前記グリホサート耐性 E P S P S をコードする D N A 領域が、配列番号 1 の n t 8 0 0 ~ 2 1 3 7 を含む、請求項 4 に記載の植物細胞または植物。

【請求項 6】

以下の機能的に連結された D N A 断片：

a) シロイヌナズナ (A r a b i d o p s i s t h a l i a n a) のヒストン H 4 遺伝子のプロモーター配列；

b) 植物置換ヒストン遺伝子のイントロン 1 をコードする第 2 の D N A 領域；

c) トランジットペプチドをコードする第 2 の D N A 領域；

d) グリホサート耐性 E P S P S をコードする第 2 の D N A 領域；ならびに

e) 植物細胞で機能的な第 2 の 3' 転写終結およびポリアデニル化領域

を含む第 2 のキメラ D N A 分子をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の植物細胞または植物。

【請求項 7】

前記ヒストン H 4 プロモーター配列が、配列番号 6 の n t 5 9 6 9 ~ 6 8 9 0 を含む、請求項 6 に記載の植物細胞または植物。

【請求項 8】

前記イントロン 1 が、配列番号 9 の n t 6 9 2 ~ 1 1 0 0 もしくは n t 2 9 8 4 ~ 3 0 6 4 または配列番号 1 0 の n t 5 5 5 ~ 6 6 8 を含む、請求項 6 または 7 のいずれか一項に記載の植物細胞または植物。

【請求項 9】

前記グリホサート耐性 E P S P S をコードする D N A 領域が、配列番号 8 のアミノ酸配列をコードする、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の植物細胞または植物

【請求項 10】

前記グリホサート耐性 E P S P S をコードする D N A 領域が、配列番号 1 の n t 8 0 0 ~ 2 1 3 7 を含む、請求項 9 に記載の植物細胞または植物。

【請求項 11】

アブラナ属 (B r a s s i c a) 植物である請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の植物細胞または植物。

【請求項 12】

アブラナである請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の植物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載されているようなキメラ遺伝子を含む請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の植物の種子。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載されているようなキメラ D N A 分子。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載されているような植物を生育させ、かつ前記植物を E P S P S 阻害除草剤で処理することを含む、野外で植物を生育させるための方法。

【請求項 16】

グリホサート耐性植物を作製するための請求項 1 4 に記載のキメラ D N A 分子の使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】グリホサート耐性が増強された植物を得るための方法および手段

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、除草剤耐性植物、より具体的には、グリホサート耐性 5 - エノールピルビル

シキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ (E P S P S) の定量的および定性的な発現を指示するキメラ D N A 分子を含み、前記キメラ D N A 分子が、それによって、前記 E P S P S を阻害する除草剤に対する増強された耐性を前記植物に付与する、植物 (例えは、アブラナ属の油糧種子植物) の分野に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

N - ホスホノメチルグリシン (別名、グリホサート) は、広範な植物種に対して活性があるよく知られた除草剤である。芳香族アミノ酸を合成するための前駆体を提供するシキミ酸経路を阻害するので、グリホサートには植物毒性がある。グリホサートは、植物やいくつかの細菌に見られるクラス I の 5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ (E P S P S) を阻害する。植物におけるグリホサート耐性は、グリホサートに対するより低い親和性を有するが、グリホサートの存在下でその触媒活性を依然として保持する改変されたクラス I の E P S P S を発現させることによって達成することができる。グリホサート耐性 E P S P S 酵素をコードする遺伝子は、当技術分野 (例えは、特許出願の欧洲特許第 0 8 3 7 9 4 4 号明細書および米国特許第 6 , 5 6 6 , 5 8 7 号明細書) において周知である。植物におけるグリホサート耐性は、クラス I I またはクラス I I I の E P S P S 酵素を含む、グリホサートに対する耐性を示す E P S P S 酵素を発現させることによっても達成し得る。

【 0 0 0 3 】

植物におけるグリホサート耐性の程度は、本質的には、E P S P S 酵素の発現の量と質、すなわち、適切な発生段階での適切な組織における十分な量の E P S P S の発現に基づく。発現の質と量に関するこれらのパラメータは、E P S P S 発現を指示する発現カセットに導入された調節エレメントによって一部調節される。発現カセットにとって不可欠な調節エレメントとしては、プロモーター調節配列およびターミネーター調節配列が挙げられる。発現をさらに増強するために、発現カセットは、以下の、リーダー配列もしくは 5 ' U T R 、シグナルペプチドもしくはトランジットペプチド、または転写アクチベーターエレメントもしくはエンハンサーから選択されるエレメントのうちの 1 つもしくは複数またはその全てを含むこともできる。植物 (特に、アブラナなどの作物植物) におけるグリホサート耐性キメラ遺伝子の発現を改善するために、様々な方法が当技術分野において記載されている。

【 0 0 0 4 】

国際公開第 9 7 / 0 0 4 1 1 4 号パンフレットには、植物を形質転換するためのキメラ遺伝子が記載されている。この遺伝子は、転写方向に、少なくとも 1 つのプロモーター領域と、1 つの導入遺伝子と、急速に増殖する領域でのタンパク質発現を可能にする植物ヒストン遺伝子の非コード 5 ' 領域の少なくとも 1 つのイントロン 1 からなる 1 つの調節領域とを含む。

【 0 0 0 5 】

国際公開第 0 1 / 4 4 4 5 7 号パンフレットには、導入遺伝子 (E P S P S を含む) の発現を増強するための P e F M V プロモーターと組み合わせた様々なアクチンイントロン配列を含む、複数の植物発現コンストラクトが開示されている。

【 0 0 0 6 】

国際公開第 0 7 / 0 9 8 0 4 2 号パンフレットには、a . o . E P S P S 、グリホサートオキシドレダクターゼ (G O X) およびグリホサートアセチルトランスフェラーゼの発現を指示する、単子葉植物プロモーターと E F 1 、 A c t および A S P 遺伝子由来の双子葉植物イントロンとの組合せが記載されている。

【 0 0 0 7 】

E F 1 イントロンと組み合わせた C a M V 3 5 S プロモーターによる C P 4 E P S P S の綿における発現の増強は、 C h e n l a (2 0 0 6 , P l a n t B i o t e c h n o l J . 4 (5) : 4 7 7 - 8 7) によって報告されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】**【0008】**

それでもやはり、作物植物（特に、アブラナ植物）におけるグリホサート耐性のさらなる改善が望ましく、耐性の増加を付与する別のキメラ遺伝子またはその組合せが依然として必要である。

【0009】

本発明は、E P S P S コード領域（例えば、コドン使用頻度がアブラナにおけるコドン使用頻度を反映するように最適化されたE P S P S コード領域）に由来するグリホサート耐性E P S P S 酵素の発現を指示する、構成的プロモーターと置換ヒストンイントロンとの組合せを含む植物を提供することによって当技術分野に大きく貢献するものである。特に、本明細書に記載されているようなコドン使用頻度が最適化されたE P S P S コード領域と組み合わせて、グリホサート耐性キメラ遺伝子にヒストンイントロンを含めることにより、作物植物（特に、アブラナ植物）における効率的なグリホサート耐性を得るための別のアプローチが提供されている。

【0010】

この問題は、様々な実施形態、実施例およびクレームで後述されるように解決される。

【課題を解決するための手段】**【0011】**

一般に、本発明は、植物で発現可能な構成的プロモーターと置換ヒストン遺伝子のイントロン1とによって指示されるグリホサート耐性E P S P S 酵素の発現の質と量を増大させることによってグリホサート耐性が増強された植物に関する。本発明はまた、キメラDNA分子またはキメラ遺伝子、およびグリホサート耐性植物を作製するための本発明の植物の処理方法を提供する。

【0012】

第1の実施形態では、以下の機能的に連結されたDNA断片：

- a) 植物で発現可能な構成的プロモーター；
- b) 5' UTRをコードするDNA領域；
- c) 植物置換ヒストン遺伝子のイントロン1をコードするDNA領域；
- d) トランジットペプチドをコードするDNA領域；
- e) グリホサート耐性5'-エノールピルビルシキミ酸-3'-リン酸シンターゼ(E P S P S)をコードするDNA領域；ならびに
- f) 3' 転写終結およびポリアデニル化領域

を含む、キメラDNA分子を含む植物を提供する。

【0013】

本発明の別の実施形態によれば、植物で発現可能な構成的プロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス(C a M V)35Sプロモーターを含む。

【0014】

さらに別の実施形態では、本発明による植物は、以下の機能的に連結されたDNA断片：

- a) シロイヌナズナ(A r a b i d o p s i s t h a l i a n a)のヒストンH4遺伝子のプロモーター配列；
- b) 植物置換ヒストン遺伝子のイントロン1をコードするDNA領域；
- c) トランジットペプチドをコードするDNA領域；
- d) グリホサート耐性E P S P SをコードするDNA領域；ならびに
- e) 3' 転写終結およびポリアデニル化領域

を含む、第2のキメラDNA分子をさらに含む。

【0015】

さらなる実施形態では、ヒストンH4プロモーター配列は、全長H4A748プロモーター、より具体的には、配列番号6の位置5 9 6 9～6 8 9 0由来のヌクレオチド(n t)配列を含む。

【0016】

別の実施形態によれば、イントロン1をコードするDNA領域は、ジェンバンク受託番号X60429.1またはU09458.1からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0017】

本発明のさらなる実施形態では、グリホサート耐性EPSPSをコードするDNA領域のヌクレオチド配列は、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)のコドン使用頻度に適合している。

【0018】

さらに別の実施形態では、本発明の植物は、アブラナ属植物、より具体的には、アブラナ、さらにより具体的には、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、カブ(*Brassica rapa*)、ハクサイ(*Brassica campestris*)またはカラシナ(*Brassica juncea*)である。

【0019】

本発明はまた、キメラ遺伝子を含む本発明の植物の植物細胞および種子、ならびにキメラDNA分子それ自体ならびにそれらの遺伝子を含むクローニングベクターおよび/または発現ベクターを提供する。

【0020】

本発明はまた、EPSPS阻害除草剤、より具体的には、グリホサートで植物を処理するための方法に関するものであり、ここで、前記植物は、少なくとも2.0kgの活性成分/haの適用に耐性があるが、明らかにより低い濃度の活性成分を適用してもよい。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】パネルA：様々なグリホサート耐性キメラ遺伝子およびその組合せの略図。P35S-2: CaMV 35Sプロモーター；cab22L: ペチュニア(*Petunia hybrida*)由来のクロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子のリーダー配列；TpotPc-1Pc: セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ(*Zea mays*)およびヒマワリ(*Helianthus annuus*)のRuBisCO小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチド；2mEPSPS-1Pa: セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ(*Zea mays*)の二重突然変異体5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ遺伝子；3'nos: pTiT37のT-DNA由来のノパリンシンターゼ遺伝子の3'UTR；Ph4a748-NarI: シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子のプロモーターのNarI断片；イントロン(intron)1h3: シロイヌナズナ(*Arabidopsis*)のヒストンH3.III変異体の遺伝子IIの第1イントロン(intron)；3'his: シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子の3'UTR；Ph4a748: シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子の全長プロモーター。パネルB: 2.0kg/haの活性成分のグリホサートを噴霧して10日後の、本明細書に記載のグリホサート耐性キメラ遺伝子を含むトランスジェニックセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)植物。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明は、構成的プロモーター(例えば、CaMV 35Sプロモーター)を含むキメラ遺伝子に、植物由来の置換ヒストン遺伝子のイントロン1を含めると、そのようなイントロン配列を欠く対応するキメラ遺伝子を含むトランスジェニック植物と比較したとき、そのようなキメラ遺伝子を含むトランスジェニック植物のグリホサート耐性が著しく改善したという観察に基づいている。さらに、本発明者らは、アブラナ植物におけるコドン使用頻度に最適化されたEPSPSコード領域を使用すると、単子葉植物に由来する同様の

E P S P S コード領域を使用した植物の場合よりも良好なグリホサート耐性が得られることを観察した。グリホサート耐性は、プロモーター（例えば、ヒストンH4プロモーター（H4A748））が置換ヒストン遺伝子のイントロン1およびE P S P S コード領域に機能的に連結されている第2のグリホサート耐性キメラ遺伝子を含めることによってさらに改善することができる。H4A748プロモーターの切断されたN a r I 断片と置換ヒストンイントロン1の組合せが、（国際公開第1997/004114号パンフレットに記載されているような）全長H4A748プロモーターと置換ヒストンイントロン1の組合せよりも優れないと記載された以前の観察の科学的報告（Chaubet-Gigotら、2001 Plant Mol Biol. 45(1): 17-30）とは対照的に、全長バージョンのプロモーターは、E P S P S と組み合わせると、切断されたバージョンよりも良好なグリホサート耐性をそのようなキメラ分子を含む植物に付与することが驚くべきことに見出された。

【0023】

したがって、一実施形態では、本発明は、以下の機能的に連結されたD N A 断片：

- a) 植物で発現可能な構成的プロモーター；
- b) 5' UTRをコードするD N A 領域；
- c) 植物置換ヒストン遺伝子のイントロン1をコードするD N A 領域；
- d) トランジットペプチドをコードするD N A 領域；
- e) グリホサート耐性5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ（E P S P S ）をコードするD N A 領域；ならびに
- f) 3' 転写終結およびポリアデニル化領域

を含む、キメラD N A 分子を含むグリホサート耐性植物を提供する。

【0024】

本明細書で使用する場合、「キメラD N A 分子」は、様々な起源の複数の連結されたD N A 断片からなるD N A 分子を意味することが意図される。例として、キメラD N A 分子は、植物のコード配列に連結されたウイルスプロモーターを含むことができる。キメラ遺伝子またはキメラD N A 分子という用語はまた、導入遺伝子または組換えD N A 分子という用語と互換的に使用される。本明細書で使用する場合、キメラ遺伝子、キメラ分子という用語は、様々なエレメントが、そもそも天然ではこの配置で見出されず、人為的に作られるかまたは人為的に作られたD N A 分子を指す。

【0025】

本明細書で使用する場合、「含む（c o m p r i s i n g ）」とは、記載されている特徴、整数、工程または成分の存在を言及されている通りに特定するものと解釈されるべきであるが、1つ以上の特徴、整数、工程もしくは成分、またはそれらの群の存在または追加を除外するものではない。したがって、例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列を含む核酸またはタンパク質は、実際に引用されたものよりも多くのヌクレオチドまたはアミノ酸を含んでいてもよく、すなわち、より大きい核酸またはタンパク質に組み込まれていてもよい。機能的または構造的に規定されたD N A 領域を含むキメラ遺伝子は、さらなるD N A 領域などを含んでいてもよい。

【0026】

「機能的に連結された」という表現は、それらの機能を統合し、コード配列の発現を可能にするような形で、キメラ遺伝子の前記エレメントが互いに連結されていることを意味する。例として、プロモーターは、前記コード配列の転写および最終的な発現を保証することができるとき、コード配列に機能的に連結されている。

【0027】

本明細書で使用する場合、「植物で発現可能な構成的プロモーター」は、ほとんどの細胞型において（空間と時間に依存しない様式で）高レベルの発現を指示する、植物細胞および植物で機能することができるプロモーターである。例として、細菌プロモーター、例えば、アグロバクテリウム（A g r o b a c t e r i u m ）由来のオクトピンシンターゼ（O C S ）プロモーターおよびノパリンシンターゼ（N O S ）プロモーターが挙げられる

が、ウイルスプロモーター、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S または 19S RNA 遺伝子のプロモーター (Ode11ら、1985, *Nature*. 313 (6005) : 810-2)、キャッサバ葉脈モザイクウイルス (CaMV; 国際公開第 97/48819 号パンフレット) のプロモーター、サトウキビ桿菌状バドナウイルス (ScBV) プロモーター (Samacら、2004, *Transgenic Res.* 13 (4) : 349-61)、ゴマノハグサモザイクウイルス (FMV) プロモーター (Sangerら、1990, *Plant Mol. Biol.* 14 (3) : 433-43) およびサブタレニアクローバーウイルスプロモーター No 4 または No 7 (国際公開第 96/06932 号パンフレット) も挙げられる。植物起源のプロモーターの中では、Rubisco 小サブユニットプロモーターのプロモーター (米国特許第 4962028 号明細書)、トウモロコシ、イネおよびサトウキビのユビキチンプロモーター、イネのアクチン 1 プロモーター (Act-1) ならびにトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ 1 プロモーター (Adh-1) (<http://www.patentline.ns.net/daisy/promoters/242.html> から抜粋) について言及する。

【0028】

本発明の別の実施形態によれば、植物で発現可能な構成的プロモーターは、カリフラワー モザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター、より具体的には、ヌクレオチド (nt) 位置 2155 ~ 2573 由来の配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む。

【0029】

インtronは、プレ-mRNA 中には存在するが、正確なスプライシング機構によって切除された後の成熟 RNA には存在しない介在配列である。インtron介在性増強 (IME) とも呼ばれる過程である、遺伝子発現を増強する天然インtronの能力は、哺乳動物、昆虫、線虫および植物を含む様々な生物で知られている (国際公開第 07/098042 号パンフレット、p11~12)。IME は、一般に、転写産物の安定化によって遺伝子発現の増大をもたらす転写後機構として記載されている。インtronは、プロモーターとコード配列の間に通常の配向で位置する必要がある。しかしながら、いくつかのインtronは、翻訳に影響を及ぼし、プロモーターとしてまたは位置および配向非依存的転写エンハンサーとして機能するとも記載されている (Chaubet-Gigotら、2001, *Plant Mol. Biol.* 45 (1) : 17-30, p27-28)。

【0030】

そのようなインtronを含む遺伝子の例としては、トウモロコシのスクロースシンターゼ遺伝子 (Clancy and Hannah, 2002, *Plant Physiol.* 130 (2) : 918-29)、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ-1 (Adh-1) 遺伝子およびブロンズ-1 遺伝子 (Callisら、1987 *Genes Dev.* 1 (10) : 1183-200; Mascarenhasら、1990, *Plant Mol. Biol.* 15 (6) : 913-20)、アルファルファ由来の置換ヒストン H3 遺伝子 (Kelemanら、2002 *Transgenic Res.* 11 (1) : 69-72) ならびにシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のどれか 1 つの置換ヒストン H3 (ヒストン H3.3 様) 遺伝子 (Chaubet-Gigotら、2001, *Plant Mol. Biol.* 45 (1) : 17-30) が挙げられる。

【0031】

本明細書で使用する場合、「植物置換ヒストン遺伝子のインtron 1」は、置換ヒストンをコードする遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR) 中のインtronに関する。複製ヒストンとは対照的に、置換ヒストンは、転写される遺伝子全域のヌクレオソームのクロマチン構造を修復するよう働く (Waterborgら、1993, *J. Biol. Chem.* 268 (7) : 4912-7)。複製ヒストンは、S 期の細胞におけるヌクレオソームの会合を仲介し、そのようなヒストン遺伝子の転写活性化は S 期に制限されている (Atanassovaら、1992, *Plant J.* 1992 2 (3) : 291-30

0)。

【0032】

本発明の別の実施形態によれば、ヒストン置換遺伝子のイントロン1をコードするヌクレオチド配列は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH3. III変異体遺伝子またはムラサキウマゴヤシ (*Medicago sativa*) のヒストンH3. 2遺伝子に由来する。より具体的には、イントロン1をコードするDNA領域は、ジェンバンク受託番号X60429. 1またはU09458. 1(参照により本明細書に組み込まれる)からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでいてもよい。より具体的には、イントロン1をコードするDNA領域は、配列番号9のnt692~1100もしくはnt2984~3064または配列番号10のnt555~668を含む。

【0033】

本発明によれば、「EPSPS」という用語は、その酵素活性が、ホスホエノールピルパート(PEP)および3-ホスホシキマートから5-O-(1-カルボキシビニル)-3-ホスホシキマートを合成することのうちに存在する、任意の天然のまたは突然変異した5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ酵素を意味することが意図される(EC2.5.1.19; Morellら、1967、J. Biol. Chem. 242: 82-90)。特に、前記EPSPS酵素は、どの種類の生物が起源であってもよい。本発明に好適なEPSPS酵素は、ホスホノメチルグリシンファミリーの除草剤に対して(特に、グリホサートに対して)耐性があるという特性も有する。

【0034】

ホスホノメチルグリシンファミリーの除草剤(特に、グリホサート)に対して天然に耐性があるか、またはそのようなものとして使用される、EPSPSをコードする配列が知られている。例として、細菌のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) (Comaiら、1983、Science 221: 370-371)のAroA遺伝子の配列、細菌のアグロバクテリウム属の種 (*Agrobacterium* sp.) のCP4遺伝子の配列(国際公開第92/04449号パンフレット)、またはペチュニアのEPSPS (Shahら、1986、Science 233: 478-481)、トマトのEPSPS (Gasserら、1988、J. Biol. Chem. 263: 4280-4289)、もしくはオシヒバ属のEPSPS(国際公開第01/66704号パンフレット)をコードする遺伝子の配列について言及し得る。

【0035】

突然変異によりグリホサートに対する耐性を持つようになったEPSPSをコードする配列も知られている。例として、突然変異したAroA EPSPS (Stalkerら、1985、J. Biol. Chem. 260(8): 4724-4728)、または突然変異した大腸菌 (*E. coli*) EPSPS (Kahriziら、2007、Plant Cell Rep. 26(1): 95-104)をコードする遺伝子の配列について言及し得る。植物起源の突然変異したEPSPS酵素の例としては、位置80と位置120の間でのアラニンからグリシンへの置換および位置170と位置210の間でのトレオニンからアラニンへの置換を含む二重突然変異体(2m)EPSPS(例えば、欧州特許第0293358号明細書、国際公開第92/06201号パンフレット)と、位置102および位置106にアミノ酸置換を有する様々な二重突然変異体(例えば、米国特許第6566587号明細書、国際公開第04/074443号パンフレット)とが挙げられる。

【0036】

グリホサートに耐性のあるEPSPSをコードする配列としては、国際公開第2008/100353号パンフレット、国際公開第2008/002964号パンフレット、国際公開第2008/002962号パンフレット、国際公開第2007/146980号パンフレット、国際公開第2007/146765号パンフレット、国際公開第2007/082269号パンフレット、国際公開第2007/064828号パンフレットまた

は国際公開第2006/110586号パンフレットに記載されている配列がさらに挙げられる。

【0037】

本発明の別の実施形態によれば、グリホサート耐性EPSPSをコードする遺伝子の配列は、位置102のトレオニンアミノ酸をイソロイシンと置換する第1の突然変異と、位置106のプロリンアミノ酸をセリンと置換する第2の突然変異とを含む、特許出願の欧州特許第0837944号明細書に記載されているトウモロコシEPSPSをコードする配列であってもよい。より具体的には、前記EPSPSをコードするDNA領域は、配列番号8のアミノ酸配列をコードする。EPSPS間に、およびより特には、植物EPSPS間に、強い配列相同意があるため、同じ突然変異を有するイネのEPSPSも、特許出願の国際公開第00/66746号パンフレットおよび国際公開第00/66747号パンフレットに記載されている。一般に、任意のEPSPS、ならびにそれらをコードし、上記のトレオニン/イソロイシン突然変異およびプロリン/セリン突然変異を有する遺伝子(トウモロコシEPSPSの位置102および位置106に対するこれらのアミノ酸の相対的な位置はどうであってもよい)を本発明において使用することができる。この原理を適用するために、当業者であれば、標準的な配列アラインメントの手法を用いて、これらの2つのアミノ酸が任意のEPSPS配列中で突然変異していることを容易に見出すことができるであろう。

【0038】

様々な生物が、しばしば、同じアミノ酸をコードするいくつかのコドンのうちの1つを特に選好することがよく知られている。最適なコドンの存在は、より速い翻訳速度や高い精度を達成するのに役立ち得ると考えられる。Lutzら(2001, Plant Physiol. 125(4): 1585-90)は、コドンを最適化した細菌bar遺伝子のタバコでの発現の増強を報告している。Pengら(2006, Plant Cell Rep. 25(2): 124-32)は、クロコウジカビ(*Aspergillus niger*)由来の導入遺伝子のキャノーラでの発現を、アブラナ属のコドン使用頻度に従って配列を適合させることによって改善することができることを示している。とはいっても、そのような戦略が特定の状況で機能するかどうかは依然として予測不可能である。例えば、国際公開第08/024372号パンフレットには、バシルス・デラミフィカンス(*Bacillus deramificans*)由来のプルラナーゼコード領域のコドンを最適化しても、バシルス・リケニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)でのプルラナーゼ産生は増加しないと報告されている。さらに、Gregersenら(2005, Transgenic Res. 14(6): 887-905)には、コムギでの発現のためにA.フミガーツス(*A. fumigatus*)フィターゼ遺伝子のコドンを最適化しても、全体的な遺伝子発現に大した効果はなかったと記載されている。

【0039】

しかしながら、本明細書に記載されているように、発現しようとするタンパク質をコードする配列を、過剰発現を目的とした植物のコドン使用頻度に従って最適化することにより、植物(例えば、アブラナ植物)におけるグリホサート耐性キメラ遺伝子発現のさらなる改善を達成することができる。

【0040】

したがって、別の実施形態では、グリホサート耐性EPSPSをコードするヌクレオチド配列は、以下の基準を満たすために、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)のコドン使用頻度に最適化されている:

- a) 各アミノ酸のコドン使用頻度の全体的な割合は、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)で見られるような割合に相当する;
- b) ヌクレオチド配列は、54%を上回るAT含量を有する;
- c) ヌクレオチド配列は、5'もしくは3'の隠れたスプライス部位またはAAGGT、AAGT、AAGGTA、AGGTAもしくはTGCAGからなる群から選択される

ヌクレオチド配列を含まない；ならびに

d) ヌクレオチド配列は、ポリアデニル化シグナルまたはC A T A A A、A A C C A A、A T T A A T、A A A A T A、A A T T A A、A A T A C A からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含まない。

【0041】

クローニング目的で、上述の基準を依然として満たしながらも、ヌクレオチド配列を特定の制限酵素の認識配列の有無に関して修飾し得ることが当業者には明白となるであろう。

【0042】

特定の実施形態によれば、グリホサート耐性E P S P S をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1のn t 800 ~ 2137 を含む。

【0043】

上述の基準を依然として満たし、100 n t、75 n t、50 n t、40 n t、30 n t、20 n t、10 n t または5 n t 違いでグリホサート耐性E P S P S 酵素を依然としてコードしながらも、例示されたヌクレオチド配列をさらに修飾し得ることが当業者には明白となるであろう。

【0044】

したがって、別の実施形態では、グリホサート耐性E P S P S をコードするヌクレオチド配列は、セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に最適化されている。

【0045】

より具体的には、前記E P S P S をコードするD N A 領域は、配列番号1のn t 800 ~ 2137 を含む。

【0046】

別の実施形態では、本発明の植物は、機能的に連結されたそのキメラD N A 分子中に、5' 非翻訳領域 (UTR) をコードするD N A 領域をさらに含む。

【0047】

本明細書で使用する場合、5' UTR (リーダー配列とも呼ばれる) は、転写開始部位とコード領域の開始コドンの間に位置する、メッセンジャーRNA (mRNA) の特定の領域である。5' UTRは、mRNAの安定性および翻訳効率に関与する。例えば、35S転写開始部位の下流にあるペチュニアのクロロフィルa / b 結合タンパク質遺伝子の5' 非翻訳リーダーを利用して、レポーター遺伝子発現の定常状態レベルを増大させることができる (Harps terら、1988、Mol Gen Genet. 212 (1) : 182 - 90)。国際公開第95/006742号パンフレットには、導入遺伝子発現を増加させるための、熱ショックタンパク質をコードする遺伝子に由来する5' 非翻訳リーダー配列の使用が記載されている。

【0048】

本発明のさらなる実施形態では、5' UTRをコードするD N A 領域は、ペチュニア (Petunia hybrida) 由来のクロロフィルa / b 結合タンパク質遺伝子のリーダー配列、より具体的には、配列番号2のn t 2086 ~ 2154 を含んでいてもよい。

【0049】

本発明によれば、キメラD N A 分子は、トランジットペプチドまたはシグナルペプチドをコードする細胞内アドレス指定配列も含む。E P S P S をコードする核酸配列の上流または下流にあるそのような配列によって、前記E P S P S を宿主生物の細胞区画に特異的に向けることが可能になる。

【0050】

特定の実施形態によれば、トランジットペプチドは、転写の方向に、プラスチドへのポリペプチドの輸送を指示するシグナルペプチドをコードする植物遺伝子の少なくとも1つのシグナルペプチド配列と、第1のシグナルペプチドがタンパク質分解酵素によって切断

されたときに產生される植物遺伝子の成熟N末端部分の配列の一部と、次に、プラスチドの亜区画へのポリペプチドの輸送を指示するシグナルペプチドをコードする植物遺伝子の第2のシグナルペプチドとを含む。シグナルペプチド配列は、好ましくは、欧州特許第0508909号明細書によるリブロース-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)の小サブユニットの遺伝子に由来する。より具体的には、トランジットペプチドをコードするDNA領域は、配列番号7のアミノ酸配列をコードする。

【0051】

さらに別の実施形態によれば、トランジットペプチドをコードするヌクレオチド配列も、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)のコドン使用頻度に最適化されており、より具体的には、配列番号1のnt2138~2509を含む。

【0052】

本発明に従って使用することができる特定の転写終結およびポリアデニル化領域は重要ではなく、同様の効果を伴って、当技術分野で公知の任意のそのような配列を使用し得ると考えられる。非限定的な例として、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)のノパリンシンターゼをコードする遺伝子のnosターミネーター配列(Bevansら、1983、*Nucleic Acids Res.* 11(2):369-385)、または出願の欧州特許第0633317号明細書に記載されているようなヒストン遺伝子のhisターミネーター配列が言及されている。

【0053】

本発明はまた、以下の機能的に連結されたDNA断片；
a) シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子のプロモーター配列；
b) 植物置換ヒストン遺伝子のイントロン1をコードするDNA領域；
c) トランジットペプチドをコードするDNA領域；
d) グリホサート耐性EPSPSをコードするDNA領域；ならびに
e) 3'転写終結およびポリアデニル化領域
を含む、第2のキメラDNA分子をさらに含む植物に関する。

【0054】

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子(H4A748)のプロモーターは、S期および分裂組織に特異的なパターンで強く選択的な発現を駆動する一方、非分裂細胞では基本的発現を維持する(Atanassovら、1992、*Plant J.* 1992 2(3):291-300)。しかしながら、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のどれか1つの置換ヒストンH3遺伝子の5'UTRイントロンをこの細胞周期依存的プロモーターに付加すると、高く、分裂組織非依存的なレポーター遺伝子発現が生じる。特に、このプロモーターの切断されたNarI断片をイントロン1と組み合わせると、このイントロンを有する全長H4A748プロモーターよりも3~4倍も高いレポーター遺伝子発現レベルが芽および根で誘導される(Chaubet-Gigotら、2001 *Plant Mol Biol.* 45(1):17-30、図4)。

【0055】

別の実施形態によれば、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子のプロモーター配列は、全長H4A748配列、より具体的には、配列番号6のnt5969~6890を含む。

【0056】

さらなる実施形態では、第2のキメラDNA分子はまた、植物置換ヒストン遺伝子のイントロン1をコードするDNA領域と、トランジットペプチドをコードするDNA領域と、グリホサート耐性EPSPSをコードするDNA領域と、3'転写終結およびポリアデニル化領域とを含む。これらのDNA領域は、本出願中の別の場所に記載されているものと同様である。

【0057】

別の実施形態によれば、本発明の植物は、アブラナ属植物、より好ましくは、アブラナ植物である。本明細書で使用する場合、「アブラナ」とは、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、カブ(*Brassica rapa*)、ハクサイ(*Brassica campestris*)またはカラシナ(*Brassica juncea*)のうちのいずれか1つの種を指す。

【0058】

しかしながら、本明細書に記載の方法および手段は、全ての植物細胞および植物、すなわち、限定するものではないが、綿、アブラナ属野菜、アブラナ、コムギ、トウキビまたはトウモロコシ、オオムギ、アルファルファ、ラッカセイ、サンフラワー、イネ、オートムギ、サトウキビ、ダイズ、シバクサ、オオムギ、ライムギ、ソルガム、サトウキビ、野菜(チコリ、レタス、トマト、ズッキーニ、ピーマン、ナス、キュウリ、メロン、タマネギ、ニラネギを含む)、タバコ、ジャガイモ、テンサイ、パパイヤ、パイナップル、マンゴー、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)をはじめとする、双子葉植物細胞と单子葉植物細胞の両方および双子葉植物と单子葉植物の両方、それだけでなく、園芸、草花栽培または林業で使用される植物(ポプラ、モミ、ユーカリなど)にも好適であると考えられることが当業者には明白となるであろう。

【0059】

本発明によるキメラDNA分子を含む植物細胞を提供することも本発明の実施形態である。本発明のキメラDNA分子を含む植物の配偶子、種子、胚(接合胚または体細胞胚のいずれか)、子孫または交配種は、伝統的な育種方法で產生されるが、これらもまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0060】

本発明の別の目的は、本明細書に記載されるようなキメラDNA分子またはそのようなキメラDNA分子を含む、植物の形質転換用のクローニングベクターおよび/もしくは発現ベクターである。

【0061】

本発明によるキメラDNA分子を従来の方法で单一の植物細胞の核ゲノムに安定に挿入することができ、また、そのように形質転換された植物細胞を従来の方法で用いて、グリホサート耐性が増強した形質転換植物を產生することができる。この点について、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)中の、キメラDNA分子を含むT-DNAベクターを用いて植物細胞を形質転換し、その後、例えば、欧州特許第0116718号明細書、欧州特許第0270822号明細書、国際公開第84/02913号パンフレットおよび公開されている欧州特許出願の欧州特許第0242246号明細書ならびにGouldら(1991、Plant Physiol. 95(2): 426-434)に記載されている手順を用いて、形質転換植物を形質転換植物細胞から再生させることができる。アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)を介する植物形質転換用のT-DNAベクターの構築は当技術分野で周知である。T-DNAベクターは、欧州特許第0120561号明細書および欧州特許第0120515号明細書に記載されているようなバイナリーベクターまたはアグロバクテリウム(*Agrobacterium*)のTi-プラスミドに相同組換えによって組み込むことができる、欧州特許第0116718号明細書に記載されているようなコインテグレートベクターのいずれかであってもよい。好ましいT-DNAベクターは、各々、T-DNAの境界配列と境界配列の間の転写されるDNA領域に機能的に連結されているかまたは少なくとも右側の境界配列の左側にあるプロモーターを含む。境界配列は、Gieleんら(1984、EMBO J. 3(4): 835-46)に記載されている。アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)へのT-DNAベクターの導入は、既知の方法(例えば、エレクトロポレーションまたは三親接合)を用いて行なうことができる。当然ながら、他の種類のベクターを用いて、直接的な遺伝子転移(例えば、欧州特許第023247号明細書に記載されているもの)、花粉を介する形質転換(例えば、欧州特許

第0270356号明細書および国際公開第85/01856号パンフレットに記載されているもの)、プロトプラスト形質転換(例えば、米国特許第4684611号明細書に記載されているもの)、植物RNAウイルスを介する形質転換(例えば、欧州特許第0067553号明細書および米国特許第4407956号明細書に記載されているもの)、リポソームを介する形質転換(例えば、米国特許第4536475号明細書に記載されているもの)、ならびに他の方法(例えば、最近記載された、トウキビ(例えば、米国特許第6140553号明細書; Frommら、1990、Biotechnology (NY) . 8 (9) : 833-9; Gordon-Kammら、1990, Plant Cell 11. 1990 2 (7) : 603-618)およびイネ(Shimamotoら、1989、Tanpakushitsu Kakusan Koso. 34 (14) : 1873-8)の特定の系統を形質転換するための方法および一般に単子葉植物を形質転換するための方法(国際公開第92/09696号パンフレット))などの手順を用いて、植物細胞を形質転換することができる。綿の形質転換については、PCT国際公開第00/71733号パンフレットに記載されている方法が特に好ましい。イネの形質転換については、国際公開第92/09696号パンフレット、国際公開第94/00977号パンフレットおよび国際公開第95/06722号パンフレットに記載されている方法を参照されたい。得られる形質転換植物を従来の植物育種スキームで用いて、グリホサート耐性が増大したより多くの形質転換植物を產生することができる。

【0062】

別の実施形態では、EPSPS阻害除草剤、より具体的には、グリホサートで本発明の植物を処理するための方法を提供する。さらにより具体的には、本方法の植物は、2.0 kg/haのグリホサートの適用に対して耐性がある。

【0063】

別の実施形態では、グリホサート耐性植物を得るための本発明のキメラDNA分子の使用を提供する。

【0064】

本発明による植物を以下の化学的化合物のうちの少なくとも1つで処理し得る。本発明による植物および種子を以下のリストから選択される化学的化合物などの化学的化合物でさらに処理し得る:

a. 果実/野菜除草剤: アトラジン、プロマシル、ジウロン、グリホサート、リニュロン、ミトリブジン、シマジン、トリフルラリン、フルアジホップ、グルホシナート、ハロスルフロン・ゴーワン(Halosulfuron-Gowan)、パラコート、プロピザミド、セトキシジム、ブタフェナシル、ハロスルフロン、インダジフラム

b. 果実/野菜用殺虫剤: アルジカルブ、バシリス・チューリングンシス(Bacillus thuringiensis)、カルバリル、カルボフラン、クロルピリホス、シペルメトリン、デルタメトリン、アバメクチン、シフルトリン/-シフルトリン、エスフェンバレラート、-シハロトリン、アセキノシル、ビフェナザート、メトキシフェノジド、ノバルロン、クロマフェノジド、チアクロブリド、ジノテフラン、フルアクリピリム、スピロジクロフェン、-シハロトリン、スピロメシフェン、スピノサド、リナキシビル、シアジビル、トリフルムロン、スピロテトラマト、イミダクロブリド、フルベンジアミド、チオジカルブ、メタフルミゾン、スルホキサフロール、シフルメトフェン、シアノピラフェン、クロチアニジン、チアメトキサム、スピノトラム、チオジカルブ、フロニカミド、メチオカルブ、エマメクチン安息香酸塩、インドキサカルブ、フェナミホス、ピリプロキシフェン、酸化フェンブタスズ

c. 果実/野菜用殺菌剤: アメトクトラジン、アゾキシストロビン、ベンチアバリカルブ、ボスカリド、キャプタン、カルベンダジム、クロロタロニル、銅、シアゾファミド、シフルフェナミド、シモキサニル、シプロコナゾール、シプロジニル、ジフェノコナゾール、ジメトモルフ、ジチアノン、フェナミドン、フェンヘキサミド、フルアジナム、フルジオキソニル、フルオピコリド、フルオピラム、フルオキサストロビン、フルキサピロキサド、ホルペット、ホセチル、イプロジオン、イプロバリカルブ、イソピラザム、クレソ

キシムメチル、マンコゼブ、マンジプロパミド、メタラキシル／メフェノキサム、メチラム、メトラフェノン、ミクロブタニル、ベンコナゾール、ベンチオピラド、ピコキシストロビン、プロパモカルブ、プロピコナゾール、プロビネブ、プロキナジド、プロチオコナゾール、ピラクロストロビン、ピリメタニル、キノキシフェン、スピロキサミン、硫黄、テブコナゾール、チオファナートメチル、トリフロキシストロビン

d. 谷物用除草剤：2.4-d、アミドスルフロン、プロモキシニル、カルフェントラゾン - e、クロロトルロン、クロルスルフロン、クロジナホップ - p、クロピラリド、ジカンバ、ジクロホップ - m、ジフルフェニカン、フェノキサプロップ、フロラスラム、フルカルバゾン - n a、フルフェナセット、フルピルスルフロン - m、フルロキシピル、フルルタモン、グリホサート、ヨードスルフロン、イオキシニル、イソプロチュロン、m c p a、メソスルフロン、メツルフロン、ベンジメタリン、ピノキサデン、プロポキシカルバゾン、プロスルホカルブ、ピロキシラム、スルホスルフロン、チフェンスルフロン、トラルコキシジム、トリアスルフロン、トリベヌロン、トリフルラリン、トリトスルフロン

e. 谷物用殺菌剤：アゾキシストロビン、ビキサフェン、ボスカリド、カルベンダジム、クロロタロニル、シフルフェナミド、シプロコナゾール、シプロジニル、ジモキシストロビン、エポキシコナゾール、フェンプロピジン、フェンプロピモルフ、フルオピラム、フルオキサストロビン、フルキンコナゾール、フルキサピロキサド、イソピラザム、クレスキシムメチル、メトコナゾール、メトラフェノン、ベンチオピラド、ピコキシストロビン、プロクロラズ、プロピコナゾール、プロキナジド、プロチオコナゾール、ピラクロストロビン、キノキシフェン、スピロキサミン、テブコナゾール、チオファナートメチル、トリフロキシストロビン

f. 谷物用殺虫剤：ジメトアート、 - シハルトリントリン、 - デルタメトリン、 - シペルメトリン、 - シフルトリントリン、ビフェントリン、イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、アセタミプリド、ジネットフラン、クロルフィリホス、ピリミカルブ、メチオカルブ、スルホキサフルホール

g. トウモロコシ用除草剤：アトラジン、アラクロール、プロモキシニル、アセトクロール、ジカンバ、クロピラリド、(S-)ジメテナミド、グルフォシナート、グリホサート、イソキサフルトール、(S-)メトラクロール、メソトリオン、ニコスルフロン、プリミスルフロン、リムスルフロン、スルコトリオン、ホラムスルフロン、トプラメゾン、テンボトリオン、サフルフェナシル、チエンカルバゾン、フルフェナセット、ピロキサスルホン

h. トウモロコシ用殺虫剤：カルボフラン、クロルピリホス、ビフェントリン、フィプロニル、イミダクロプリド、 - シハロトリントリン、テフルトリントリン、テルブホス、チアメトキサム、クロチアニジン、スピロメシフェン、フルベンジアミド、トリフルムロン、リナキシピル、デルタメトリン、チオジカルブ、 - シフルトリントリン、シペルメトリン、ビフェントリン、ルフェヌロン、テブピリンホス、エチプロール、シアジピル、チアクロプリド、アセタミプリド、ジネットフラン、アベルメクチン

i. トウモロコシ用殺菌剤：アゾキシストロビン、ビキサフェン、ボスカリド、シプロコナゾール、ジモキシストロビン、エポキシコナゾール、フェニトロパン、フルオピラム、フルオキサストロビン、フルキサピロキサド、イソピラザム、メトコナゾール、ベンチオピラド、ピコキシストロビン、プロピコナゾール、プロチオコナゾール、ピラクロストロビン、テブコナゾール、トリフロキシストロビン

j. イネ用除草剤：ブタクロール、プロパニル、アジムスルフロン、ベンスルフロン、シハロホップ、ダイムロン、フェントラザミド、イマゾスルフロン、メフェナセット、オキサジクロメホン、ピラゾスルフロン、ピリブチカルブ、キンクロラック、チオベンカルブ、インダノファン、フルフェナセット、フェントラザミド、ハロスルフロン、オキサジクロメホン、ベンゾビシクロロン、ピリフタリド、ペノキスラム、ビスピリバック、オキサジアルギル、エトキシスルフロン、プレチラクロール、メソトリオン、テフリルトリオン、オキサジアゾン、フェノキサプロップ、ピリミスルファン

k. イネ用殺虫剤：ダイアジノン、フェノブカルブ、ベンフラカルブ、ブプロフェジン、ジノテフラン、フィプロニル、イミダクロプリド、イソプロカルブ、チアクロプリド、クロマフェノジド、クロチアニジン、エチプロール、フルベンジアミド、リナキシピル、デルタメトリン、アセタミプリド、チアメトキサム、シアジビル、スピノサド、スピノトラム、エマメクチン安息香酸塩、シペルメトリン、クロルピリホス、エトフェンプロックス、カルボフラン、ベンフラカルブ、スルホキサフロール

l. イネ用殺菌剤：アゾキシストロビン、カルベンダジム、カルプロパミド、ジクロシメット、ジフェノコナゾール、エジフェンホス、フェリムゾン、ゲンタマイシン、ヘキサコナゾール、ヒメキサゾール、イプロベンホス (IBP)、イソプロチオラン、イソチアニル、カスガマイシン、マンコゼブ、メトミノストロビン、オリサストロビン、ベンシクリン、プロベナゾール、プロピコナゾール、プロピネブ、ピロキロン、テブコナゾール、チオファナートメチル、チアジニル、トリシクラゾール、トリフロキシストロビン、バリダマイシン

m. 縄用除草剤：ジウロン、フルオメツロン、MSMA、オキシフルオルフェン、プロメトリン、トリフルラリン、カルフェントラゾン、クレトジム、フルアジホップブチル、グリホサート、ノルフルラゾン、ベンジメタリン、ピリチオバッカナトリウム、トリフロキシスルフロン、テプラロキシジム、グルフォシナート、フルミオキサジン、チジアズロン

n. 縄用殺虫剤：アセファート、アルジカルブ、クロルピリホス、シペルメトリン、デルタメトリン、アバメクチン、アセタミプリド、エマメクチン安息香酸塩、イミダクロプリド、インドキサカルブ、-シハロトリン、スピノサド、チオジカルブ、-シハロトリン、スピロメシフェン、ピリダリル、フロニカミド、フルベンジアミド、トリフルムロン、リナキシピル、-シフルトリン、スピロテトラマト

o. クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、ジネットフラン、フルベンジアミド、シアジビル、スピノサド、スピノトラム、-シハロトリン、4-[[(6-クロルピリジン-3-イル)メチル](2,2-ジフルオロエチル)アミノ]フラン-2(5H)-オン、チオジカルブ、アベルメクチン、フロニカミド、ピリダリル、スピロメシフェン、スルホキサフロール

p. 縄用殺菌剤：アゾキシストロビン、ビキサフェン、ボスカリド、カルベンダジム、クロロタロニル、銅、シプロコナゾール、ジフェノコナゾール、ジモキシストロビン、エポキシコナゾール、フェナミドン、フルアジナム、フルオピラム、フルオキサストロビン、フルキサピロキサド、イプロジオン、イソピラザム、イソチアニル、マンコゼブ、マンネブ、メトミノストロビン、ベンチオピラド、ピコキシストロビン、プロピネブ、プロチオコナゾール、ピラクロストロビン、キントゼン、テブコナゾール、テトラコナゾール、チオファナートメチル、トリフロキシストロビン

q. ダイズ用除草剤：アラクロール、ベンタゾン、トリフルラリン、クロリムロンエチル、クロランスラムメチル、フェノキサプロップ、ホメサフェン、フルアジホップ、グリホサート、イマザモックス、イマザキン、イマゼタビル、(S-)メトラクロール、ミトリブジン、ベンジメタリン、テプラロキシジム、グルフォシナート

r. ダイズ用殺虫剤：-シハロトリン、メソミル、イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロプリド、アセタミプリド、ジネットフラン、フルベンジアミド、リナキシピル、シアジビル、スピノサド、スピノトラム、エマメクチン安息香酸塩、フィプロニル、エチプロール、デルタメトリン、-シフルトリン、-シハロトリンおよび-シハロトリン、4-[[(6-クロルピリジン-3-イル)メチル](2,2-ジフルオロエチル)アミノ]フラン-2(5H)-オン、スピロテトラマト、スピノジクロフェン、トリフルムロン、フロニカミド、チオジカルブ、-シフルトリン

s. ダイズ用殺菌剤：アゾキシストロビン、ビキサフェン、ボスカリド、カルベンダジム、クロロタロニル、銅、シプロコナゾール、ジフェノコナゾール、ジモキシストロビン、エポキシコナゾール、フルアジナム、フルオピラム、フルオキサストロビン、フルトリニアホール、フルキサピロキサド、イソピラザム、イプロジオン、イソチアニル、マンコゼブ

ブ、マンネブ、メトコナゾール、メトミノストロビン、ミクロブタニル、ペンチオピラド、ピコキシストロビン、プロピコナゾール、プロピネブ、プロチオコナゾール、ピラクロストロビン、テブコナゾール、テトラコナゾール、チオファナートメチル、トリフロキシストロビン

t. テンサイ用除草剤：クロリダゾン、デスマジファム、エトフメサート、フェンメジファム、トリアラート、クロピラリド、フルアジホップ、レナシル、メタミトロン、キンメラック、シクロキシジム、トリフルスルフロン、テプラロキシジム、キザロホップ

u. テンサイ用殺虫剤：イミダクロブリド、クロチアニジン、チアメトキサム、チアクロブリド、アセタミブリド、ジネットフラン、デルタメトリン、-シフルトリン、-/シハロトリン、4-[[(6-クロルピリジン-3-イル)メチル](2,2-ジフルオロエチル)アミノ]フラン-2(5H)-オン、テフルトリン、リナキシビル、シアキシビル、フィプロニル、カルボフラン

v. キャノーラ用除草剤：クロピラリド、ジクロホップ、フルアジホップ、グルフォシナート、グリホサート、メタザクロール、トリフルラリン、エタメツルフロン、キンメラック、キザロホップ、クレトジム、テプラロキシジム

w. キャノーラ用殺菌剤：アゾキシストロビン、ビキサフェン、ボスカリド、カルベンダジム、シプロコナゾール、ジフェノコナゾール、ジモキシストロビン、エポキシコナゾール、フルアジナム、フルオピラム、フルオキサストロビン、フルシラゾール、フルキサピロキサド、イプロジオン、イソピラザム、メピコートクロリド、メトコナゾール、メトミノストロビン、パクロブトラゾール、ペンチオピラド、ピコキシストロビン、プロクロラズ、プロチオコナゾール、ピラクロストロビン、テブコナゾール、チオファナートメチル、トリフロキシストロビン、ビンクロゾリン

x. キャノーラ用殺虫剤：カルボフラン、チアクロブリド、デルタメトリン、イミダクロブリド、クロチアニジン、チアメトキサム、アセタミブリド、ジネットフラン、-シフルトリン、-シハロトリンおよび-シハロトリン、タウ-フルバレリアート、エチプロール、スピノサド、スピノトラム、フルベンジアミド、リナキシビル、シアジビル、4-[[(6-クロルピリジン-3-イル)メチル](2,2-ジフルオロエチル)アミノ]フラン-2(5H)-オン。

【0065】

特に、アブラナ属植物を、上記のリストでキャノーラ用除草剤、キャノーラ用殺菌剤またはキャノーラ用殺虫剤として示された化合物のうちの少なくとも1つを適用することによって処理し得る。

【0066】

本発明はさらに、グリホサート抵抗性アブラナ属植物およびその種子を产生するプロセスであって、本明細書に記載されているような1つまたは2つのキメラDNA分子を含む植物細胞から本質的になる植物を、別の植物またはそれ自身と交配する工程を含むプロセスを提供し、ここで、このプロセスは、本発明によるキメラ遺伝子を含む子孫植物もしくは種子を同定もしくは選択すること、および/または有効量のEPSPS阻害化合物（例えば、グリホサート）を適用すること、ならびに種子を収穫することをさらに含み得る。

【0067】

また、本発明によるキメラ遺伝子を含むアブラナ属植物から油または種子ミールを产生する方法であって、アブラナ植物の種子から油を抽出し、処理するための当技術分野で公知の工程を含む方法を提供する。

【0068】

本発明はまた、植物（特に、アブラナ属植物）におけるグリホサート耐性を増大させるためのプロセスであって、本出願の別の場所に記載されているようなキメラ遺伝子を含むアブラナ属植物を得る工程、および前記アブラナ属植物を野外で植える工程を含むプロセスを提供する。

【0069】

以下の非限定的な実施例には、本発明による植物における除草剤耐性を増大させるため

の方法および手段が記載されている。実施例において特に明記しない限り、全ての組換えDNA技術は、Sambrookら(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NYならびにAusubelら(1994) Current Protocols in Molecular Biology、Current Protocols, USAの第1巻および第2巻に記載されているような標準的なプロトコルに従って行なわれる。植物分子研究のための標準的な材料および方法は、BIOS Scientific Publications Ltd(UK)とBlackwell Scientific Publications, UKによって共同出版された、R.D.D.Croy著、Plant Molecular Biology Labfax(1993)に記載されている。標準的な分子生物学の技術についての他の参考文献としては、Sambrook and Russell(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY、Brown(1998) Molecular Biology LabFax、第2版、Academic Press(UK)の第I巻および第II巻が挙げられる。ポリメラーゼ連鎖反応のための標準的な材料および方法は、Dieffenbach and Dveksler(1995) PCR Primer: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、およびMcPhersonら(2000) PCR-Basics: From Background to Bench、初版、Springer Verlag, Germanyに見出すことができる。

【0070】

説明および実施例を通して、以下の配列を参照する：

配列番号1：ベクターpTJN47のT-DNAのヌクレオチド配列
 配列番号2：ベクターpTJN50のT-DNAのヌクレオチド配列
 配列番号3：ベクターpTJN51のT-DNAのヌクレオチド配列
 配列番号4：ベクターpTJN48のT-DNAのヌクレオチド配列
 配列番号5：ベクターpTJN49のT-DNAのヌクレオチド配列
 配列番号6：ベクターpTJN75のT-DNAのヌクレオチド配列
 配列番号7：最適化されたトランジットペプチドTPotp C-1Pcのアミノ酸配列
 配列番号8：2mEPSPS-1Paのアミノ酸配列
 配列番号9：シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)のH3.3様ヒストン変異体のH3遺伝子1およびH3遺伝子2のヌクレオチド配列(X60429.1)
 配列番号10：ムラサキウマゴヤシ(Medicago sativa)の栽培品種の主要なヒストンH3.2遺伝子のヌクレオチド配列(U09458.1)

【実施例】

【0071】

実施例1：キメラDNA分子の構築

図1Aに、本発明によるキメラDNA分子の例を示す。これらの分子は、アセンブルすることができる唯一のコンストラクトとみなされるべきものではなく、当業者に対する例としてのみ役立つものである。

【0072】

従来の組換えDNA技術を用いて、以下の機能的に連結されたDNA断片を含む以下のT-DNA発現ベクター(pTJN47、pTJN50、pTJN51、pTJN48、pTJN49、pTJN75)を構築した。

【0073】

pTJN47

a) Ph4a748-NarI: シロイヌナズナ(Arabidopsis thal

i a n a) のヒストン H 4 遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (Chabouteら、1987、Plant Mol. Biol. 8、179-191)

b) イントロン 1 h3At : シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) のヒストン H 3. III 变異体の遺伝子 II の第 1 イントロンを含む配列 (Chabot ら、1992、J. Mol. Biol. 225: 569-574)

c) T Pot p C - 1 P c : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrun ら (1996、米国特許第 5,510,471 号明細書) によって記載されているような、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) およびヒマワリ (Helianthus annuus) (サンフラワー) の RuBisCO 小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

d) 2mepsp - 1 Pa : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) の二重突然変異体 5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列 (Lebrun ら、1997、国際公開第 9704103 号パンフレット)

e) 3' his : シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) のヒストン H 4 遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む配列 (Chaboute ら、1987、前掲)

【0074】

ベクター pTJN47 の T - DNA のヌクレオチド配列は配列番号 1 に示されている。

【0075】

pTJN50

a) P35S2 : カリフラワーモザイクウイルス 35S 転写産物のプロモーター領域を含む配列 (Ode11 ら、1985)

b) 5' cab22L : ペチュニア (Petunia hybrida) 由来のクロロフィル a / b 結合タンパク質遺伝子のリーダー配列を含む配列 (Harpsater ら、1988)

c) T Pot p C - 1 P c : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrun ら (1996) によって記載されているような、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) およびヒマワリ (Helianthus annuus) (サンフラワー) の RuBisCO 小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

d) 2mepsp - 1 Pa : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) (Lebrun ら、1997) の二重突然変異体 5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

e) 3' nos : pTiT37 の T - DNA 由来のノパリンシンターゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む配列 (Depicker ら、1982)

【0076】

ベクター pTJN50 の T - DNA のヌクレオチド配列は配列番号 2 に示されている。

【0077】

pTJN48

a) Ph4a748 - NarI : シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) のヒストン H 4 遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (Chaboute ら、1987)

b) イントロン 1 h3At : シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) のヒストン H 3. III 变異体の遺伝子 II の第 1 イントロンを含む配列 (Chabot ら、1992)

c) T Pot p C - 1 P c : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrun ら (1996) によって記載されているような、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) およびヒマワリ (Helianthus

us annuus) (サンフラワー) の RuBisCO 小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

d) 2mepspss-1Pa : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) (Lebrunら、1997) の二重突然変異体 5'-エノールピルビルシキミ酸-3'-リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

e) 3'his : シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) のヒストン H4 遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む配列 (Chabouteら、1987)

f) P35S2 : カリフラワー モザイクウイルス 35S 転写産物のプロモーター領域を含む配列 (Ode11ら、1985)

g) 5'cab22L : ベチュニア (Petunia hybrida) 由来のクロロフィル a / b 結合タンパク質遺伝子のリーダー配列を含む配列 (Harpsaterら、1988)

h) TProtP C-1Pc : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrun ら (1996) によって記載されているよう、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) およびヒマワリ (Helianthus annuus) (サンフラワー) の RuBisCO 小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

i) 2mepspss-1Pa : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) (Lebrun ら、1997) の二重突然変異体 5'-エノールピルビルシキミ酸-3'-リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

j) 3'nos : pTiT37 の T-DNA 由来のノパリンシンターゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む配列 (Depicker ら、1982)

【0078】

ベクター pTJN48 の T-DNA のヌクレオチド配列は配列番号 3 に示されている。

【0079】

pTJN51

a) P35S2 : カリフラワー モザイクウイルス 35S 転写産物のプロモーター領域を含む配列 (Ode11 ら、1985)

b) 5'cab22L : ベチュニア (Petunia hybrida) 由来のクロロフィル a / b 結合タンパク質遺伝子のリーダー配列を含む配列 (Harpsater ら、1988)

c) イントロン 1 h3At : シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) のヒストン H3.1 1 1 变異体の遺伝子 1 1 の第 1 イントロンを含む配列 (Chababet ら、1992)

d) TProtP C-1Pc : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrun ら (1996) によって記載されているよう、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) およびヒマワリ (Helianthus annuus) (サンフラワー) の RuBisCO 小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

e) 2mepspss-1Pa : セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (Zea mays) (トウキビ) (Lebrun ら、1997) の二重突然変異体 5'-エノールピルビルシキミ酸-3'-リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

f) 3'nos : pTiT37 の T-DNA 由来のノパリンシンターゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む配列 (Depicker ら、1982)

【0080】

ベクター pTJN51 の T-DNA のヌクレオチド配列は配列番号 4 に示されている。

【0081】

p T J N 4 9

a) Ph 4 a 7 4 8 - Nar I : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (Chabouteら、1987)

b) イントロン1 h 3 A t : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH3. III変異体の遺伝子IIの第1イントロンを含む配列 (Chabotetら、1992)

c) T P o t p C - 1 P c : セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrunら (1996) によって記載されているような、トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) およびヒマワリ (*Helianthus annuus*) (サンフラワー) のRuBisCO小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

d) 2 m e p s p s - 1 P a : セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) (Lebrunら、1997) の二重突然変異体5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

e) 3' his : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列 (Chabouteら、1987)

f) P 3 5 S 2 : カリフラワー-モザイクウイルス35S転写産物のプロモーター領域を含む配列 (Odel1ら、1985)

g) 5' c a b 2 2 L : ペチュニア (*Petunia hybrida*) 由来のクロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子のリーダー配列を含む配列 (Harpsterら、1988、上掲)

h) イントロン1 h 3 A t : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH3. III変異体の遺伝子IIの第1イントロンを含む配列 (Chabotetら、1992)

i) T P o t p C - 1 P c : セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrunら (1996) によって記載されているような、トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) およびヒマワリ (*Helianthus annuus*) (サンフラワー) のRuBisCO小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

j) 2 m e p s p s - 1 P a : セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) (Lebrunら、1997) の二重突然変異体5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

k) 3' nos : pTiT37のT-DNA由来のノバリンシンターゼ遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列 (Depickerら、1982)

【0082】

ベクター-pTJN49のT-DNAのヌクレオチド配列は配列番号5に示されている。

【0083】

p T J N 7 5

a) Ph 4 a 7 4 8 : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (Chabouteら、1987)

b) イントロン1 h 3 A t : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH3. III変異体の遺伝子IIの第1イントロンを含む配列 (Chabotetら、1992)

c) T P o t p C - 1 P c : セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrunら (1996) によって記載されているような、トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) およびヒマワリ (*Helianthus annuus*) (サンフラワー) のRuBisCO小サブユニット遺伝子の配列を

含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

d) 2mepspss-1Pa : セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) (Lebrunら、1997) の二重突然変異体 5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸シターゼ遺伝子のコード配列

e) 3'his : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列 (Chabouteら、1987)

f) P35S2 : カリフラワー-モザイクウイルス 35S 転写産物のプロモーター領域を含む配列 (Odel1ら、1985)

g) 5'cab22L : ペチュニア (*Petunia hybrida*) 由来のクロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子のリーダー配列を含む配列 (Harpssterら、1988)

h) イントロン1 h3At : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH3.III変異体の遺伝子IIの第1イントロンを含む配列 (Chabrebetら、1992)

i) TPotp C-1Pc : セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合させた、Lebrunら (1996) によって記載されているよう、トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) およびヒマワリ (*Helianthus annuus*) (サンフラワー) の Rubisco 小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

j) 2mepspss-1Pa : セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) (Lebrunら、1997) の二重突然変異体 5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸シターゼ遺伝子のコード配列

k) 3'nos : pTiT37のT-DNA由来のノパリンシターゼ遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列 (Depickerら、1982)

【0084】

ベクター pTJN75 の T-DNA のヌクレオチド配列は配列番号 6 に示されている。

【0085】

セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン最適化は、Leto 1.0 遺伝子最適化ソフトウェア (Entelechon GmbH, Germany) を用いて行なった。

【0086】

実施例 2 : アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) を介する実施例 1 の T-DNA ベクターによるセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) の形質転換得られた T-DNA ベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) C58C1Rif (pGV4000) に導入し、形質転換体を、当技術分野で公知の方法に従って、スペクチノマイシンおよびストレプトマイシンを用いて選択した。

【0087】

これらのアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 株を用いて、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) の変種 PPS02-144B を、当技術分野で公知の方法に従って形質転換し、トランスジェニック植物をグリホサート耐性 (0.4 kg a.i./ha) について選択し、サザンプロットティングおよび RT-PCR を用いて、単一コピー数かどうかを確認した。T0 植物を野生型植物と戻し交配し、得られた T1 世代を温室でのグリホサート耐性試験に用いた。

【0088】

実施例 3 : グリホサート耐性の測定

グリホサート耐性を解析するために、各々の形質転換事象について、51個の T1 種子を温室で播き、温室で用いられる従来の用量の5倍に相当する、2.0 kg a.i. /

haの用量のグリホサートを用いて、2～4葉期での出芽後処理を行なった。噴霧して10日後、1つのコンストラクトにつき1つの代表的な事象の生き残った植物の写真を撮影し(図1A)、生き残った集団を以下のパラメータについてスコア化した。

【0089】

活力を評価するために、植物を1～9の等級(ここで、1=枯れている、3=育ちが悪い、6=何らかの異常な表現型および9=活力がある)で評価した。1つのコンストラクトにつき5つの代表的な事象の平均値(Av)および標準偏差(sd)を表1に示す。

【0090】

PPTOXを評価するために、植物を1～9の等級(ここで、1=完全に黄変している、5=植物の50%が黄変しているおよび9=黄変していない)で評価した。1つのコンストラクトにつき5つの代表的な事象の平均値(Av)および標準偏差(sd)を表1に示す。

【0091】

【表1】

表1

	活力	PPTOX
	Av (sd)	Av (sd)
pTJN50	1.2 (0.4)	6.0 (0.0)
pTJN48	1.2 (0.4)	5.2 (0.4)
pTJN51	5.0 (0.0)	5.6 (0.5)
pTJN49	5.4 (0.5)	6.8 (0.4)
pTJN75	7.0 (0.0)	7.6 (0.5)

【0092】

図1Bに示すような植物の外観を表1の値と比較したとき、活力の測定値は、グリホサート耐性のレベルと最も良く相関するように思われる。P35S2プロモーターの制御下の2mEPSPSをイントロン1h3とともに含むキメラDNA分子を有するpTJN51植物は、活力に関して、イントロン1h3を含まない類似のpTJN50植物よりも有意に良好なスコアを付けた。イントロン1h3の導入による有意により高い活力スコアは、P35S2プロモーターをイントロン1h3とともに含むpTJN49植物をイントロン1h3を欠くpTJN48植物と比較したときにも観察された。切断されたpH4a748-NarIプロモーターの制御下の2mEPSPSをイントロン1h3とともに含む第2のキメラDNA分子の導入は、それぞれ、この追加の分子を欠く植物であるpTJN50およびpTJN51と比較したときに、pTJN48植物またはpTJN49植物の活力を増大させなかった。驚くべきことに、P35S2をイントロン1h3とともに含むキメラDNA分子に加えて、全長pH4a748プロモーターをイントロン1h3とともに含む第2のキメラDNA分子を有するpTJN75植物は、第2のキメラDNA分子を含まないpTJN51植物と比較したとき、そしてまた、切断されたpH4a748-NarIプロモーターを含む類似の植物(pTJN49)と比較したとき、より高い活力を示した。特筆すべきことに、切断されたpH4a748-NarIプロモーターの制御下の2mEPSPSとイントロン1h3とを含むキメラDNA分子のみを有するpTJN47植物は、一次形質転換体に0.4kg a.i./haのグリホサートを噴霧したときに種子を作らず、この切断されたpH4a748-NarIプロモーター-イントロン1h3の組合せでは、適用されたグリホサート投薬量に耐えるのに十分なEPSPS発現が誘導されないことを示している。

【0093】

コドンが最適化されていない2mEPPSを用いた過去の同様の実験では、0.4kg a.i./haのグリホサートを2回噴霧した後に、活力スコアが高くとも4.7(0.5)の、グリホサート耐性が制限された植物が得られた。

【0094】

したがって、これらのデータは、グリホサート耐性が増大した植物を得るために、置換ヒストンH3イントロンを構成的35Sプロモーターおよび全長H4a748プロモーターと組み合わせて用いて、グリホサート耐性EPPSの定量的および定性的な発現を駆動することによりもたらされる改善を明確に示している。

【0095】

実施例4.さらなるキメラDNA分子の構築

従来の組換えDNA技術を用いて、以下のDNA断片を機能的に連結することによって、以下のT-DNA発現ベクターを構築した。

【0096】

pTJR2

a) Ph4a-748-NarI: シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列(Chabouteら、1987)

b) TPotp-C-1Pc: Lebrunら(1996)によって記載されているような、トウモロコシ(*Zea mays*) (トウキビ)およびヒマワリ(*Helianthus annuus*) (サンフラワー)のRuBisCO小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

c) 2mepspss: トウモロコシ(*Zea mays*) (トウキビ) (Lebrunら、1997)の二重突然変異体5-エノール-ピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

d) 3'his: シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列(Chabouteら、1987)

【0097】

pTJN73

a) Ph4a-748: シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列(Chabouteら、1987)

b) TPotp-C-1Pc: Lebrunら(1996)によって記載されているような、トウモロコシ(*Zea mays*) (トウキビ)およびヒマワリ(*Helianthus annuus*) (サンフラワー)のRuBisCO小サブユニット遺伝子の配列を含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

c) 2mepspss-1Pa: セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)のコドン使用頻度に適合させた、トウモロコシ(*Zea mays*) (トウキビ) (Lebrunら、1997)の二重突然変異体5-エノール-ピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

d) 3'his: シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列(Chabouteら、1987)

【0098】

pTEM2

a) Ph4a-748: シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列(Chabouteら、1987)

b) TPotp-C-1Pc: Lebrunら(1996)によって記載されているような、トウモロコシ(*Zea mays*) (トウキビ)およびヒマワリ(*Helianthus annuus*) (サンフラワー)のRuBisCO小サブユニット遺伝子の配列を

含む、最適化されたトランジットペプチドのコード配列

c) 2 m e p s p s : トウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) (Lebrunら、1997) の二重突然変異体 5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列

d) 3' h i s : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域を含む配列 (Chabouteら、1987)

【0099】

実施例5. 様々なT-DNAベクターの形質転換効率の比較

ヒストンH4遺伝子の短いプロモーター領域またはその長いバージョンのどちらかを含み、かつトウモロコシ (*Zea mays*) (トウキビ) の二重突然変異体 5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ遺伝子のコード配列またはセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合されているトウモロコシ (*Zea mays*) の二重突然変異体 5 - エノールピルビルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ遺伝子をコードするコードのどちらかをさらに含むT-DNAベクター (pTJN47、pTJR2、pTJN73またはpTEM2) を用いて、これらのそれぞれのT-DNAベクターを含むアグロバクテリウム (*Agrobacteri*a) との共栽培によって、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のプロトプラストを形質転換した。各ベクターを用いて3回の独立した実験を行なった (各実験について10枚の選択プレート)。pTJN47の場合、2回の独立した実験しか行なわなかった。0.25mMのグリホサートで選択した3週間後に、形質転換コロニーの数をカウントした。

【0100】

【表2】

pTJN47	実験1	312コロニー
pTJN47	実験2	144コロニー
平均 = 228 (n=20)		
pTJR2	実験1	237コロニー
pTJR2	実験2	172コロニー
pTJR2	実験3	105コロニー
平均 = 171 (n=30)		
pTEM2	実験1	566コロニー
pTEM2	実験2	428コロニー
pTEM2	実験3	860コロニー
平均 = 618 (n=30)		
pTJN73	実験1	990コロニー
pTJN73	実験2	53コロニー
pTJN73	実験3	940コロニー
平均 = 828 (n=30)		

【0101】

長いヒストンプロモーターを含むベクターと短いヒストンプロモーター含むベクターとの間に形質転換効率の明確な違いを認めることができる。

【0102】

実施例6：野外試験

p T J N 4 9 および p T J N 7 5 で形質転換したセイヨウアブラナ (Brassica napus) 株について選択された 4 つの最良の事象に野外試験を受けさせた。

【 0 1 0 3 】

【表3】

RCBD デザイン、分割ブロック、3つの反復、単一列試験区(single row plots)-グリホサートの1回適用および2回適用
PPTOX:植物毒性採点;VIG_BH:除草剤を適用する前の活力;VIG_AH、VIG_AH2 および VIG_AH3:それぞれ、除草剤を適用して7日、14日および21日の活力。

統計分析:対応のない両側t検定。***:非常に有意差がある;****:極めて大きい有意差がある;ns:有意差がない

コントラクト		割合	事象	PPTOX	VIG_BH	VIG_AH	VIG_AH2	VIG_AH3
pTJN49	1 APP 2000g ai		GLBN0002-06001	5,0	7,0	6,5	8,0	8,0
	1 APP 2000g ai		GLBN0002-06501	4,5	7,5	7,0	8,0	8,0
	1 APP 2000g ai		GLBN0002-08101	4,7	7,7	6,7	7,7	7,7
	1 APP 2000g ai		GLBN0002-08301	5,3	7,7	7,0	8,3	8,0
	平均			4,9	7,5	6,8	8,0	7,9
	1 APP 2000g ai		GLBN0033-07301	5,5	6,5	7,0	8,5	8,0
pTJN75	1 APP 2000g ai		GLBN0033-10201	8,0	8,0	7,7	9,0	8,0
	1 APP 2000g ai		GLBN0037-03401	6,7	7,3	8,0	9,0	8,0
	1 APP 2000g ai		GLBN0037-03801	8,0	7,0	7,5	8,5	8,5
	平均			7,0	7,2	7,5	8,8	8,1
		p	0,0132	0,4673	0,0216	0,0074	0,2192	
		平均 (pTJN49-pTJN75)	-2,175	0,275	-0,75	-0,75	-0,200	
		95%信頼区間	-3,706~- 0,644	-0,592~- 1,142	-1,345~- 0,155	-1,213~- -0,287	-0,557~- 0,157	
		t	3,4763	0,7759	3,0833	3,962	1,372	
		df	6	6	6	6	6	
		SE	0,626	0,354	0,243	0,189	0,146	
		有意性	***	***	***	ns	ns	

【0 1 0 4】

【表4】

コントラクト	割合	事象	PPTOX	VIG_BH	VIG_AH	VIG_AH2	VIG_AH3
pTJN49	2 APP 2000g ai	GLBN0002-06001	5,0	7,0	6,5	6,5	6,5
	2 APP 2000g ai	GLBN0002-06501	5,0	7,5	7,0	7,0	6,5
	2 APP 2000g ai	GLBN0002-08101	4,3	7,3	6,0	7,0	6,7
	2 APP 2000g ai	GLBN0002-08301	5,0	7,3	7,0	6,0	6,0
平均		4,8	7,3	6,6	6,6	6,4	
pTJN75	2 APP 2000g ai	GLBN0033-07301	7,5	6,5	7,0	8,0	7,0
	2 APP 2000g ai	GLBN0033-10201	7,0	7,7	8,0	9,0	7,7
	2 APP 2000g ai	GLBN0037-03401	7,3	7,3	7,7	8,3	7,3
	2 APP 2000g ai	GLBN0037-03801	7,5	7,5	7,5	8,0	7,5
平均		7,3	7,3	7,5	8,3	7,4	
平均 (pTJN49-pTJN75)		p	0,0001	0,9324	0,0272	0,0023	0,0041
95%信頼区間		t	-0,25	0,025	-0,925	-1,700	-0,950
df		df	-3,017~- 1,983	-0,666~- 0,716	-1,704~- 0,146	-2,522~- 0,878	-1,467~- 0,433
SE		SE	11,84	0,0885	2,904	5,0591	4,4992
有意性		有意性	****	ns	***	****	****

【0 1 0 5】

したがって、本発明の様々な実施形態を以下のパラグラフに見られるように要約することができる。

【0106】

パラグラフ1.

以下の機能的に連結されたDNA断片：

- a) 植物で発現可能な構成的プロモーター；
- b) 5'UTRをコードするDNA領域；
- c) 植物置換ヒストン遺伝子のイントロン1をコードするDNA領域；
- d) トランジットペプチドをコードするDNA領域；
- e) グリホサート耐性5'-エノールピルビルシキミ酸-3'-リン酸シンターゼ(EPSPS)をコードするDNA領域；ならびに
- f) 植物で機能的な3'転写終結およびポリアデニル化領域を含むキメラDNA分子を含む植物。

【0107】

パラグラフ2.

前記構成的プロモーターがCaMV 35Sプロモーターである、パラグラフ1に記載の植物。

【0108】

パラグラフ3.

前記構成的プロモーターが、配列番号2のnt2155~2573を含む、パラグラフ1または2に記載の植物。

【0109】

パラグラフ4.

前記イントロン1が、ジェンバンク受託番号X60429.1またはU09458.1からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、パラグラフ1~3のいずれか一項に記載の植物。

【0110】

パラグラフ5.

前記イントロン1が、配列番号9のnt692~1100もしくはnt2984~3064または配列番号10のnt555~668を含む、パラグラフ1~4のいずれか一項に記載の植物。

【0111】

パラグラフ6.

前記グリホサート耐性EPSPSをコードするDNA領域が、トウモロコシ(Zeaimays)の2mEPSPS遺伝子のヌクレオチド配列を含む、パラグラフ1~5のいずれか一項に記載の植物。

【0112】

パラグラフ7.

前記グリホサート耐性EPSPSをコードするDNA領域が、配列番号8のアミノ酸配列をコードする、パラグラフ1~5のいずれか一項に記載の植物。

【0113】

パラグラフ8.

前記グリホサート耐性EPSPSをコードするDNA領域が、セイヨウアブラナ(Brassica napus)のコドン使用頻度に適合している、パラグラフ7に記載の植物。

【0114】

パラグラフ9.

前記グリホサート耐性EPSPSをコードするDNA領域が、配列番号1のnt800~2137を含む、パラグラフ7または8に記載の植物。

【0115】

パラグラフ 10 .

前記 5' UTR が、ペチュニア (*Petunia hybrida*) 由来のクロロフィル a / b 結合タンパク質遺伝子のリーダー配列を含む、パラグラフ 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の植物。

【 0 1 1 6 】

パラグラフ 11 .

前記 5' UTR をコードする DNA 領域が、配列番号 2 の nt 2 0 8 6 ~ 2 1 5 4 を含む、パラグラフ 10 に記載の植物。

【 0 1 1 7 】

パラグラフ 12 .

前記トランジットペプチドをコードする DNA 領域が、トウモロコシ (*Zea mays*) およびヒマワリ (*Helianthus annuus*) の Rubisco 小サブユニット遺伝子の配列を含む、パラグラフ 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の植物。

【 0 1 1 8 】

パラグラフ 13 .

前記トランジットペプチドをコードする DNA 領域が、配列番号 7 のアミノ酸配列をコードする、パラグラフ 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の植物。

【 0 1 1 9 】

パラグラフ 14 .

前記トランジットペプチドをコードする DNA 領域が、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のコドン使用頻度に適合している、パラグラフ 13 に記載の植物。

【 0 1 2 0 】

パラグラフ 15 .

前記トランジットペプチドをコードする DNA 領域が、配列番号 1 の nt 2 1 3 8 ~ 2 5 0 9 を含む、パラグラフ 13 または 14 に記載の植物。

【 0 1 2 1 】

パラグラフ 16 .

前記 3' 転写終結およびポリアデニル化領域が、配列番号 7 の nt 307 ~ 572 または nt 3252 ~ 3966 を含む、パラグラフ 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の植物。

【 0 1 2 2 】

パラグラフ 17 .

以下の機能的に連結された DNA 断片 :

a) シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター配列 ;

b) 植物置換ヒストン遺伝子のイントロン 1 をコードする DNA 領域 ;

c) トランジットペプチドをコードする DNA 領域 ;

d) グリホサート耐性 EPSPS をコードする DNA 領域 ; ならびに

e) 3' 転写終結およびポリアデニル化領域

を含む第 2 のキメラ DNA 分子をさらに含む、パラグラフ 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の植物。

【 0 1 2 3 】

パラグラフ 18 .

前記ヒストン H4 プロモーター配列が、配列番号 6 の nt 5 9 6 9 ~ 6 8 9 0 を含む、パラグラフ 17 に記載の植物。

【 0 1 2 4 】

パラグラフ 19 .

前記イントロン 1 が、ジェンバンク受託番号 X 60429.1 または U 09458.1 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、パラグラフ 17 または 18 に記載の植物。

【 0 1 2 5 】

パラグラフ 20 .

前記イントロン 1 が、配列番号 9 の nt 692 ~ 1100 もしくは nt 2984 ~ 3064 または配列番号 10 の nt 555 ~ 668 を含む、パラグラフ 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の植物。

【 0126 】

パラグラフ 21 .

前記グリホサート耐性 EPSPS をコードする DNA 領域が、トウモロコシ (Zea mays) の dmEPSPS 遺伝子のコード配列を含む、パラグラフ 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の植物。

【 0127 】

パラグラフ 22 .

前記グリホサート耐性 EPSPS をコードする DNA 領域が、配列番号 8 のアミノ酸配列をコードする、パラグラフ 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の植物。

【 0128 】

パラグラフ 23 .

前記グリホサート耐性 EPSPS をコードする DNA 領域が、セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合している、パラグラフ 22 に記載の植物。

【 0129 】

パラグラフ 24 .

前記グリホサート耐性 EPSPS をコードする DNA 領域が、配列番号 1 の nt 800 ~ 2137 を含む、パラグラフ 22 または 23 に記載の植物。

【 0130 】

パラグラフ 25 .

前記トランジットペプチドをコードする配列が、トウモロコシ (Zea mays) およびヒマワリ (Helianthus annuus) の Rubisco 小サブユニット遺伝子の配列を含む、パラグラフ 17 ~ 24 のいずれか一項に記載の植物。

【 0131 】

パラグラフ 26 .

前記トランジットペプチドをコードする DNA 領域が、配列番号 7 アミノ酸配列をコードする、パラグラフ 17 ~ 24 のいずれか一項に記載の植物。

【 0132 】

パラグラフ 27 .

前記トランジットペプチドをコードする DNA 領域が、セイヨウアブラナ (Brassica napus) のコドン使用頻度に適合している、パラグラフ 26 に記載の植物。

【 0133 】

パラグラフ 28 .

前記トランジットペプチドをコードする DNA 領域が、配列番号 1 の nt 2138 ~ 2509 を含む、パラグラフ 26 または 27 に記載の植物。

【 0134 】

パラグラフ 29 .

前記 3' 転写終結およびポリアデニル化領域が、配列番号 7 の nt 307 ~ 572 または nt 3252 ~ 3966 を含む、パラグラフ 17 ~ 28 のいずれか一項に記載の植物。

【 0135 】

パラグラフ 30 .

アブラナ属 (Brassica) 植物であるパラグラフ 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の植物。

【 0136 】

パラグラフ 31 .

アブラナであるパラグラフ 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の植物。

【0137】

パラグラフ32.

セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、カブ(*Brassica rapa*)、ハクサイ(*Brassica campestris*)またはカラシナ(*Brassica juncea*)であるパラグラフ1～31のいずれか一項に記載の植物。

【0138】

パラグラフ33.

パラグラフ1～29のいずれかに記載されているようなキメラ遺伝子を含むパラグラフ1～32のいずれか一項に記載の植物の植物細胞。

【0139】

パラグラフ34.

パラグラフ1～29のいずれかに記載されているようなキメラ遺伝子を含むパラグラフ1～32のいずれか一項に記載の植物の種子。

【0140】

パラグラフ35.

パラグラフ1～29のいずれか一項に記載されているようなキメラDNA分子。

【0141】

パラグラフ36.

パラグラフ35に記載のキメラDNA分子の少なくとも1つを含む、植物の形質転換用のクローニングベクターおよび/または発現ベクター。

【0142】

パラグラフ37.

前記植物をEPSPS阻害除草剤で処理することを特徴とする、パラグラフ1～32のいずれか一項に記載されているような植物を処理するための方法。

【0143】

パラグラフ38.

前記EPSPS阻害除草剤がグリホサートである、パラグラフ37に記載の方法。

【0144】

パラグラフ39.

前記植物が少なくとも2.0kg/haの適用に対して耐性がある、パラグラフ38に記載の方法。

【0145】

パラグラフ40.

グリホサート耐性植物を作製するためのパラグラフ35に記載のキメラDNA分子の使用。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2012531216000001.app