

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-171069

(P2018-171069A)

(43) 公開日 平成30年11月8日(2018.11.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1H 1/00 (2006.01)	AO1H 1/00	Z N A A 2 B O 3 O
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4 B O 6 5
C12N 15/82 (2006.01)	C12N 15/82	
AO1H 6/20 (2018.01)	AO1H 6/20	
AO1H 6/46 (2018.01)	AO1H 6/46	

審査請求 有 請求項の数 35 O L 外国語出願 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-128183 (P2018-128183)	(71) 出願人	501231613
(22) 出願日	平成30年7月5日 (2018.7.5)		モンサント テクノロジー エルエルシー
(62) 分割の表示	特願2016-134209 (P2016-134209) の分割		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン トルイス、ノース・リンドバーグ・プール バード800番、メール・ゾーン・イー1 エヌエイ
原出願日	平成19年7月18日 (2007.7.18)	(74) 代理人	100106518
(31) 優先権主張番号	60/831,814		弁理士 松谷 道子
(32) 優先日	平成18年7月19日 (2006.7.19)	(74) 代理人	100156122
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 佐藤 剛
		(72) 発明者	イエ・シウトン
			アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン トルイス、ノース・リンドバーグ・プール バード800番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物形質転換効率を改善するための多重形質転換エンハンサー配列の使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 T-DNAを含む組換え構築物上のT-DNAボーダー配列に作動可能に連結した、オーバードライブまたはTSS配列のようなさらなる形質転換エンハンサー配列の使用によってアグロバクテリウム - およびリゾビウム - 媒介植物細胞形質転換の効率を改善するための方法および組成物に関する。

【解決手段】 リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介植物形質転換の効率を増大させる方法であって、植物細胞をリゾビウム属細菌で形質転換し、ここに該リゾビウム属細菌はアグロバクテリウム・ツメファシエンズ (Agrobacterium tumefaciens) からの少なくとも1のT-DNAボーダー配列および該T-DNAボーダー配列に作動可能に連結された形質転換エンハンサー配列を含む植物形質転換ベクターを含み；該形質転換エンハンサー配列の完全長相補体の2またはそれを超えるコピーを含む、方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介植物形質転換の効率を増大させる方法であって、植物細胞をリゾビウム属細菌で形質転換し、ここに該リゾビウム属細菌はアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) からの少なくとも 1 の T-DNA ボーダー配列および該 T-DNA ボーダー配列に作動可能に連結された形質転換エンハンサー配列を含む植物形質転換ベクターを含み；該形質転換エンハンサー配列は配列番号：6 または配列番号：6 の完全長相補体の 2 またはそれを超えるコピーを含む、該方法。

【請求項 2】

形質転換エンハンサー配列が、T-DNA 右側ボーダー (RB) 配列に近接して位置する請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

形質転換エンハンサー配列が、アグロバクテリウム・リゾゲネス (Agrobacterium rhizogenes) の Ri プラスミドからのものである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

リゾビウム属細菌 - 媒介形質転換がアグロバクテリウム - 媒介形質転換である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

リゾビウム属細菌 - 媒介形質転換が、アグロバクテリウム - 、リゾビウム - 、シノリゾビウム (Sinorhizobium) - 、メソリゾビウム (Mesorhizobium) - またはブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) - 媒介形質転換である、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 6】

植物細胞が、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリー、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ホウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

該形質転換エンハンサー配列が、配列番号：11 または配列番号：11 の完全長相補体を含む、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 8】

植物細胞がトウモロコシまたはダイズの細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

T-DNA ボーダー領域が、1 ないし 18 コピーの該形質転換エンハンサー配列を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

さらに、該植物細胞からトランスジェニック植物を再生する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 11】

配列番号：11、配列番号：11 の完全長に相補的な配列またはそれらの組合せの 1 またはそれを超えるコピーを含む形質転換エンハンサー配列に作動可能に連結された T-DNA ボーダー配列を含む、組換え DNA 構築物。

【請求項 12】

エンハンサー配列が少なくとも 4 コピーの該配列を含む、請求項 11 記載の構築物。

【請求項 13】

ボーダー配列が右側ボーダー (RB) 配列である、請求項 11 記載の構築物。

【請求項 14】

ボーダー配列が左側ボーダー (LB) 配列である、請求項 11 記載の構築物。

50

【請求項 15】

請求項 11 記載の構築物で形質転換したトランスジェニック細胞。

【請求項 16】

植物または細菌の細胞として規定される、請求項 15 記載の細胞。

【請求項 17】

細胞がアグロバクテリウムの細胞である、請求項 16 記載の細胞。

【請求項 18】

細胞がリゾビウムの細胞である、請求項 16 記載の細胞。

【請求項 19】

植物細胞が、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンパク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ハウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである、請求項 16 記載の細胞。

10

【請求項 20】

請求項 11 記載の構築物で形質転換したトランスジェニック植物。

【請求項 21】

ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンパク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ハウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される、請求項 20 記載のトランスジェニック植物。

20

【請求項 22】

リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介植物形質転換の効率を増大させる方法であって、さらに

a) 少なくとも 1 のさらなる形質転換エンハンサー配列を、形質転換エンハンサー配列を含む少なくとも 1 の T-DNA ボーダー領域を含む植物形質転換ベクターに導入し；ついで

30

b) 植物細胞を、該植物形質転換ベクターを含むリゾビウム属細菌で形質転換する、ここに該さらなる形質転換エンハンサー配列は配列番号：6 または配列番号：6 の完全長相補体の少なくとも 1 のコピーを含む、ことを含む該方法。

【請求項 23】

さらなる形質転換エンハンサー配列が、T-DNA 右側ボーダー (RB) 配列に近接して位置する、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

さらなる形質転換エンハンサー配列が、アグロバクテリウム・リゾゲネスの Ri プラスミドからのものである、請求項 22 記載の方法。

40

【請求項 25】

リゾビウム属細菌 - 媒介形質転換がアグロバクテリウム - 媒介形質転換である、請求項 22 記載の方法。

【請求項 26】

リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介形質転換が、アグロバクテリウム - 、リゾビウム - 、シノリゾビウム (Sinorhizobium) - 、メソリゾビウム (Mesorhizobium) - またはブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) - 媒介形質転換である、請求項 22 記載の方法。

【請求項 27】

植物細胞が、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ

50

ァ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリー、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ハウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである、請求項 22 記載の方法。

【請求項 28】

該さらなる形質転換エンハンサー配列が、配列番号：11または配列番号：11の完全長相補体を含む、請求項 22 記載の方法。

【請求項 29】

植物細胞がトウモロコシまたはダイズの細胞である請求項 22 記載の方法。

【請求項 30】

T-DNAボーダー領域が、1ないし18コピーの該さらなる形質転換エンハンサー配列を含む、請求項 22 記載の方法。

【請求項 31】

さらに、該植物細胞からトランスジェニック植物を再生する工程を含む、請求項 22 記載の方法。

【請求項 32】

組換え構築物を作製する方法であって、

少なくとも1のさらなる形質転換エンハンサー配列を植物形質転換ベクターに導入し、それによって少なくとも2の形質転換エンハンサー配列を含む組換え構築物を作製することを含み、ここに該ベクターは少なくとも1のT-DNAボーダー領域を含み、該ボーダー領域は第1の形質転換エンハンサー配列を含み、ここに該形質転換エンハンサー配列は配列番号：6の1またはそれを超えるコピーと配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9および配列番号：13よりなる群から選択される配列の1またはそれを超えるコピーとを含み、ここに形質転換エンハンサー配列はT-DNAボーダー領域に作動可能に連結する、方法。

【請求項 33】

配列番号：6の1またはそれを超えるコピーと配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9および配列番号：13よりなる群から選択される配列の1またはそれを超えるコピーとの組合せを含む形質転換エンハンサー配列に作動可能に連結したT-DNAボーダー配列を含む組換えDNA構築物。

【請求項 34】

ボーダー配列が右側ボーダー (RB) 配列である、請求項 33 記載の構築物。

【請求項 35】

ボーダー配列が左側ボーダー (LB) 配列である、請求項 33 記載の構築物。

【請求項 36】

RB配列がノパリンTiプラスミドからのものである請求項 34 記載の構築物。

【請求項 37】

RB配列がオクトピンTiプラスミドからのものである請求項 34 記載の構築物。

【請求項 38】

請求項 33 記載の構築物で形質転換したトランスジェニック細胞。

【請求項 39】

植物または細菌の細胞として規定される、請求項 38 記載の細胞。

【請求項 40】

細胞がアグロバクテリウムの細胞である、請求項 39 記載の細胞。

【請求項 41】

細胞がリゾビウムの細胞である、請求項 39 記載の細胞。

【請求項 42】

植物細胞が、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet

10

20

30

40

50

)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ハウレンソウ、カボチャ(squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである、請求項 3 9 記載の細胞。

【請求項 4 3】

請求項 3 3 記載の構築物で形質転換したトランスジェニック植物。

【請求項 4 4】

ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ハウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される、請求項 4 3 記載のトランスジェニック植物。

10

【請求項 4 5】

ボーダー領域が右側ボーダー (RB) 配列である、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 4 6】

ボーダー領域が左側ボーダー (LB) 配列である、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 4 7】

さらに、リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介形質転換によって該組換え構築物で植物細胞を形質転換することを含み、ここにリゾビウム属細菌 (Rhizobia) は該植物細胞の形質転換にコンピ-テントである、請求項 3 2 記載の方法。

20

【請求項 4 8】

リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介形質転換は、アグロバクテリウム - 媒介形質転換である、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 4 9】

リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介形質転換は、アグロバクテリウム - 、リゾビウム - 、シノリゾビウム - 、メソリゾビウム - 、またはブラディリゾビウム - 媒介形質転換である、請求項 4 7 記載の方法。

30

【請求項 5 0】

植物細胞がダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ハウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 5 1】

植物細胞がトウモロコシまたはダイズの細胞である、請求項 5 0 記載の方法。

40

【請求項 5 2】

T-DNA ボーダー領域が該形質転換エンハンサー配列の 2 ~ 約 18 コピーを含む、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 5 3】

さらに、該植物細胞からトランスジェニック植物を再生することを含む、請求項 4 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、その開示をその全体に参照することによって本明細書に取り込む、2006年7月1

50

9日に出願した米国仮特許出願60/831,814に基づく優先権を主張する。

【0002】

本発明は、一般的に植物バイオテクノロジーに関する。より詳細には、本発明は、細菌-媒介植物形質転換の効率を改善するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

植物細胞の自然のアグロバクテリウム-媒介形質転換の間に、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のTiプラスミドまたはアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) のRiプラスミドからの一片のDNAが植物細胞に移行する (例えば、Gelvin, 2003)。この移行したDNA (T-DNA) フラグメントはアグロバクテリウムのエンドヌクレアーゼVirD2によって認識される不完全な24bpのダイレクトリピートによって挟まれ、各リピートの1の鎖の特定の部位に切れ目を入れることによって一本鎖T-鎖を生成する。一本鎖T-鎖の形成を開始するリピートは「右側ボーダー (RB)」といい、一方、一本鎖T-DNAの形成を終了するリピートは「左側ボーダー (LB)」という。VirD2タンパク質は切れ目を入れた後の鎖の5'末端に結合し、T-鎖を植物細胞に案内し、そこでT-鎖はアグロバクテリウムおよび植物がコードするタンパク質の助けで植物ゲノムに組み込まれる。ベクター骨格配列を含むT-DNA領域の下流 (5'から3'の向きで) の配列も同様に移行され得る (例えば、Kononovら, 1997)。これは、植物細胞への移行の前のアグロバクテリウム中のボーダーの少なくとも1の効果のない切れ目によって起こりがちである。

【0004】

種々のアグロバクテリウム菌株からのRBおよびLB配列の比較は、RBおよびLBの両方が共通モチーフを共有していることを示し (Canadayら, 1992)、これは、RBプロセシングの効率を調整することに他のエレメントが関与し得ることを示している。RBに次ぐシス-作用配列は、アグロバクテリウム・ツメファシエンスおよびアグロバクテリウム・リゾゲネスを含む多数のアグロバクテリウム菌株に存在する。これらの配列は、野生型の病原性に必要である (Veluthambiら, 1988; ShurvintonおよびReam, 1991; Toroら, 1989; Toroら, 1988; Hansenら, 1992)。アグロバクテリウム・ツメファシエンス中の配列はPeraltaら (1986) によって「オーバードライブ」または「T-DNAトランスミッション・エンハンサー」と呼ばれた。アグロバクテリウム・リゾゲネスにおいて、この配列はHansenら, (1992) によって「T-DNAトランスファー・スティムレーター・シーケンス」(TSS) と呼ばれた。オーバードライブ (「OD」) 配列は、オクトピンTi TL-DNAのRBリピートのすぐ正面に存在する特定の24bpのモチーフと最初に定義された (Peraltaら, 1986)。同様の配列はオクトピンTi TR-DNAのRBリピートの正面に存在し、ノパリンTi RBの正面およびアグロピンRi TL右側ボーダーの正面にも存在する (Peraltaら, 1986, Shawら, 1984, Barkerら, 1983, Slightonら, 1985)。異なるアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌株のさらなる比較は、すべての右側ボーダー配列を含むノパリン株pTiT37、オクトピン株pTiA6およびアグロバクテリウム・リゾゲネスpRiA4の正面に存在する8bpのオーバードライブ・コア配列を明らかにした (Peraltaら, 1986)。

【0005】

オクトピン・オーバードライブ配列の存在は、アグロバクテリウム細胞における一本鎖T-DNA形成を高め、植物細胞へのT-DNA移行を改善し、野生型の病原性に必要であった (Peraltaら, 1986, ShurvintonおよびReam 1991)。ノパリン産生TiプラスミドpTiT37からのLBリピートは、pTiT37 RBの隣接シス-作用配列をその正面に設置した場合に高い効率で一本鎖T-DNAを生成することができ、これは、オーバードライブ様配列が実際に、それが他の同定された (オクトピンを産生する) Tiプラスミドにおけるように、ノパリンTiプラスミドにも存在することを示している (Culianez-MaciaおよびHepburn 1988, Peraltaら, 1986)。外来性オクトピン・オーバードライブ配列をノパリンpTiT37 RBの正面に組み込むと、合成pTiT37 RBリピートのみを含む親株よりも遙かに高い病原性を生じた (Peraltaら, 1986)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

VirC1タンパク質はオーバードライブに結合し、VirD2の切れ目を修飾すると考えられ (Toroら, 1988, 1989)、一方virCの突然変異は植物に弱毒化した病原性 (Closeら, 1987) およびプロセシングされた一本鎖T-DNA配列の減少した生成を生じる。アグロバクテリウム・ツメファシエンスのオクトピンおよびノバリンTiプラスミドは両方ともvirCを含み、virC突然変異をin transで補足して野生型レベルまで弱毒化した病原性を回復することができる (Closeら, 1987)。

【 0 0 0 7 】

アグロバクテリウム・リゾゲネス8196、A4および2659株に見出されたTSSは、アグロバクテリウム・ツメファシエンスにおけるオーバードライブ配列と同様の役割を演じている。各アグロバクテリウム・リゾゲネス株は異なるが関連する配列を有している (Hansenら, 1992)。8bpのTSSコア配列はpRiA4中で5回、pRi8196中で6回およびpRi2659 (Genbank受理番号AJ271050) 中で17回 (Hansenら, 1992のいう16×というよりも) 反復している。pRiA4は該反復に加えて保存された8bpオーバードライブ・コア配列を有する。pRiA4およびpRi8196中のより短いコア配列反復は、野生型の病勢に十分でなかった (Hansenら, 1992)。

【 0 0 0 8 】

Depickerら (米国特許出願公開2003 / 0140376および対応する国際公開WO 01 / 44482) は、ベクター骨格配列の移行を少なくするまたは防ぐために修飾したT-DNAボーダーを含む組換え構築物を記載している。Connerら (WO 05 / 121346) は、植物由来の配列を含むT-DNAボーダー様領域からの配列の作製および使用を記載している。Heimら (米国特許出願公開2003 / 0188345) は、修飾したボーダー領域を含む植物のアグロバクテリウム - 媒介形質転換用のベクターを記載している。Lassnerら (米国特許出願公開2006 / 0041956) は、非T-DNA配列を含まないトランスジェニック事象の同定を可能にするT-DNAボーダー領域への修飾を記載している。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

前述の研究は当該技術分野における理解を増したが、残っている必要なことは、アグロバクテリウム - 媒介植物形質転換の効率を改善する方法である。オーバードライブまたはTSS配列の存在は野生型アグロバクテリウムの病原性を増大し、該配列を欠くプラスミドと比較して植物細胞へのT-DNA移行を改善するが、オーバードライブまたはTSS配列の使用を介することを含んでどの様にして形質転換効率をさらに改善するのが不明のままである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

1の態様において、本発明は、a) 少なくとも1のさらなる形質転換エンハンサー配列を少なくとも1のT-DNAボーダー領域を含む植物形質転換ベクターに導入し; ついでb) 細菌 - 媒介形質転換によって植物細胞を該ベクターで形質転換し、ここに該細菌が植物細胞の形質転換にコンピテントである、細菌 - 媒介植物形質転換の効率を増大させる方法を提供する。該方法は、所望により、該植物細胞からトランスジェニック植物を再生させることを含むことができる。1の形態において、さらなる形質転換エンハンサー配列は、TGTWTGTK (配列番号: 20) の共通コア配列を含む。他の形態において、さらなる形質転換エンハンサー配列は、配列番号: 6、配列番号: 7、配列番号: 8、配列番号: 9、配列番号: 13、ならびに配列番号: 6、配列番号: 7、配列番号: 8、配列番号: 9または配列番号: 13のいずれかに相補的な配列よりなる群から選択される。特定の形態において、本発明は、配列番号: 14、配列番号: 15または配列番号: 16を含む組換えDNA構築物を提供する。

【 0 0 1 1 】

以下の図面は本明細書の一部であり、それを含めて本発明のある種の態様をさらに説明する。本発明は、本明細書に示す特定の形態の詳細な説明と組み合わせて図面を参照す

ることによってより良好に理解し得る。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】形質転換効率を改善するために使用する種々の形質転換エンハンサー配列の概説である。

【図2】pMON97464の概略マップである。

【図3】pMON87465の概略マップである。

【図4】設計RB配列；オーバードライブは太字で、24bpのRBコア配列は下線で示す。(A)ノパリンRB+1×オーバードライブ(配列番号：14)；(B)ノパリンRB+4×オーバードライブ(配列番号：15)；(C)ノパリンRB+18×TSS(配列番号：16)の配列。

10

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明と一緒に用いる形質転換エンハンサー配列は、右側ボーダー(RB)配列のようなT-DNAボーダー領域または配列に近接して、すなわちベクター配列のようなフランキング配列とボーダー配列との間に位置し得る。形質転換エンハンサー配列は、ノパリンまたはオクトピン・プラスミドのようなアグロバクテリウム・ツメファシエンスのTiプラスミドからのもの、またはアグロバクテリウム・リゾゲネスのRiプラスミドからのものとすることができる。ある種の形態において、細菌-媒介形質転換は、アグロバクテリウム-媒介形質転換、リゾビウム-媒介形質転換、ならびにシノリゾビウム(*Sinorhizobium*)-、メソリゾビウム(*Mesorhizobium*)-またはブラディリゾビウム(*Bradyrhizobium*)-媒介形質転換から選択される技術を利用することができる。ある種の形態において、形質転換エンハンサー配列は、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：17または配列番号：18を含むことができる。さらなる形態において、T-DNAボーダー領域は、約2または約4ないし約18コピーの形質転換エンハンサー配列を含む、1ないし約18コピーの形質転換エンハンサー配列を含むことができる。

20

【0014】

本発明に係る植物細胞は、いずれの植物細胞ともし得る。ある種の形態において、植物細胞は、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物(*beet*)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ホウレンソウ、カボチャ(*squash*)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである。特定の形態において、植物細胞はトウモロコシ細胞またはダイズ細胞である。

30

【0015】

もう1の態様において、本発明は、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：13、および配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9または配列番号：13のいずれかに相補的な配列、ならびにそれらの組合せよりなる群から選択される配列の2またはそれを超えるコピーを含む形質転換エンハンサー配列に作動可能に連結した、TiまたはRiプラスミドのT-DNAボーダー配列を含む組換えDNA構築物を提供する。特定の形態において、本発明は、配列番号：14、配列番号：15または配列番号：16を含む組換えDNA構築物を提供する。

40

【0016】

かかる構築物においては、エンハンサー配列は配列の少なくとも約4コピーを含むことができる。ボーダー配列は右側ボーダー(RB)または左側ボーダー(LB)配列とすることができる。ある種の形態において、構築物は配列番号：10および/または配列番号：11を含むことができる。RB配列はノパリンTiプラスミド、あるいはアグロピン、マンノピン、スクシマノピン(*succinamopine*)、ククモピンまたはオクトピンTiまたはRiプラスミドからのものとすることができ、配列番号：12を含むことができる。

【0017】

50

もう1の態様において、本発明は、本明細書に提供する構築物で形質転換した細胞を提供する。細胞は、アグロバクテリウム細胞およびリゾビウム細胞を含む、植物または細菌細胞とし得る。1の形態において、植物細胞は、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコおよびヒマワリよりなる群から選択される植物からのものである。本発明は、本発明の構築物で形質転換したトランスジェニック植物も提供する。特定の形態において、トランスジェニック植物は、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコおよびヒマワリよりなる群から選択することができる。

【0018】

下記は当業者が本発明を実施することを支援するために提供する本発明の詳細な説明である。当業者は、本発明の精神または範囲から逸脱することなく、本明細書に記載した形態に修飾および変更を作成することができる。

【0019】

本発明は、植物細胞のアグロバクテリウム - 媒介形質転換の効率を改善するための方法および組成物を提供する。ダイズの強病原性株であるアグロバクテリウム・リゾゲネスK599の20kbのT-DNA領域のシーケンシングは、アグロバクテリウム・リゾゲネスK599中のpRiプラスミドがアグロバクテリウム・リゾゲネスNCPBB2659株と同一であるという認識につながった。したがって、K599の強病原性は、RB付近に存在するTSS配列の数と関係している可能性がある。したがって、複数のオーバードライブおよびTSSリピートの重複をノパリンRB（例えば、pTiT37からの）を含むバイナリーベクターで試験して形質転換効率を改善した。4コピーで存在するpTiA6からのオクトピンTiプラスミドの30bpオーバードライブ（ShurvintonおよびReam, 1991）、および18コピーで存在するアグロバクテリウム・リゾゲネスNCPBB2659 TSSの8bpコア配列を用いてT-DNA移行効率を高めた。

【0020】

変化する数のオーバードライブまたはTSS配列を含む構築物の使用を比較する形質転換実験は、これらの配列のさらなる「積み重なった」コピーの存在が、形質転換頻度を改善することによって形質転換効率ならびに得られるトランスジェニック事象の質を改善することを示した。例えば、単一のコピーの挿入を含み、ベクター骨格配列（例えば、oriV）も欠く事象の比率は増加した。増加した形質転換頻度および質の事象は、さらなる商業的開発のための事象を選択するのに要求される資源の量を減少することによって形質転換法の全体的な効率を改善する。

【0021】

したがって、本発明は、受精能力のあるトランスジェニック植物を得るための、および植物細胞もしくは組織の形質転換および形質転換した細胞もしくは組織の受精能力のあるトランスジェニック植物への再生の改善された方法を提供する。本発明に従って形質転換法を開始するために、植物細胞または組織に挿入することが望まれる遺伝子コンポーネントを最初に選択する。遺伝子コンポーネントには、本発明による方法を用いて植物細胞または組織に導入すべきいずれの核酸も含まれ得る。遺伝子コンポーネントは、非 - 植物DNA、植物DNAまたは合成DNAを含むことができる。

【0022】

本発明のある種の形態において、遺伝子コンポーネントは、(a)植物細胞中で機能してRNA配列の生成を引き起こすプロモーター、(b)望ましいタンパク質またはポリペプチドをコードするRNA配列の生成を引き起こす構造DNA配列、および(c)植物細胞中で機能してRNA配列の3'末端のポリアデニル化を引き起こす3'非 - 翻訳DNA配列のような遺伝子コンポーネントを含む、組換え、二本鎖プラスミドまたはベクター分子のようなDNA組成物に取り込まれる。ベクターは、形質転換を促進し、望ましい遺伝子（または複数の遺伝子）の発現を調節する遺伝子コンポーネントも含むことができる。

【0023】

典型的に、遺伝子コンポーネントは、1の形態においてタンパク質に翻訳され得るmRNAを発現するように方向付けする。二本鎖形態で存在する植物構造コーディング配列（遺伝

10

20

30

40

50

子、cDNA、合成DNAまたは他のDNA)の発現には、RNAポリメラーゼによるDNAの1の鎖からのメッセンジャーRNA(mRNA)の転写およびその後のmRNA一次転写物の核内でのプロセシングが含まれる。このプロセシングには、mRNAの3'末端のポリアデニル化を含む3'非翻訳領域が含まれる。

【0024】

望ましい遺伝子コンポーネントを含み、植物を形質転換するために用い得るプラスミドまたはベクターを調製する一般的な方法およびこれらのベクターを作製する方法は、当該技術分野において知られている。典型的に、ベクターは、限定されるものではないが、プロモーター、リーダー、イントロンおよびターミネーター配列のような調節要素を含む多数の遺伝子コンポーネントからなる。調節要素は、それが制御する配列または遺伝子(または複数の遺伝子)に対する要素の近接に依存してシス-またはトランス-調節要素とも呼ばれる。プロモーター領域はRNAポリメラーゼに信号を発してDNAと会合させ、鋳型としてDNA鎖の1を用いてmRNAへの転写を開始させて対応するRNAの相補鎖を生成する塩基の配列を含む。

【0025】

構築物は、細菌細胞に複製機能および抗生物質選択を提供するプラスミドDNAセグメントも含むことができ、例えばori322のようなエスシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)の複製開始点、oriVまたはoriRiのような広域宿主複製開始点、およびスペクチノマイシンまたはストレプトマイシンに対する抵抗性を付与するTn7アミノグリコシドアダニルトランスフェラーゼ(aaaA)をコードするSpec/Strp、ゲンタマイシン(Gm、Gent)選択可能なマーカー遺伝子のような選択可能なマーカーのコード領域も含み得る。植物形質転換については、宿主細菌株は発現ユニットの移行機能を有するプラスミドを運搬しているアグロバクテリウム・ツメファシエンスABI、C58、LBA4404、EHA101またはEHA105となる場合がある。植物形質転換の当業者に知られている他の細菌株は本発明で機能することができ、それにはアグロバクテリウム・リゾゲネス、シノリゾビウム種、メソリゾビウム種、ブラディリゾビウム種およびリゾビウム種株が含まれる。

【0026】

植物細胞中で有効な多数のプロモーターは、文献に記載されている。かかるプロモーターには、限定されるものではないが、アグロバクテリウム・ツメファシエンスの癌腫誘導プラスミド上に運搬されているノパリンシンターゼ(NOS)およびオクトピンシンターゼ(OCS)プロモーター；カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)19Sおよび35Sプロモーターおよびゴマノハグサ科植物モザイクウイルス(FMV)35Sプロモーター；強化CaMV35Sプロモーター(e35S)；およびリブローズニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニット(ssRUBISCO、非常に豊富な植物ポリペプチド)からの光誘導性プロモーターが含まれる。これらのプロモーターはすべて、植物中で発現する種々の型のDNA構築物を構築するために使用されている。プロモーターハイブリッドも構築して、転写活性を高め、または望ましい転写活性、誘導性、および組織もしくは発生特異性を結合することもできる。

【0027】

したがって、植物中で機能するプロモーターは、時間的に調節される、空間的に調節される、および/または空間的-時間的に調節される、記載したような誘導性、ウイルス、合成、構造的とすることができる。組織-強化される、組織-特異的または発生的に調節される他のプロモーターも当該技術分野で知られており、本発明の実施に有用性を有すると想像される。有用なプロモーターは、植物および植物DNAウイルスのような種々の供給源から得ることができる。選択したプロモーターは十分な発現を引き起こして、関心の有る遺伝子の有効な量の産生を生じることができるものとするのが好ましい。

【0028】

望ましい場合は、本発明のDNA構築物(すなわち、キメラ/組換え植物遺伝子)に使用するプロモーターを修飾してそれらの制御特徴に影響することができる。プロモーターは、オペレーター領域との連結、ランダムまたは制御された突然変異導入ほかによって誘導化することができる。さらに、プロモーターを改変して複数の「エンハンサー配列」を含

10

20

30

40

50

ませて遺伝子発現を上昇することを支援することができる。

【0029】

本発明のDNA構築物によって生成されるmRNAは、5'非-翻訳リーダ配列を含むことができる。この配列は遺伝子が発現するために選択したプロモーターから誘導することができる。mRNAの翻訳を増大するように特異的に修飾することができる。5'非-翻訳領域は、ウイルスRNA、好適な真核生物遺伝子、または合成遺伝子配列からも得ることができる。かかる「エンハンサー」配列は、得られるmRNAの翻訳効率を増大または変化させるのに望ましい場合もあり、通常は翻訳エンハンサーとして知られている。遺伝子が発現を高め、または転写または翻訳に影響するように作用する他の遺伝子コンポーネントも、遺伝子コンポーネントとして想定される。キメラ構築物の3'非-翻訳領域には、好ましくは転写ターミネーターまたは同等の機能を有するエレメント、および植物中で機能してRNAの3'末端をポリアデニル化するポリアデニル化シグナルが含まれる。好適な3'領域の例は、(1)ノパリンシンターゼ(nos)遺伝子のようなアグロバクテリウムの癌腫誘導(Ti)プラスミド遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む3'転写、非-翻訳領域、および(2)ダイズ貯蔵タンパク質遺伝子およびリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニット(ssRUBISCO)遺伝子のような植物遺伝子である。好ましい3'領域の例はエンドウからのssRUBISCO E9遺伝子からのものである。

10

【0030】

典型的には、ポリアデニル化部位の数百塩基対下流に位置するDNA配列が転写を終止するように作用する。本明細書中において、これらのDNA配列は転写終止領域という。該領域は、転写されたメッセンジャーRNA(mRNA)の有効なポリアデニル化に必要であり、3'非-翻訳領域として知られている。RNAポリメラーゼはポリアデニル化が起こる部位を通してコーディングDNA配列を転写する。

20

【0031】

多数の形質転換系において、形質転換ベクターは選択可能な、スクリーニング可能なまたは評価可能なマーカー遺伝子を含むことが好ましい。これらの遺伝子コンポーネントは、本明細書中において、機能的遺伝子コンポーネントともいう。それらは、形質転換された植物の同定に機能するよう作用する産物または望ましい有用性の産物を生成するからである。

【0032】

30

選択デバイスとして作用するDNAは、再生可能な植物組織中で機能して他の毒性化合物に対する抵抗性を植物組織に付与する化合物を生成する。選択可能な、スクリーニング可能な、または評価可能なマーカーとして使用する関心のある遺伝子には、限定されるものではないが、 β -グルクロニダーゼ(gus)、緑色蛍光タンパク質(gfp)、ルシフェラーゼ(lux)、カナマイシンのような抗生物質(Dekeyerら, 1989)、グリフォセート(Della-Cioppaら, 1987)のような、CP4 EPSPS(米国特許第5,627,061号; 米国特許第5,633,435号; 米国特許第6,040,497号; 米国特許第5,094,945号; WO 04/074443; WO 04/009761); グルフォシネート(米国特許第5,646,024号、米国特許第5,561,236号、米国特許第5,276,268号; 米国特許第5,637,489号; 米国特許第5,273,894号); 2,4-D(WO 05/107437)およびジカンバのような、DMO(米国特許第7,022,896号)のような除草剤に対する耐性を許容する遺伝子が含まれる。他の選択方法も実施することができ、それには限定されるものではないが、ホスフィノトリシン、ピアラフォスおよび陽性選択機構(Joersboら, 1998)に対する耐性が含まれ、いまだ本発明の範囲に入るであろう。種々の選択可能/スクリーニング可能/評価可能なマーカーおよびそれらをコードする遺伝子の例はMikiおよびMcHugh(2004)に開示されている。

40

【0033】

本発明は、特定の望ましい特性を付与するのに十分なように発現される1またはそれを超える核酸(関心のある構造遺伝子)と一緒に、記載したような選択可能またはスクリーニング可能なマーカーおよび関連する調節要素を含むいずれか好適な植物形質転換プラスミドまたはベクターと一緒に使用することができる。本発明によって想定される関心のあ

50

る好適な構造遺伝子の例には、限定されるものではないが、昆虫または害虫耐性の遺伝子、除草剤耐性の遺伝子、収量、栄養向上、環境もしくはストレス耐性、または植物生理学、成長、発達、形態または植物産物（または複数の産物）における望ましい変化の遺伝子、が含まれる。

【0034】

あるいは、DNAコーディング配列は、例えばアンチセンス - およびコサプレッション - 媒介機構（例えば、Birdら，1991を参照されたい）を含む二本鎖RNA媒介機構を介して、内因性遺伝子の発現の標的化した阻害を引き起こす非 - 翻訳可能なRNA分子をコードすることによってこれらの表現型に影響することができる。RNAは、望ましい内因性mRNA生成物を切断するように設計された触媒性RNA分子（すなわち、リボザイム）とすることもできる（例えば、GibsonおよびShillito，1997を参照されたい）。より詳細には、植物細胞における遺伝子発現のアンチセンス調節の記載については米国特許第5,107,065号を参照され、dsRNAの転写による植物における遺伝子抑制の記載については米国特許第6,506,559号、米国特許出願公開2002/0168707 A1、および米国特許出願09/423,143（WO 98/53083を参照されたい）、09/127,735（WO 99/53050を参照されたい）および09/084,942（WO 99/61631を参照されたい）を参照されたい（すべて、出典明示して本明細書の一部とみなす）。

10

【0035】

他の内因性遺伝子のサイレンシングを生じて表現型を生じる配列（例えば、miRNAを含むRNAi技術）の使用も想定される。例えば、RNAiを用いて評点付け可能な表現型を生じる1またはそれを超える遺伝子をサイレンスさせ得る。1の形態は、配列の逆方向反復塩基配列を転写するDNAカセットをアセンブルして、少なくとも約19-21bp長のおよびサイレンシングに標的化する1またはそれを超える遺伝子の部分に対応する二本鎖RNA（dsRNA）を生成することである。したがって、関心のある表現型または形態の変化を発現するタンパク質またはmRNAを生成するいずれかの遺伝子は、本発明の実施に有用である。

20

【0036】

本発明によって包含される方法によって導入し得る核酸の例には、例えば、他の種からの配列または遺伝子である外来性DNA配列、または同一種起源のものでなくまたは同一種に存在しないが、古典的な再生または育種技術よりも遺伝子工学的方法によって受容細胞に取り込まれる遺伝子または配列が含まれる。しかしながら、外来性なる用語は形質転換する細胞に正常には存在しない遺伝子、形質転換DNAセグメントに見出される形態、構造ほかで存在しない遺伝子、または正常に存在するが異なる発現が望まれる遺伝子をいうことも意図される。したがって、「外来性」遺伝子またはDNAなる用語は、細胞により小さい遺伝子がすでに存在し得るか否かにかかわらず、受容細胞に導入するいずれの遺伝子またはDNAセグメントをいう。外来性DNAに含まれるDNAの型は、植物細胞中にすでに存在するDNA、他の植物からのDNA、異なる生物からのDNA、または遺伝子のアンチセンスメッセージを含むDNA配列または遺伝子もしくは配列の合成もしくは修飾バージョンをコードするDNA配列のような外部的に生成したDNAを含み得る。

30

【0037】

この開示に鑑みれば、膨大な他の可能な選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカー遺伝子、調節要素および関心のある他の配列が当業者に明らかであろう。したがって、前記に論じたことは、網羅的というよりも例示的であることを意図している。

40

【0038】

植物形質転換ベクターまたは構築物を構築した後、イン・ビトロ(in vitro)で調製したDNA組成物のような核酸分子は一般的にエスシェリキア・コリ(Escherichia coli)のような好適な宿主に導入し、アグロバクテリウムまたはリゾビウムのような他の好適な宿主に接合し、またはコンピテントなアグロバクテリウムまたはリゾビウムに直接的に形質転換する。これらの技術は当業者によく知られており、ダイズ、ワタおよびコムギを包含する多数の植物系について記載されている（例えば、米国特許第5,569,834号および5,159,135号ならびにWO 97/48814を参照されたい）。当業者であれば、アグロバクテリウム -

50

媒介形質転換法の有用性を認識するであろう。菌株には、限定されるものではないが、アグロバクテリウム・ツメファシエンシスC58株の非病原化誘導体、DNAの植物細胞へのトランスファーを媒介するために用いるノパリン株；LBA4404のようなオクトピン株；または、例えばEHA101、EHA105またはTiもしくはRiプラスミドを含むリゾビウム・レグミノサルム（*R. leguminosarum*）USDA2370のようなアグロピン株が含まれ得る。植物形質転換のためのこれらの菌株の使用は報告されており、その方法は当業者に知られている。

【0039】

形質転換すべき植物組織は、典型的には、少なくとも1の外來オーバードライブまたはTSS配列、トランスファーすべき関心のある配列、およびトランスファーすべきDNAを規定するようにaction（無冠詞）する少なくとも1のRB配列を含む組換え構築物を含むアグロバクテリウムまたはリゾビウムで注射および同時培養し、ついで、適当な条件下で選択した。ある種の形態において、ボーダー配列は「植物駆動ボーダー様の配列（または複数の配列）」とし得る。係る配列を同定および使用する方法はRommensら，2005；Rommens，2004a；Rommensら，2004b。

10

【0040】

本発明は、いずれかの形質転換細胞または組織と一緒に使用することができる。当業者であれば、形質転換可能な植物組織は、一般的に、そのゲノムに挿入された外來性DNAを有し得、適当な培養条件下で分化した植物を形成し得る組織をいう。かかる組織には、限定されるものではないが、細胞懸濁液、カルス組織、胚軸組織、子葉、胚、分裂組織、根および葉が含まれ得る。例えば、形質転換可能な組織には、葯、花粒粉、花序および葉組織からのカルスまたは胚様体が含まれ得る。他の組織も本発明の実施において有用性を有すると予想され、特定の植物種についての特定の外植片の望ましいものは当業者に知られているか、または日常的なスクリーニングおよび試験実験によって決定することができ、それによって種々の外植片が形質転換法で使用され、トランスジェニック植物を作成するのにより首尾よいものを同定することによって決定し得る。

20

【0041】

アグロバクテリウムまたはリゾビウムの使用によって双子葉植物を形質転換し、トランスジェニック植物を得る方法は、ワタ、ダイズ、アブラナ科植物およびラッカセイを含む多くの作物について公開されている。アグロバクテリウム - またはリゾビウム - ベースの方法による単子葉植物の首尾よい形質転換も報告されている。形質転換および植物再生は、少なくともアスパラガス、オオムギ、トウモロコシ、エンバク、イネ、サトウキビ、ヒロハノウシノケグサおよびコムギにおいて達成され、報告されている。ワタ形質転換に関連して特に有用となり得る技術は、米国特許第5,846,797号、第5,159,135号、第5,004,863号および第6,624,344号に開示されている。詳細なアブラナ科植物を形質転換する技術は、例えば米国特許第5,750,871号に開示されている。ダイズを形質転換する技術は、例えばZhangら（1999）および米国特許第6,384,301号に開示されており；トウモロコシを形質転換する技術は例えば米国特許第5,981,840号、第7,060,876号、第5,591,616号、WO 95 / 06722号および米国特許出願公開2004 / 244075に開示されている。

30

【0042】

1の形態において、選択剤を含まないアグロバクテリウムまたはリゾビウム増殖を阻害する抗生物質を含有する培地（delay medium）でインキュベートした後に、外植片は、限定されるものではないが、植物細胞選択剤を含有するカルス誘導培地を含む選択増殖培地で培養する。典型的な剤を記載し、限定されるものではないが、G418、パロモマイシン、カナマイシンのような抗生物質、グリフォセート、ジカンバおよびグルフォシネートのような他の化学物質が含まれる。選択培地を生存する植物組織培養物は、その後に、形質転換小植物の生成に好適な再生培地に移す。再生は幾つかの工程にわたって行うことができる。当業者であれば、植物の形質転換および再生用に各植物系統について行いおよび最適化し得る膨大な型の培地および移行要件を知っている。

40

【0043】

生成した形質転換体をその後に分析して、形質転換ベクターに含まれる関心のある特定

50

の核酸の存在または不存在を決定する。分子分析には、限定されるものではないが、サザンブロットまたはPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）分析が含まれ得る。これらおよび他のよく知られた方法を実施して、開示した方法によって作製した形質転換植物の安定性、ならびに、インサートのコピー数およびT-DNAを挟むベクター骨格配列の存在を確認することができる。これらの方法は当業者によく知られており、報告されている（例えば、Sambrookら, 1989を参照されたい）。

【 0 0 4 4 】

以前の議論は、標準的な形質転換および再生プロトコールの単なる広い概説である。当業者であれば、特定の作物および特定のプロトコールが広い外接から幾分変化し得ることを知っている。同様にして、種々の培地を各系統に用いることができる。当業者は、適当に補充した場合に植物組織の増殖および発達を支持する種々の組織培養培地をよく知っている。これらの組織培養培地は、市販の調製物として購入するかまたは当業者によって調製および修飾された注文品として購入し得る。かかる培地の例には、限定されるものではないが、MurashigeおよびSkoog（1962）;Chuら（1975）;LinsmaierおよびSkoog（1965）;UchimiyaおよびMurashige（1962）;Gamborgら（1968）;Duncanら（1985）;McCownおよびLloyd（1981）;Nitsch and Nitsch（1969）;および、SchenkおよびHildebrandt（1972）、またはそれに応じて補充したこれら培地の誘導体が含まれる。当業者であれば、形質転換および再生に使用するための培地ならびに栄養分および成長調節剤のような培地補充物は、通常、関心のあ

る標的作物または品種について最適化することを知っている。試薬は市販されており、多数の供給業者（例えば、Sigma Chemical Co., St.Louis, MO）から購入することができる。

【 0 0 4 5 】

「オーバードライブ」配列は、pTiA6、pTiAB3およびpTi15955を含む膨大なTiプラスミドで同定されている。オーバードライブまたはTSSに非常に類似する他の配列は、例えばSequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wis. 53711の「BestFit」、「Gap」または「FASTA」プログラム、または「BLAST」プログラム（Altschulら, 1990）もしくは他の入手可能なDNA配列解析パッケージを用いて同定することができる。かかる配列がRB配列付近に多数コピーで存在する場合、それは、以下にそのエンハンサー活性を記載する配列に類似する形質転換向上活性についてアッセイし得る。

【 0 0 4 6 】

本明細書中で用いる「形質転換の頻度」または「形質転換頻度」とは、外植片当たり生成されるトランスジェニック事象のパーセントまたは外植片当たり生成されるトランスジェニック植物のパーセントをいう。

【 0 0 4 7 】

「ボーダー配列」、例えば右側ボーダー（RB）または左側ボーダー（LB）とは、典型的には約24bp長のトランスファードNA（T-DNA）領域の末端を確定するダイレクトリピート核酸配列をいう。ボーダー配列は、アグロバクテリウム種のTiまたはRiプラスミドからのものとすることができ、あるいは、同様に機能する植物由来の配列とすることができ。

【 0 0 4 8 】

「T-DNAボーダー領域」とは、RBまたはLB配列ならびに典型的には約100bp長である関連するフランキング配列をいい、自然で見出されるように、形質転換エンハンサー配列を含むことができる。

【 0 0 4 9 】

本明細書中で用いる「形質転換効率」とは、さらなる商業的開発のための事象を選択するのに必要な資源の量を減少することによって形質転換プロセスの全体効率に影響を及ぼす形質転換頻度および質的事象における増大のようないずれかの改善をいう。

【 0 0 5 0 】

本明細書中で用いる「形質転換エンハンサー」とは、オーバードライブおよびTSS配列をいう。

10

20

30

40

50

オーバードライブ、さらなるオーバードライブまたは18×TSSを有するベクターの構築

24bpのRBの正面にオーバードライブまたはTSSを位置させるために、ノパリンRBにEcoRI部位を導入した（（pMON83900の）RBの上流から11bp離れて）。EcoRIで消化した対応するTOPOクローニングベクターから4×オーバードライブまたは18×TSSを切り出し、EcoRIによって開環したpMON83900に挿入して、各々、pMON83903およびpMON83909を得た。

【0056】

pMON83903およびpMON83909からの4×オーバードライブまたは18×TSSのいずれかを含む修飾RBをHindIII / SpeIで消化し、それを用いてpMON83902の1×オーバードライブRBを、4×オーバードライブまたは18×TSSエンハンサー配列を含むHindIII / SpeIフラグメントで置き換えて、各々、ダイズ形質転換用のpMON87462およびpMON83864を得た。別法として、pMON80105のRBを、pMON83903またはpMON83909からのSpeI / SalIフラグメントを挿入することによって4×オーバードライブまたは18×TSSを含むように修飾して、各々、トウモロコシ形質転換用のpMON87465およびpMON87466を得た。1×、4×および18×形質転換エンハンサー配列を有する修飾したRBを図1および4ならびに配列番号：14 - 16に示す。

【0057】

1×オーバードライブ配列を含む構築物（配列番号：17）は、最初に、標準的なプロトコルに従って30bpのオーバードライブ配列を含むオリゴヌクレオチドをアセンブリングし、ついでそれをpBlueScript（登録商標）II（Stratagene Inc., La Jolla, CA）にクローニングすることによって合成してpMON80088を得た。ついで、pMON80088からのSpeIおよびNotI（ポリメラーゼで埋めた）フラグメントをSpeIおよびSmaIで消化したpMON80105に挿入して、トウモロコシ形質転換用のpMON80121を得た。ダイズ形質転換については、1×オーバードライブRB構築物pMON83902を、pMON83898中のRBをPmeI / NdeI制限酵素部位を用いたpMON80121からの1×オーバードライブRBフラグメントで置き換えることによって作製した。

【実施例3】

【0058】

オーバードライブまたはTSS - エンハンスドRB配列でのトウモロコシの形質転換

形質転換頻度ならびに低コピー数のT-DNA挿入を含むおよびベクター骨格配列を欠失する事象（例えば、E.coli由来のoriV）の比率を改善するさらなるオーバードライブおよびTSSエンハンサー配列のスタッキングの能力を評価するために、米国特許出願公開2004/244075に実質的に記載されたように、トウモロコシ（Zea mays）細胞をoriVを含有するベクターpMON80105、pMON80121、pMON87465またはpMON87466で形質転換した。表1に示すように、スタックしたエンハンサー配列を含む構築物の使用は、形質転換頻度における統計学的に有意な増大を生じた。これらの構築物を用いて、高比率の品質のTFも得た。品質TFは、TFおよび1または2のコピーを有する事象を組合せる。また、1または2のコピーを有する事象のパーセントも増大した。

【0059】

【表1】

表1: トウモロコシにおける形質転換頻度および事象品質に対する形質転換エンハンサー配列の効果

RB 中の オーバードライブ	構築物 (pMON)	% 形質転換頻度 (TF) ^a	% 品質 TF	骨格に関わりなく 1 または 2 のコピー事 象の%
4X OD	87465	25.3	12.7%	50.1
1X OD	80121	24.1	10.4%	43.2
18X TSS	87466	22.8	10.2%	44.7
対照	80105	17.7	6.4%	39.0

^a は統計学的有意性を示す

【実施例 4】

【0060】

オーバードライブまたはTSS - エンハンスドRB配列でのダイズの形質転換

形質転換頻度ならびに低コピー数のT-DNA挿入を含むおよびベクター骨格配列を欠失する事象（例えば、E.coli由来のoriV）の比率を改善するさらなるオーバードライブおよびTSSエンハンサー配列のスタッキングの能力を評価するために、米国特許第6,384,301号に実質的に記載されたように、ダイズ（Glycine max）細胞をoriVを含有するベクターpMON83898、pMON83902、pMON87462またはpMON87464で形質転換した。スタックした4×オーバードライブおよび18×TSSエンハンサーの配列は、各々、配列番号：10および配列番号：11に見出される。対照の処理は、オーバードライブまたはTSS配列を欠く、pMON83898での形質転換からなる。表2-3に示すように、スタックした形質転換エンハンサー配列を含む構築物の使用は、形質転換頻度の増大を生じた。単一コピーおよび骨格を含まない事象の頻度も増大した（表3；5段）。また、1またはそれを超えるコピーを有する事象のパーセントも増大した。

10

【0061】

【表 2】

表 2：ダイズにおける形質転換頻度に対する形質転換エンハンサー配列の効果

エンハンサー配列	pMON プラスミド	形質転換頻度 (%)
対照	83898	2.79
1X オーバードライブ	83902	3.06
4X オーバードライブ	87462	4.22*
18X TSS	87464	4.10*

20

* 統計学的に有意な増大

【0062】

【表 3】

表 3：事象品質に対する形質転換エンハンサー配列の効果

pMON プラスミド	全事象	oriV 陽性/全 GOI 陽性	oriV 陰性/全 GOI 陽性	1 コピー/ oriV 陰性	oriV の存在または 不存在に関わりのない1 また は2 コピー
83898 (対照)	31	6/24 (25%)	18/24 (75%)	1 (4%)	19 (79%)
83902 (1X OD)	61	16/45 (35.5%)	29/45 (64.5%)	6 (13.3%)	30 (66.7%)
87462 (4X OD)	43	12/33 (36.4%)	21/33 (63.6%)	4 (12.1%)	23 (69.7%)
87464 (18X TSS)	71	10/50 (20%)	40/50 (80%)	17 (34%)	37 (74%)

30

40

【実施例 5】

【0063】

さらなる形質転換エンハンサー配列

上記で使用したpTiA6のオーバードライブ配列（配列番号：17）に加えて、他のオーバードライブ配列（逆相補的配列を含む）が当該技術分野で知られており（例えば、Shurvi

50

ntonおよびReam, 1991)、同様に用いることができる。これらの配列には限定されるものではないが、数ある中で、pTiAB3 (GenBank M63056) からのもの (TGTGAATAAATCGCTG TGTATGTTTGTGTTG; 配列番号: 8) および pTi15955 (GenBank AF242881) からのもの (TTGTCTA AATTTCTGTATTTGTTTGTGTTG; 配列番号: 9)、および共通配列 AAACAAACATACACAGCGACTTATTCAC A (配列番号: 13) および TAARTYNCTGTRTNTGTTTGTGTTG (配列番号: 19, Toroら, 1988) が含まれ得る。実施例1に記載したようにプライマーを合成し、ついでPCRを行って、数ある中で、pMON83902、pMON80121、pMON87462およびpMON87465に類似する組換えプラスミドの構築に使用するこれらの配列を含むDNAセグメントを作製した。作物植物は、1またはそれを超えるこれらの形質転換エンハンサー配列を含む構築物で形質転換することができ、形質転換頻度ならびに低コピー数T-DNA挿入を含むおよびベクター骨格配列を欠失する事象の比率を改善するそれらの能力について評価することができる。

10

【0064】

本明細書に開示および特許請求する全ての組成物および方法は、本開示に鑑みて過度な実験なしに作製および実施することができる。本発明の組成物および方法を前記の例示的な形態によって記載したが、本発明の真実の概念、意図および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載した組成物、方法、および方法の工程または一連の工程に変形、変化、修飾および改変を加え得ることは当業者に明らかであろう。より詳細には、同一または同様の結果が達成される限り、化学的および生理学的の両方で関連するある種の剤を本明細書に記載した剤に置換し得ることは明らかであろう。当業者に明らかになる同様の置換および修飾は、添付する特許請求の範囲によって規定される発明の意図、範囲および概念の範囲内にあるとみなす。

20

【0065】

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書に記載したものを補充する例示的な手順または他の詳細を提供する範囲で、出典明示して本明細書の一部とみなす。

米国特許第5,004,863号; 米国特許第5,094,945号; 米国特許第5,107,065号; 米国特許第5,159,135号; 米国特許第5,273,894号; 米国特許第5,276,268号; 米国特許第5,561,236号; 米国特許第5,569,834号; 米国特許第5,591,616号; 米国特許第5,627,061号; 米国特許第5,633,435号; 米国特許第5,637,489号; 米国特許第5,646,024号; 米国特許第5,750,871号; 米国特許第5,846,797, 米国特許第5,981,840号; 米国特許第6,040,497号; 米国特許第6,506,559号; 米国特許第6,624,344号; 米国特許第6,384,301号; 米国特許第7,022,896号; 米国特許第7,060,876号;

30

米国特許出願番号09/084,942号; 米国特許出願番号09/127,735号; 米国特許出願番号09/423,143号;

米国特許出願公開2002/0168707 A1; 米国特許出願公開2003/0188345; 米国特許出願公開2004/0140376; 米国特許出願公開2004/244075; 米国特許出願公開2006/0041956

Altschulら, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990.

Barkerら, *Plant Mol. Biol.*, 2:335-350, 1983.

Birdら, *Biotech Gen. Engin. Rev.*, 9: 207-227, 1991.

Canadayら, *Mol. Gen. Genet.*, 235:292-303, 1992.

40

Chuら, *Scientia Sinica* 18:659, 1975.

Closeら, *J. Bacteriol.*, 169(11):5113-5118, 1987.

Culianez-MaciaおよびHepburn, *Pl. Mol. Biol.*, 11:389-399, 1988.

Dekeyserら, *Pl. Physiol.*, 90:217-223, 1989.

Della-Cioppaら, *Bio/Technology*, 5 579-584, 1987.

Depickerら, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-573, 1982.

Duncanら, *Planta*, 165:322-332, 1985.

Gamborgら, *Exp. Cell Res.*, 50:151, 1968.

Gelvin, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 67:16-37, 2003.

GibsonおよびShillito, *Mol. Biotech.*, 7:125-137, 1997.

50

- Hansenら, *Plant Mol. Biol.*, 20(1):113-122, 1992.
- JenおよびChilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(11):3895-3899, 1986.
- Joersboら, *Mol. Breed.*, 4:111-117, 1998.
- Kononovら, *Plant J.* 11:945-957, 1997.
- LinsmaierおよびSkoog, *Physiol. Plant.*, 18 100, 1965.
- McCownおよびLloyd, *HortScience*, 16:453, 1981.
- MikiおよびMcHugh, *J. Biotechnol.*, 107:193, 2004.
- MurashigeおよびSkoog, *Physiol. Plant*, 15: 473-497, 1962.
- NitschおよびNitsch, *Science*, 163:85-87, 1969.
- 国際公開WO 01/44482; 国際公開WO 02/00900; 国際公開WO 04/074443; 国際公開WO 04/09761; 国際公開WO 05/121346; 国際公開WO 05/107437; 国際公開WO 95/06722; 国際公開WO 97/48814; 国際公開WO 98/53083; 国際公開WO 99/53050; 国際公開WO 99/61631
- Peraltaら, *EMBO J.* 5(6):1137-1142, 1986.)
- Rommensら, *Plant Physiol.*, 139:1338-49, 2005.
- Rommens, *Trends Plant Sci.*, 9:457-64, 2004a.
- Rommensら, *Plant Physiol.*, 135:421-31, 2004b.
- Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- SchenkおよびHildebrandt, *Can. J. Bot.*, 50: 199-204, 1972.
- Shawら, *Nucleic Acids Res.*, 12(15):6031-6041, 1984.
- ShurvintonおよびReam, *J Bacteriol.*, 173(17):5558-5563, 1991.
- Slightonら, *EMBO J.*, 4(12):3069-3077, 1985.
- Toroら, *J. Bacteriol.*, 171(12):6845-6859, 1989.
- Toroら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8558-8562, 1988.
- UchimiyaおよびMurashige, *Plant Physiol.* 15:73, 1962.
- Van Haarenら, *Nucleic Acids Res.*, 15(21):8983-8997, 1987a.
- Van Haarenら, *Plant Mol. Biol.*, 11:773-781, 1988.
- Van Haarenら, *Plant Mol. Biol.*, 8:95-104, 1987b.
- Wangら, *Cell*, 38:455-462 1984.
- Zhangら, *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 56:37-46, 1999.

10

20

30

【 0 0 6 6 】

配列表の説明

- 配列番号:1 2X OD配列調製用のフォワードプライマーXd463
- 配列番号:2 2X OD配列調製用のリバースプライマーXd464
- 配列番号:3 6X TSS配列調製用のフォワードプライマー Xd465
- 配列番号:4 6X TSS配列調製用のリバースプライマーXd466
- 配列番号:5 pTiA6の24 bpコアOD
- 配列番号:6 8bp 1x TSS配列
- 配列番号:7 pTiA6の30 bp 1x OD; 配列番号:17の逆方向相補体
- 配列番号:8 pTiAB3からの1X OD配列
- 配列番号:9 pTi15955からの1X OD
- 配列番号:10 4X 積層OD
- 配列番号:11 18X 積層TSS
- 配列番号:12 1X OD配列を含むボーダー領域
- 配列番号:13 部分OD配列
- 配列番号:14 1X ODを含むノパリンRB領域
- 配列番号:15 4X ODを含むノパリンRB領域
- 配列番号:16 18X TSSを含むノパリンRB領域
- 配列番号:17 1X OD; 配列番号:7の逆方向相補体
- 配列番号:18 4X 積層OD; 配列番号:10の逆方向相補体

40

50

【 図 4 】

(A)

ノパリン RB+1xオーバードライブ

AGGATTATTTTCGGCGCTGGCGTACCTTCGGCAGCCGGTGTGAGGGATCAAGC
CAGACAGGCCATCGACTCTTACGACGACCCAGACAGCAACAAGGATCTTTTG
GAATGCTGCTCCGCTGCTAGCGCTTTCGGACGTTTGGGTGGTTGAACAGCAAGTCAT
TATCGCAGCGGAATGCCAAGCATCTCCGAGGGGGAACCTCTGTGTTGGCATGCACA
TACAAATGGACAGACCGGATAAACCTTTCTACGCCCTTTTAAATATTCGGATTATTC
TATATAACCTGTCTTCAACAACAGATACAAGCGATTattacataCTCTTATAGTTTACGCCCA
ATAATATCTGTCGTAACAACCTGATAGTTTAAATCAAGGCGGGAAAGACAACT

(B)

ノパリンRB+4xオーバードライブ

AGGATTATGCTGGGCGTCTGACCTACGTCCGCGACCGCGTGATGGGGATCAAGCG
ACACGAGCCCACTGCATCTTCTAGCCGACCCAGCAAGCAAGGATCTTTTGG
AATGCTGCTCTCGCTCGTCAAGCTTTCCGACGTTTGGGTGGTGAACAAGATGCAT
ATCGeACGGAATCGeAACACCTCCGAGGGGAAACCTTGTTGGTGGCATGCATATA
CAATAGCGGAACACGATAAACCTTTTACGCGCTTTTAATAATCCGATATTCTAA
TAAACCGCTCTTGAATTTGCCCTTTCaaacaaacatcatagcgacttattcaacaaacaaatataca
gagactattcaacaaacaaacatatacagactatttcaacaaacaaacatatacagactatttcaacaaAGGG
CGAATTGCTTATAGTTTTCACCGCCAATATATCTTGTCAAACACTGATAGTTTAAAC
CTGAAGCGGGGAAGACGAACCTT

(C)

ノバリンRB+18x TSS

[illegible]

FIG. 4

【配列表】

2018171069000001.app

【手續補正書】

【提出日】平成30年7月30日(2018.7.30)

【 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】

配列番号：6、配列番号：6の完全長に相補的な配列またはそれらの組合せの1またはそれを超えるコピーを含む形質転換エンハンサー配列に作動可能に連結されたT-DNAボーダー配列を含む、組換えDNA構築物。

【請求項2】

エンハンサー配列が少なくとも4コピーの該配列を含む、請求項1記載の構築物。

【請求項 3】

ボーダー配列が右側ボーダー（RB）配列である、請求項 1 記載の構築物。

【請求項4】

ボーダー配列が左側ボーダー（LB）配列である、請求項 1 記載の構築物。

【請求項 5】

請求項 1 記載の構築物で形質転換したトランスジェニック細胞。

【請求項 6】

植物または細菌の細胞として規定される、請求項 5 記載の細胞。

【請求項 7】

細胞がアグロバクテリウムの細胞である、請求項6記載の細胞。

【請求項 8】

細胞がリゾビウムの細胞である、請求項6記載の細胞。

【請求項 9】

植物細胞が、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンパク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ホウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである、請求項6記載の細胞。

【請求項 10】

請求項1記載の構築物で形質転換したトランスジェニック植物。

【請求項 11】

ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンパク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ホウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される、請求項10記載のトランスジェニック植物。

【請求項 12】

組換え構築物を作製する方法であって、

少なくとも1のさらなる形質転換エンハンサー配列を植物形質転換ベクターに導入し、それによって少なくとも2の形質転換エンハンサー配列を含む組換え構築物を作製することを含み、ここに該ベクターは少なくとも1のT-DNAボーダー領域を含み、該ボーダー領域は第1の形質転換エンハンサー配列を含み、ここに該形質転換エンハンサー配列は配列番号：6と配列番号：20とを含み、ここに形質転換エンハンサー配列はT-DNAボーダー領域に作動可能に連結する、方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の組換え構築物を作製する方法であって、該形質転換エンハンサー配列が配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9 および配列番号：13 よりなる群から選択される配列の1またはそれを超えるコピーをさらに含む、該方法。

【請求項 14】

配列番号：6および配列番号：20の1またはそれを超えるコピーの組合せを含む形質転換エンハンサー配列に作動可能に連結したT-DNAボーダー配列を含む組換えDNA構築物。

【請求項 15】

該形質転換エンハンサー配列が配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9 および配列番号：13 よりなる群から選択される配列の1またはそれを超えるコピーをさらに含む、請求項 14 記載の構築物。

【請求項 16】

ボーダー配列が右側ボーダー (RB) 配列である、請求項14または15記載の構築物。

【請求項 17】

ボーダー配列が左側ボーダー (LB) 配列である、請求項14または15記載の構築物。

【請求項 18】

RB配列がノパリンTiプラスミドからのものである請求項15または16記載の構築物。

【請求項 19】

RB配列がオクトピンTiプラスミドからのものである請求項15または16記載の構築物。

【請求項 20】

請求項 1 4 または 1 5 記載の構築物で形質転換したトランスジェニック細胞。

【請求項 2 1】

植物または細菌の細胞として規定される、請求項 2 0 記載の細胞。

【請求項 2 2】

細胞がアグロバクテリウムの細胞である、請求項 2 1 記載の細胞。

【請求項 2 3】

細胞がリゾビウムの細胞である、請求項 2 1 記載の細胞。

【請求項 2 4】

植物細胞が、ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ホウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである、請求項 2 1 記載の細胞。

【請求項 2 5】

請求項 1 4 または 1 5 記載の構築物で形質転換したトランスジェニック植物。

【請求項 2 6】

ダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ホウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される、請求項 2 5 記載のトランスジェニック植物。

【請求項 2 7】

ボーダー領域が右側ボーダー (RB) 配列である、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 2 8】

ボーダー領域が左側ボーダー (LB) 配列である、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 2 9】

さらに、リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介形質転換によって該組換え構築物で植物細胞を形質転換することを含み、ここにリゾビウム属細菌 (Rhizobia) は該植物細胞の形質転換にコンピ-テントである、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 3 0】

リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介形質転換は、アグロバクテリウム - 媒介形質転換である、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

リゾビウム属細菌 (Rhizobia) - 媒介形質転換は、アグロバクテリウム - 、リゾビウム - 、シノリゾビウム - 、メソリゾビウム - 、またはブラディリゾビウム - 媒介形質転換である、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 2】

植物細胞がダイズ、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、イネ、コムギ、アルファルファ、インゲン、ラッカセイ、タバコ、ヒマワリ、オオムギ、トウチサ属の各種植物 (beet)、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ、ナス、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、タマネギ、エンドウ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ハツカダイコン、サトウモロコシ、ホウレンソウ、カボチャ (squash)、テンサイ、トマトおよびスイカよりなる群から選択される植物からのものである、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 3】

植物細胞がトウモロコシまたはダイズの細胞である、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

T-DNAボーダー領域が該形質転換エンハンサー配列の2～約18コピーを含む、請求項 1 2 または 1 3 記載の方法。

【請求項 3 5】

さらに、該植物細胞からトランスジェニック植物を再生することを含む、請求項 2 9 記載の方法。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 0 1 H 6/54 (2018.01)	A 0 1 H 6/54	
A 0 1 H 6/60 (2018.01)	A 0 1 H 6/60	
A 0 1 H 6/82 (2018.01)	A 0 1 H 6/82	
A 0 1 H 6/34 (2018.01)	A 0 1 H 6/34	
A 0 1 H 6/06 (2018.01)	A 0 1 H 6/06	
A 0 1 H 6/04 (2018.01)	A 0 1 H 6/04	

(72)発明者 ラリー・ギルバートソン

アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブールバード 8 0 0 番

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB02 CA14 CB02

4B065 AA01X AA01Y AA88X AA88Y AB01 BA02 CA53

【 外国語明細書 】

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

DESCRIPTION**USE OF MULTIPLE TRANSFORMATION ENHANCER SEQUENCES TO
IMPROVE PLANT TRANSFORMATION EFFICIENCY****BACKGROUND OF THE INVENTION**

5 This application claims the priority of United States Provisional Patent Application 60/831,814, filed July 19, 2006, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety.

1. Field of the Invention

 The invention relates generally to plant biotechnology. More specifically, the
10 invention relates to methods and compositions for improving the efficiency of bacterially-mediated plant transformation.

2. Description of Related Art

 During natural *Agrobacterium*-mediated transformation of plant cells, a piece of DNA from the Ti plasmid of *A. tumefaciens* or Ri plasmid of *A. rhizogenes* is
15 transferred into the plant cell (e.g. Gelvin, 2003). This transferred DNA (T-DNA) fragment is flanked by imperfect 24 bp direct repeats that are recognized by *Agrobacterium* endonuclease VirD2 to produce a single stranded T-strand by nicking at a specific site in one strand of each repeat. The repeat that initiates formation of single stranded T-strand has been termed the “right border” (RB), while the repeat
20 terminating formation of single-stranded T-DNA has been termed the “left border” (LB). The VirD2 protein is attached to the 5’ end of the strand after nicking, and guides the T-strand into plant cells where the T-strand is integrated into the plant genome with the help of other *Agrobacterium* and plant-encoded proteins. Sequences downstream (in a 5’ to 3’ direction) of the T-DNA region, including vector backbone
25 sequence, may be transferred as well (e.g. Kononov *et al.*, 1997). This likely occurs by inefficient nicking of at least one of the borders in *Agrobacterium* prior to transfer to a plant cell.

 Comparison of the RB and LB sequences from a variety of *Agrobacterium* strains indicated that both RB and LB share a consensus motif (Canaday *et al.*, 1992),
30 which indicates that other elements may be involved in modulating the efficiency of

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

RB processing. Cis-acting sequences next to the RB are present in many *Agrobacterium* strains, including *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*. These sequences are necessary for wild type virulence (Veluthambi *et al.*, 1988; Shurvinton and Ream, 1991; Toro *et al.*, 1989; Toro *et al.*, 1988; Hansen *et al.*, 1992). The sequence
 5 in *A. tumefaciens* was called an “overdrive” or “T-DNA transmission enhancer” by Peralta *et al.*, (1986). In *A. rhizogenes* the sequence has been termed the “T-DNA transfer stimulator sequence” (TSS) by Hansen *et al* (1992). The overdrive (“OD”) sequence was initially defined as a particular 24 bp motif present immediately in front of the RB repeat of octopine Ti TL-DNA (Peralta *et al.*, 1986). A similar sequence is
 10 present in front of the RB repeat of octopine Ti TR-DNA and also in front of nopaline Ti RB and agropine Ri TL right border (Peralta *et al.*, 1986, Shaw *et al.*, 1984, Barker *et al.*, 1983, Slighton *et al.*, 1985). Further comparison of different *A. tumefaciens* strains revealed a 8 bp overdrive core sequence present in front of all right border sequences including nopaline strain pTiT37, octopine strain pTiA6 and *A. rhizogenes*
 15 pRiA4 (Peralta *et al.*, 1986).

The presence of octopine overdrive sequence enhanced single strand T-DNA formation in *Agrobacterium* cells and improved T-DNA transfer into plant cells, and was necessary for wild type virulence (Peralta *et al.*, 1986, Shurvinton and Ream 1991). The LB repeat from nopaline-producing Ti plasmid pTiT37 is capable of
 20 producing single-stranded T-DNA with high efficiency when the pTiT37 RB proximal cis-acting sequence was placed in front of it, indicating that an overdrive-like sequence indeed is also present on a nopaline Ti plasmid (Culianez-Macia and Hepburn 1988, Peralta *et al.*, 1986), just as it is in the other identified (octopine-producing) Ti plasmids. Integration of a heterologous octopine overdrive sequence in
 25 front of nopaline pTiT37 RB resulted in much greater virulence than the parental strain which contained only a synthetic pTiT37 RB repeat (Peralta *et al.*, 1986).

The VirC1 protein binds to overdrive and is thought to improve VirD2 nicking (Toro *et al.*, 1988, 1989), while mutation of *virC* results in attenuated virulence in plants (Close *et al.*, 1987) and reduced production of processed single stranded T-
 30 DNA sequence. Both *A. tumefaciens* octopine and nopaline Ti plasmids contain *virC* and can complement the *virC* mutation *in trans* to restore the attenuated virulence to wild type level (Close *et al.*, 1987).

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

The TSS found in *A. rhizogenes* strains 8196, A4 and 2659 plays a similar role as the overdrive sequence in *A. tumefaciens*. Each *A. rhizogenes* strain has a different but related sequence (Hansen *et al.*, 1992). The 8 bp TSS core sequence repeats 5 times in pRiA4, 6 times in pRi8196 and 17 times (rather than 16x as Hansen *et al.*, 1992) in pRi2659 (Genbank accession AJ271050). pRiA4 has a conserved 8 bp overdrive core sequence in addition to the repeats. Shorter core sequence repeats in pRiA4 and pRi8196 were not sufficient for wild type virulence (Hansen *et al.*, 1992).

Depicker *et al.* (U.S. Patent Publication 2003/0140376, and corresponding international publication WO01/44482) describe recombinant constructs with modified T-DNA borders in order to lessen or prevent transference of vector backbone sequences. Conner *et al.*, (WO 05/121346) describe creation and use of sequences from T-DNA border-like regions that comprise sequences derived from plants. Heim *et al.* (U.S. Publ. 2003/0188345) describe vectors for *Agrobacterium*-mediated transformation of plants with modified border regions. Lassner *et al.*, (U.S. Publ. 2006/0041956) describe modifications to T-DNA border regions to enable identification of transgenic events that do not comprise non T-DNA sequences.

While the foregoing studies have increased understanding in the art, what remains needed is a method to improve the efficiency of *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Although the presence of overdrive or TSS sequences increases virulence of wild type *Agrobacterium* and improves T-DNA transfer into plant cells compared to plasmids lacking the sequences, it has remained unclear how to further improve transformation efficiency including through the use of overdrive or TSS sequences.

SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the invention provides a method of increasing the efficiency of bacterially-mediated plant transformation, comprising the steps of: a) introducing at least one additional transformation enhancer sequence into a plant transformation vector comprising at least one T-DNA border region; and b) transforming a plant cell with the vector by bacterially-mediated transformation, wherein the bacterium is competent for the transformation of the plant cell. The method may optionally comprise regenerating a transgenic plant from the plant cell. In one embodiment, the additional transformation enhancer sequence comprises a consensus core sequence of

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

TGTWTGTK (SEQ ID NO:20). In other embodiments, the additional transformation enhancer sequence is selected from the group consisting of: SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13, and a sequence complementary to any of SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, or SEQ ID NO:13. In particular embodiments, the invention provides a recombinant DNA construct comprising SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, or SEQ ID NO:16.

The transformation enhancer sequence used with the invention may be located proximal to a T-DNA border region or sequence, such as a right border (RB) sequence, *i.e.* between flanking sequence such as vector sequence and the border sequence. The transformation enhancer sequence may be from a Ti plasmid of *A. tumefaciens*, such as a nopaline or octopine plasmid, or may be from an Ri plasmid of *A. rhizogenes*. In certain embodiments, the bacterially-mediated transformation may utilize a technique selected from *Agrobacterium*-mediated transformation, *Rhizobium*-mediated transformation, and *Sinorhizobium*-, *Mesorhizobium*- or *Bradyrhizobium*-mediated transformation. In certain embodiments, the transformation enhancer sequence may comprise SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:17, or SEQ ID NO:18. In further embodiments, the T-DNA border region may comprise from 1 to about 18 copies of the transformation enhancer sequence, including from about 2 or about 4 to about 18 copies of the transformation enhancer sequence.

A plant cell in accordance with the invention may be any plant cell. In certain embodiments, the plant cell is from a plant selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco, sunflower, barley, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, Chinese cabbage, cucumber, eggplant, leek, lettuce, melon, oat, onion, pea, pepper, peanut, potato, pumpkin, radish, sorghum, spinach, squash, sugarbeet, tomato and watermelon. In particular embodiments, the plant cell is a corn cell or a soybean cell.

In another aspect, the invention provides a recombinant DNA construct comprising a T-DNA border sequence of a Ti or Ri plasmid, operably linked to a transformation enhancer sequence that comprises two or more copies of a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13, a sequence complementary to any of SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, or SEQ ID NO:13, and combinations

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

thereof. In particular embodiments, the invention provides a recombinant DNA construct comprising SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, or SEQ ID NO:16.

In such a construct, the enhancer sequence may comprise at least about four copies of the sequence. The border sequence may be a right border (RB) or left border (LB) sequence. In certain embodiments, the construct may comprise SEQ ID NO:10 and/or SEQ ID NO:11. The RB sequence may be from a nopaline Ti plasmid, or an agropine, mannopine, succinamopine, cucumopine, or octopine Ti or Ri plasmid and may comprise SEQ ID NO:12.

In another aspect, the invention provides a cell transformed with a construct provided herein. The cell may be a plant or bacterial cell, including an *Agrobacterium* cell and *Rhizobium* cell. In one embodiment, the plant cell is from a plant selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco and sunflower. The invention also provides transgenic plants transformed a construct of the invention. In particular embodiments, the transgenic plant may be selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco and sunflower.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawings are part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to the drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

FIG. 1: Outline of various transformation enhancer sequences used for improving transformation efficiency.

FIG. 2: Schematic map of pMON87464.

FIG. 3: Schematic map of pMON87465.

FIG. 4: Engineered RB sequences; overdrive sequence is in bold and the 24 bp RB core sequence underlined. (A) sequence of the Nopaline RB+1x overdrive (SEQ ID NO:14); (B) Nopaline RB+4x overdrive (SEQ ID NO:15); (C) Nopaline RB+18x TSS (SEQ ID NO:16).

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

DESCRIPTION OF SEQUENCE LISTING

	SEQ ID NO:1	Forward primer Xd463 for 2X OD sequence preparation.
	SEQ ID NO:2	Reverse primer Xd464 for 2X OD sequence preparation.
5		
	SEQ ID NO:3	Forward primer Xd465 for 6X TSS sequence preparation.
	SEQ ID NO:4	Reverse primer Xd466 for 6X TSS sequence preparation.
10	SEQ ID NO:5	24 bp core OD of pTiA6.
	SEQ ID NO:6	8 bp 1x TSS sequence.
	SEQ ID NO:7	30 bp 1x OD of pTiA6; reverse complement of SEQ ID NO:17.
	SEQ ID NO:8	1X OD sequence from pTiAB3.
15	SEQ ID NO:9	1X OD from pTi15955.
	SEQ ID NO:10	4X stacked OD.
	SEQ ID NO:11	18X stacked TSS.
	SEQ ID NO:12	Border region with 1X OD sequence.
	SEQ ID NO:13	Partial OD sequence.
20	SEQ ID NO:14	Nopaline RB region with 1X OD.
	SEQ ID NO:15	Nopaline RB region with 4X OD.
	SEQ ID NO:16	Nopaline RB region with 18X TSS.
	SEQ ID NO:17	1X OD; reverse complement of SEQ ID NO:7.
	SEQ ID NO:18	4X stacked OD; reverse complement of SEQ ID NO:10.
25	SEQ ID NO:19	Consensus OD sequence (Toro <i>et al.</i> , 1988).
	SEQ ID NO:20	Consensus 8 bp core OD sequence.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The following is a detailed description of the invention provided to aid those skilled in the art in practicing the present invention. Those of ordinary skill in the art may make modifications and variations in the embodiments described herein without departing from the spirit or scope of the present invention.

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

The invention provides methods and compositions for improving the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of plant cells. Sequencing of the 20 kb T-DNA region of *A. rhizogenes* K599, a soybean super virulent strain, led to the recognition that the pRi plasmid in *A. rhizogenes* K599 is identical to the *A. rhizogenes* NCPBB 2659 strain. The super-virulence of the K599 strain may thus be related to the number of TSS sequences present near the RB. Therefore, stacking of multiple overdrive and TSS repeats was tested in binary vectors with a nopaline RB (e.g. from pTiT37) to improve transformation efficiency. The octopine Ti plasmid's 30 bp overdrive (Shurvinton and Ream 1991) from pTiA6, present in 4 copies, and the *A. rhizogenes* NCPBB2659 TSS 8 bp core sequence, present in 18 copies, was used to enhance T-DNA transmission efficiency.

Transformation studies comparing the use of constructs containing varying numbers of overdrive or TSS sequences demonstrated that the presence of additional "stacked" copies of these sequences improved transformation efficiency by improving transformation frequency as well as the quality of the resulting transgenic events. For example, the proportion of events with single copy insertions, and also lacking vector backbone sequences (e.g. *oriV*), was increased. Increased transformation frequency and quality events improve the overall efficiency of the transformation process by reducing the amount of resources required to select event for further commercial development.

The invention therefore provides improved methods for obtaining fertile transgenic plants and for the transformation of plant cells or tissues and regeneration of the transformed cells or tissues into fertile transgenic plants. To initiate a transformation process in accordance with the invention, the genetic components desired to be inserted into the plant cells or tissues will first be selected. Genetic components may include any nucleic acid that is to be introduced into a plant cell or tissue using the method according to the invention. Genetic components can include non-plant DNA, plant DNA, or synthetic DNA.

In certain embodiments of the invention, genetic components are incorporated into a DNA composition such as a recombinant, double-stranded plasmid or vector molecule comprising genetic components such as: (a) a promoter that functions in plant cells to cause the production of an RNA sequence, (b) a structural DNA sequence that causes the production of an RNA sequence that encodes a desired

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

protein or polypeptide, and (c) a 3' non-translated DNA sequence that functions in plant cells to cause the polyadenylation of the 3' end of the RNA sequence. The vector may also contain genetic components that facilitate transformation and regulate expression of the desired gene(s).

5 The genetic components are typically oriented so as to express an mRNA, which in one embodiment can be translated into a protein. The expression of a plant structural coding sequence (a gene, cDNA, synthetic DNA, or other DNA) that exists in double-stranded form involves transcription of messenger RNA (mRNA) from one strand of the DNA by RNA polymerase and subsequent processing of the mRNA
10 primary transcript inside the nucleus. This processing involves a 3' non-translated region that includes polyadenylation of the 3' ends of the mRNA.

General methods for preparing plasmids or vectors that contain desired genetic components and can be used to transform plants and methods of making those vectors are known in the art. Vectors typically consist of a number of genetic components,
15 including, but not limited to, regulatory elements such as promoters, leaders, introns, and terminator sequences. Regulatory elements are also referred to as cis- or trans-regulatory elements, depending on the proximity of the element to the sequences or gene(s) they control. The promoter region contains a sequence of bases that signals RNA polymerase to associate with the DNA and to initiate the transcription into
20 mRNA using one of the DNA strands as a template to make a corresponding complementary strand of RNA.

The constructs may also contain the plasmid backbone DNA segments that provide replication function and antibiotic selection in bacterial cells, for example, an *Escherichia coli* origin of replication such as *ori322*, a broad host range origin of
25 replication such as *oriV* or *oriRi*, and a coding region for a selectable marker such as Spec/Strp that encodes for Tn7 aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA*) conferring resistance to spectinomycin or streptomycin, or a gentamicin (Gm, Gent) selectable marker gene. For plant transformation, the host bacterial strain is often *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58, LBA4404, EHA101, or EHA105 carrying a
30 plasmid having a transfer function for the expression unit. Other bacterial strains known to those skilled in the art of plant transformation can function in the present invention, including *A. rhizogenes*, *Sinorhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., and *Rhizobium* sp. strains.

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

A number of promoters that are active in plant cells have been described in the literature. Such promoters include, but are not limited to, the nopaline synthase (NOS) and octopine synthase (OCS) promoters, which are carried on tumor-inducing plasmids of *A. tumefaciens*; the caulimovirus promoters such as the cauliflower mosaic virus (CaMV) 19S and 35S promoters and the figwort mosaic virus (FMV) 35S promoter; the enhanced CaMV35S promoter (e35S); and the light-inducible promoter from the small subunit of ribulose biphosphate carboxylase (ssRUBISCO, a very abundant plant polypeptide). All of these promoters have been used to create various types of DNA constructs that have been expressed in plants. Promoter hybrids can also be constructed to enhance transcriptional activity or to combine desired transcriptional activity, inducibility, and tissue or developmental specificity.

Thus, promoters that function in plants may be inducible, viral, synthetic, constitutive as described, temporally regulated, spatially regulated, and/or spatio-temporally regulated. Other promoters that are tissue-enhanced, tissue-specific, or developmentally regulated are also known in the art and envisioned to have utility in the practice of this invention. Useful promoters may be obtained from a variety of sources such as plants and plant DNA viruses. It is preferred that the particular promoter selected should be capable of causing sufficient expression to result in the production of an effective amount of the gene product of interest.

The promoters used in the DNA constructs (*i.e.*, chimeric/recombinant plant genes) of the present invention may be modified, if desired, to affect their control characteristics. Promoters can be derived by means of ligation with operator regions, random or controlled mutagenesis, etc. Furthermore, the promoters may be altered to contain multiple "enhancer sequences" to assist in elevating gene expression.

The mRNA produced by a DNA construct of the present invention may also contain a 5' non-translated leader sequence. This sequence can be derived from the promoter selected to express the gene and can be specifically modified so as to increase translation of the mRNA. The 5' non-translated regions can also be obtained from viral RNAs, from suitable eukaryotic genes, or from a synthetic gene sequence. Such "enhancer" sequences may be desirable to increase or alter the translational efficiency of the resultant mRNA and are usually known as translational enhancers. Other genetic components that serve to enhance expression or affect transcription or translation of a gene are also envisioned as genetic components. The 3' non-translated

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

region of the chimeric constructs preferably contains a transcriptional terminator, or an element having equivalent function, and a polyadenylation signal, which functions in plants to polyadenylate the 3' end of the RNA. Examples of suitable 3' regions are (1) the 3' transcribed, non-translated regions containing the polyadenylation signal of *Agrobacterium* tumor-inducing (Ti) plasmid genes, such as the nopaline synthase (*nos*) gene, and (2) plant genes such as the soybean storage protein genes and the small subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (ssRUBISCO) gene. An example of a preferred 3' region is that from the ssRUBISCO E9 gene from pea.

Typically, DNA sequences located a few hundred base pairs downstream of the polyadenylation site serve to terminate transcription. These DNA sequences are referred to herein as transcription-termination regions. The regions are required for efficient polyadenylation of transcribed messenger RNA (mRNA) and are known as 3' non-translated regions. RNA polymerase transcribes a coding DNA sequence through a site where polyadenylation occurs.

In many transformation systems, it is preferable that the transformation vector contains a selectable, screenable, or scoreable marker gene. These genetic components are also referred to herein as functional genetic components, as they produce a product that serves a function in the identification of a transformed plant, or a product of desired utility.

The DNA that serves as a selection device may function in a regenerable plant tissue to produce a compound that confers upon the plant tissue resistance to an otherwise toxic compound. Genes of interest for use as a selectable, screenable, or scoreable marker would include, but are not limited to, β -glucuronidase (*gus*), green fluorescent protein (*gfp*), luciferase (*lux*), antibiotics like kanamycin (Dekeyser *et al.*, 1989), genes allowing tolerance to herbicides like glyphosate (Della-Cioppa *et al.*, 1987), such as CP4 EPSPS (U.S. Patent 5,627,061; U.S. Patent 5,633,435; U.S. Patent 6,040,497; U.S. Patent 5,094,945; WO04/074443; WO04/009761); glufosinate (US Patent 5,646,024, US Patent 5,561,236, US Patent 5,276,268; US Patent 5,637, 489; US Patent 5,273, 894); 2,4-D (WO05/107437) and dicamba, such as DMO (U.S. Patent 7,022,896). Other selection methods can also be implemented, including, but not limited to, tolerance to phosphinothricin, bialaphos, and positive selection mechanisms (Joersbo *et al.*, 1998) and would still fall within the scope of the present

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

invention. Examples of various selectable/screenable/scoreable markers and genes encoding them are disclosed in Miki and McHugh (2004).

The present invention can be used with any suitable plant transformation plasmid or vector containing a selectable or screenable marker and associated regulatory elements as described, along with one or more nucleic acids (a structural gene of interest) expressed in a manner sufficient to confer a particular desirable trait. Examples of suitable structural genes of interest envisioned by the present invention include, but are not limited to, genes for insect or pest tolerance, genes for herbicide tolerance, genes for quality improvements such as yield, nutritional enhancements, environmental or stress tolerances, or genes for any desirable changes in plant physiology, growth, development, morphology, or plant product(s).

Alternatively, the DNA coding sequences can affect these phenotypes by encoding a non-translatable RNA molecule that causes the targeted inhibition of expression of an endogenous gene, for example via double-stranded RNA mediated mechanisms, including antisense- and cosuppression-mediated mechanisms (see, for example, Bird *et al.*, 1991). The RNA could also be a catalytic RNA molecule (*i.e.*, a ribozyme) engineered to cleave a desired endogenous mRNA product (see for example, Gibson and Shillitoe, 1997). More particularly, for a description of antisense regulation of gene expression in plant cells see U.S. Pat. No. 5,107,065, and for a description of gene suppression in plants by transcription of a dsRNA see U.S. Pat. No. 6,506,559, U.S. Patent Application Publication No. 2002/0168707 A1, and U.S. patent application Ser. Nos. 09/423,143 (see WO 98/53083), 09/127,735 (see WO 99/53050) and 09/084,942 (see WO 99/61631), all of which are incorporated in their entirety herein by reference.

Use of sequences that result in silencing of other endogenous genes (*e.g.* RNAi technologies including miRNA) to result in a phenotype is also envisioned. For instance RNAi may be used to silence one or more genes resulting in a scoreable phenotype. One embodiment is to assemble a DNA cassette that will transcribe an inverted repeat of sequences, to produce a double-stranded RNA (dsRNA), typically at least about 19-21 bp in length and corresponding to a portion of one or more genes targeted for silencing. Thus, any gene that produces a protein or mRNA that expresses a phenotype or morphology change of interest is useful for the practice of the present invention.

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

Exemplary nucleic acids that may be introduced by the methods encompassed by the present invention include, for example, heterologous DNA sequences- that is, sequences or genes from another species, or even genes or sequences that originate with or are present in the same species but are incorporated into recipient cells by genetic engineering methods rather than classical reproduction or breeding techniques. The term heterologous, however, is also intended to refer to genes that are not normally present in the cell being transformed or to genes that are not present in the form, structure, etc., as found in the transforming DNA segment or to genes that are normally present but a different expression is desirable. Thus, the term “heterologous” gene or DNA is intended to refer to any gene or DNA segment that is introduced into a recipient cell, regardless of whether a similar gene may already be present in such a cell. The type of DNA included in the heterologous DNA can include DNA that is already present in the plant cell, DNA from another plant, DNA from a different organism, or a DNA generated externally, such as a DNA sequence containing an antisense message of a gene, or a DNA sequence encoding a synthetic or modified version of a gene or sequence.

In light of this disclosure, numerous other possible selectable or screenable marker genes, regulatory elements, and other sequences of interest will be apparent to those of skill in the art. Therefore, the foregoing discussion is intended to be exemplary rather than exhaustive.

After the construction of the plant transformation vector or construct, the nucleic acid molecule, prepared as a DNA composition *in vitro*, is generally introduced into a suitable host such as *Escherichia coli* and mated into another suitable host such as *Agrobacterium* or *Rhizobium*, or directly transformed into competent *Agrobacterium* or *Rhizobium*. These techniques are well-known to those of skill in the art and have been described for a number of plant systems including soybean, cotton, and wheat (see, for example, U.S. Pat. Nos. 5,569,834 and 5,159,135 and WO 97/48814). Those of skill in the art would recognize the utility of *Agrobacterium*-mediated transformation methods. Strains may include, but are not limited to, disarmed derivatives of *A. tumefaciens* strain C58, a nopaline strain that is used to mediate the transfer of DNA into a plant cell; octopine strains, such as LBA4404; or agropine strains, e.g., EHA101, EHA105, or *R. leguminosarum*.

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

USDA2370 with a Ti or Ri plasmid. The use of these strains for plant transformation has been reported, and the methods are familiar to those of skill in the art.

Plant tissue to be transformed is typically inoculated and co-cultured with *Agrobacterium* or *Rhizobium* containing a recombinant construct comprising at least one heterologous overdrive or TSS sequence, a sequence of interest to be transferred, and at least one RB sequence that serves to define the DNA to be transferred, and is selected under appropriate conditions. In certain embodiments, at least one LB sequence is also present on the recombinant construct. In certain other embodiments, a border sequence can be a "plant derived border-like sequence(s)." Methods of identifying and using such sequences are described in Rommens *et al.*, 2005; Rommens 2004a; Rommens *et al.*, 2004b

The present invention can be used with any transformable cell or tissue. Those of skill in the art recognize that transformable plant tissue generally refers to tissue that can have exogenous DNA inserted in its genome and under appropriate culture conditions can form into a differentiated plant. Such tissue can include, but is not limited to, cell suspensions, callus tissue, hypocotyl tissue, cotyledons, embryos, meristematic tissue, roots, and leaves. For example, transformable tissues can include calli or embryoids from anthers, microspores, inflorescences, and leaf tissues. Other tissues are also envisioned to have utility in the practice of the present invention, and the desirability of a particular explant for a particular plant species is either known in the art or may be determined by routine screening and testing experiments whereby various explants are used in the transformation process and those that are more successful in producing transgenic plants are identified.

Methods for transforming dicots by use of *Agrobacterium* or *Rhizobium* and obtaining transgenic plants have been published for a number of crops including cotton, soybean, *Brassica*, and peanut. Successful transformation of monocotyledonous plants by *Agrobacterium*- or *Rhizobium*-based methods has also been reported. Transformation and plant regeneration have been achieved and reported at least in asparagus, barley, maize, oat, rice, sugarcane, tall fescue, and wheat. Techniques that may be particularly useful in the context of cotton transformation are disclosed in U.S. Patent Nos. 5,846,797, 5,159,135, 5,004,863, and 6,624,344. Techniques for transforming *Brassica* plants in particular are disclosed, for example, in U.S. Patent 5,750,871. Techniques for transforming soybean are

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

disclosed in for example in Zhang *et al.*, (1999) and US Patent 6,384,301; and techniques for transforming corn are disclosed in for example in U.S. Patent 5,981,840, U.S. Patent 7,060,876, U.S. Patent 5,591,616, WO95/06722, and U.S. Patent Pub. 2004/244075.

5 In one embodiment, after incubation on medium containing antibiotics to inhibit *Agrobacterium* or *Rhizobium* growth without selective agents (delay medium), the explants are cultured on selective growth medium including, but not limited to, a callus-inducing medium containing a plant cell selective agent. Typical selective agents have been described and include, but are not limited to, antibiotics such as
10 G418, paromomycin, kanamycin, or other chemicals such as glyphosate, dicamba, and glufosinate. The plant tissue cultures surviving the selection medium are subsequently transferred to a regeneration medium suitable for the production of transformed plantlets. Regeneration can be carried out over several steps. Those of skill in the art are aware of the numerous types of media and transfer requirements
15 that can be implemented and optimized for each plant system for plant transformation and regeneration.

 The transformants produced are subsequently analyzed to determine the presence or absence of a particular nucleic acid of interest contained on the transformation vector. Molecular analyses can include, but are not limited to,
20 Southern blots or PCR (polymerase chain reaction) analyses. These and other well known methods can be performed to confirm the stability of the transformed plants produced by the methods disclosed, as well as the copy number of insertions, and the presence of vector backbone sequences flanking the T-DNA. These methods are well known to those of skill in the art and have been reported (see, for example, Sambrook
25 *et al.*, 1989).

 The previous discussion is merely a broad outline of standard transformation and regeneration protocols. One of skill in the art knows that specific crops and specific protocols can vary somewhat from the broad outline. A variety of media can be used in each system as well. Those of skill in the art are familiar with the variety
30 of tissue culture media that, when supplemented appropriately, support plant tissue growth and development. These tissue culture media can either be purchased as a commercial preparation or custom prepared and modified by those of skill in the art. Examples of such media include, but are not limited to those described by Murashige

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

and Skoog (1962); Chu *et al.* (1975); Linsmaier and Skoog (1965); Uchimiya and Murashige (1962); Gamborg *et al.* (1968); Duncan *et al.* (1985); McCown and Lloyd (1981); Nitsch and Nitsch (1969); and Schenk and Hildebrandt (1972), or derivations of these media supplemented accordingly. Those of skill in the art are aware that
5 media and media supplements such as nutrients and growth regulators for use in transformation and regeneration are usually optimized for the particular target crop or variety of interest. Reagents are commercially available and can be purchased from a number of suppliers (see, for example Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.).

“Overdrive” sequences have been identified in numerous Ti plasmids,
10 including pTiA6, pTiAB3, and pTi15955. Other sequences with high similarity to overdrive or TSS can be identified, for example, using the “BestFit,” “Gap,” or “FASTA” programs of the Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wis. 53711, or using the “BLAST” program (Altschul *et al.*, 1990), or another available DNA
15 sequence analysis package. Such sequences when present in multicopy near an RB sequence may be assayed for transformation enhancement activity, similarly to the sequences whose enhancer activity is described below.

“Frequency of transformation” or “transformation frequency,” as used herein, refers to the percentage of transgenic events produced per explant or the percentage of
20 transgenic plants produced per explant.

“Border sequence,” *e.g.* right border (RB) or left border (LB), refers to a directly repeated nucleic acid sequence defining an end of the transferred DNA (T-DNA) region, typically about 24 bp in length. Border sequences may be from a Ti or Ri plasmid of *Agrobacterium sp.*, or may be plant derived sequences that function
25 similarly.

“T-DNA Border region” refers to the RB or LB sequence and associated flanking sequence, typically about 100 bp in length, and, as found in nature, may include a transformation enhancer sequence.

“Transformation efficiency” as used herein, refers to any improvement, such
30 as increase in transformation frequency and quality events that impact overall efficiency of the transformation process by reducing the amount of resources required to select event for further commercial development.

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

“Transformation enhancer” as used herein refers to overdrive and TSS sequences.

A first nucleic acid sequence is “operably linked” with a second nucleic acid sequence when the sequences are so arranged that the first nucleic acid sequence affects the function of the second nucleic-acid sequence. Preferably the two sequences are part of a single contiguous nucleic acid molecule. The overdrive or TSS enhancer sequence may be placed immediately adjacent to the border sequence, such as the RB sequence. Alternatively, in certain embodiments the overdrive or TSS sequence is located about 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 or more nucleotides from the end of the border sequence, including all intermediate ranges. The overdrive sequence may be placed in either orientation relative to the border.

EXAMPLES

Those of skill in the art will appreciate the many advantages of the methods and compositions provided by the present invention. The following examples are included to demonstrate the preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples that follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments that are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention. All references cited herein are incorporated herein by reference to the extent that they supplement, explain, provide a background for, or teach methodology, techniques, or compositions employed herein.

EXAMPLE 1

Synthesis of transformation enhancer sequences

1) Synthesis of 4x overdrive sequence

To synthesize a 4x 30 bp overdrive (OD) sequence (5' caaacaacatacacagcgacttattcacaaaacaacatacacagcgacttattcacaaaacaacatacacagcgacttattcacaaaacaacatacacagcgacttattcac 3'; SEQ ID NO:18), 2x 30 bp overdrive primer pair 5' caaacaacatacacagcgacttattcacaaaacaacatacacagcgacttattcac 3'

PCT/US2007/073788

tgtgaataagtcgctgtgtatgtttgtttgtgtgaataagtcgctgtgtatgtttgtttg 3' (Xd464; SEQ ID NO:2)

2) Synthesis of 18x TSS sequence

5' ctgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaactgacgaa 3'(Xd465; SEQ ID NO:3),

EXAMPLE 2

To place the overdrive or TSS in front of a 24 bp RB, an *Eco*RI site was
 25 introduced into a nopaline RB, 11 bp away from the upstream of the RB (of
 pMON83900). The 4x overdrive or 18x TSS was excised from the corresponding
 TOPO cloning vector digested by *Eco*RI and inserted into pMON83900 opened by
*Eco*RI, resulting in pMON83903 and pMON83909, respectively.

17

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

pMON83864, respectively, for soy transformation. Alternatively, the RB of pMON80105 was modified so as to comprise the 4x overdrive or 18x TSS by inserting the *SpeI/SaI* fragment from pMON83903 or pMON83909 to yield pMON87465 and pMON87466, respectively, for corn transformation. The modified
5 RB with 1x, 4x and 18x transformation enhancer sequences are shown in FIGs. 1 and 4 and SEQ ID NOs:14-16.

A construct containing 1x overdrive sequence (SEQ ID NO:17) was synthesized by first assembling the oligonucleotide containing the 30 bp overdrive sequence according to standard protocol and then cloning it into pBlueScript®II
10 (Stratagene Inc., La Jolla, CA), resulting in pMON80088. Then the *SpeI* and *NotI* (filled-in with polymerase) fragment from pMON80088 was inserted into pMON80105 digested with *SpeI* and *SmaI*, resulting into pMON80121 for corn transformation. For soybean transformation, 1x overdrive RB construct, pMON83902, was made by replacing the RB in pMON83898 with the 1x overdrive
15 RB fragment from pMON80121 using *PmeI/NdeI* restriction enzyme sites.

EXAMPLE 3

Transformation of Corn with Overdrive or TSS-enhanced RB sequences

Corn (*Zea mays*) cells were transformed with *oriV* containing vectors pMON80105, pMON80121, pMON87465, or pMON87466 essentially as described in
20 U.S. Patent Application Publn. 2004/244075 in order to assess the ability of stacking of additional overdrive and TSS enhancer sequences to improve transformation frequency and the proportion of events comprising low copy number T-DNA insertion and lacking vector backbone sequence (*e.g.* *E. coli*-derived *oriV*). The control treatment consisted of transformation with pMON80105, lacking an overdrive
25 or TSS sequence. As shown in Table 1, use of constructs comprising stacked enhancer sequences resulted in a statistically significant increase in transformation frequency. With these constructs, a higher percentage of quality TF was also obtained. Quality TF combines TF and events with one or two copies. Also, the percentage of events having one or two copies increased.

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

Table 1: Effect of transformation enhancer sequences on transformation frequency and event quality in corn.

Overdrive in RB	Construct (pMON)	% Transformation Frequency (TF) ^a	% Quality TF	% of one or two copies events regardless of backbone
4X OD	87465	25.3	12.7%	50.1
1X OD	80121	24.1	10.4%	43.2
18X TSS	87466	22.8	10.2%	44.7
Control	80105	17.7	6.4%	39.0

^a denotes statistical significance

5

EXAMPLE 4**Transformation of Soybean with Overdrive or TSS-enhanced RB sequences**

Soybean (*Glycine max*) cells were transformed with *oriV* containing vectors pMON83898, pMON83902, pMON87462, or pMON87464 essentially as described in U.S. Patent 6,384,301 in order to assess the ability of stacking of additional overdrive and TSS enhancer sequences to improve transformation frequency and the proportion of events comprising low copy number T-DNA insertion and lacking vector backbone sequence (e.g. *E. coli*-derived *oriV*). The sequences of the stacked 4x overdrive and 18x TSS enhancers are found in SEQ ID NO:10 and SEQ ID NO:11, respectively. The control treatment consisted of transformation with pMON83898, lacking an overdrive or TSS sequence. As shown in Tables 2-3, use of constructs comprising stacked transformation enhancer sequences resulted in an increase in transformation frequency. The proportion of single copy and backbone free events also increased (Table 3; column 5). Also, the percentage of events having one or two copies increased.

Table 2: Effect of transformation enhancer sequences on transformation frequency in soybean.

Enhancer sequence	pMON plasmid	Transformation frequency (%)
Control	83898	2.79
1X overdrive	83902	3.06
4X overdrive	87462	4.22*
18X TSS	87464	4.10*

* statistically significant increase

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

Table 3: Effect of transformation enhancer sequences on event quality.

pMON plasmid	Total events	<i>oriV</i> positive / total GOI positive	<i>oriV</i> negative / total GOI positive	1 copy / <i>oriV</i> negative	1 or 2 copy regardless of <i>oriV</i> presence or absence
83898 (control)	31	6/24 (25%)	18/24 (75%)	1 (4%)	19 (79%)
83902 (1X OD)	61	16/45 (35.5%)	29/45 (64.5%)	6 (13.3%)	30 (66.7%)
87462 (4X OD)	43	12/33 (36.4%)	21/33 (63.6%)	4 (12.1%)	23 (69.7%)
87464 (18X TSS)	71	10/50 (20%)	40/50 (80%)	17 (34%)	37 (74%)

EXAMPLE 5**Additional Transformation Enhancer sequences**

5 In addition to the overdrive sequence of pTiA6 used above (SEQ ID NO:17), other overdrive sequences (including the reverse complementary sequences) are known in the art (e.g. Shurvinton and Ream, 1991), and may be used similarly. These sequences may include but are not limited to those from pTiAB3 (GenBank M63056) (TGTGAATAAATCGCTGTGTATGTTTGTGTTG; SEQ ID NO:8), and pTi15955
10 (GenBank AF242881) (TTGTCTAAATTTCTGTATTTGTTTGTGTTG; SEQ ID NO:9), and the consensus sequence AAACAAACATACACAGCGACTTATTCACA (SEQ ID NO:13), and TAARTYNTGTGRTNTGTTTGTGTTG; (SEQ ID NO:19, Toro *et al.*, 1988) among others. Primers may be synthesized accordingly and PCR carried out as described in Example 1 to create DNA segments comprising these sequences
15 for use in construction of recombinant plasmids analogous to pMON83902, pMON80121, pMON87462, and pMON87465, among others. Crop plants can be transformed with constructs comprising one or more of these transformation enhancer sequences and can be assessed for their ability to improve transformation frequency and the proportion of events comprising low copy number T-DNA insertion and
20 lacking vector backbone sequence.

* * *

All of the compositions and methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the compositions and methods of this invention have been described in terms of
25 the foregoing illustrative embodiments, it will be apparent to those of skill in the art

WO 2008/011465**PCT/US2007/073788**

that variations, changes, modifications, and alterations may be applied to the composition, methods, and in the steps or in the sequence of steps of the methods described herein, without departing from the true concept, spirit, and scope of the invention. More specifically, it will be apparent that certain agents that are both
5 chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope, and concept of the invention as defined by the appended claims.

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

REFERENCES

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

U.S. Patent 5,004,863, U.S. Patent 5,094,945; U.S. Patent 5,107,065; U.S. Patent 5,159,135; US Patent 5,273,894; US Patent 5,276,268; US Patent 5,561,236; U.S. Patent 5,569,834; U.S. Patent 5,591,616; U.S. Patent 5,627,061; U.S. Patent 5,633,435; US Patent 5,637,489; US Patent 5,646,024; U.S. Patent 5,750,871; U.S. Patent 5,846,797, U.S. Patent 5,981,840; U.S. Patent 6,040,497; U.S. Patent 6,506,559; U.S. Patent 6,624,344; US Patent 6,384,301; U.S. Patent 7,022,896; U.S. Patent 7,060,876.

U.S. Patent Ser. 09/084,942; U.S. Patent Ser. 09/127,735; U.S. Patent Ser. 09/423,143

U.S. Patent Pub. 2002/0168707 A1; U.S. Patent Pub. 2003/0188345; U.S. Patent Pub.

2004/0140376; U.S. Patent Pub. 2004/244075; U.S. Patent Pub. 2006/0041956

Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990.

Barker *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 2:335-350, 1983.

Bird *et al.*, *Biotech Gen. Engin. Rev.*, 9: 207-227, 1991.

Canaday *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 235:292-303, 1992.

Chu *et al.*, *Scientia Sinica* 18:659, 1975.

Close *et al.*, *J. Bacteriol.*, 169(11):5113-5118, 1987.

Culianez-Macia and Hepburn, *Pl. Mol. Biol.*, 11:389-399, 1988.

Dekeyser *et al.*, *Pl. Physiol.*, 90:217-223, 1989.

Della-Cioppa *et al.*, *Bio/Technology*, 5 579-584, 1987.

Depicker *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-573, 1982.

Duncan *et al.*, *Planta*, 165:322-332, 1985.

Gamborg *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 50:151, 1968.

Gelvin, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 67:16-37, 2003.

Gibson and Shillitoe, *Mol. Biotech.*, 7:125-137, 1997.

Hansen *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 20(1):113-122, 1992.

Jen and Chilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(11):3895-3899, 1986.

Joersbo *et al.*, *Mol. Breed.*, 4:111-117, 1998.

Kononov *et al.*, *Plant J.* 11:945-957, 1997.

Linsmaier and Skoog, *Physiol. Plant.*, 18 100, 1965.

WO 2008/011465

PCT/US2007/073788

- McCown and Lloyd, *HortScience*, 16:453, 1981.
- Miki and McHugh, *J. Biotechnol.*, 107:193, 2004.
- Murashige and Skoog, *Physiol. Plant*, 15: 473-497, 1962.
- Nitsch and Nitsch, *Science*, 163:85-87, 1969.
- PCT Appln. WO 01/44482; PCT Appln. WO 02/00900 ; PCT Appln. WO 04/074443; PCT Appln. WO 04/009761; PCT Appln. WO 05/121346; PCT Appln. WO 05/107437; PCT Appln. WO 95/06722; PCT Appln. WO 97/48814; PCT Appln. WO 98/53083; PCT Appln. WO 99/53050; PCT Appln. WO 99/61631
- Peralta *et al.*, *EMBO J.* 5(6):1137-1142, 1986.).
- Rommens *et al.*, *Plant Physiol.*, 139:1338-49, 2005.
- Rommens, *Trends Plant Sci.*, 9:457-64, 2004a.
- Rommens *et al.*, *Plant Physiol.*, 135:421-31, 2004b.
- Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- Schenk and Hildebrandt, *Can. J. Bot.*, 50: 199-204, 1972.
- Shaw *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12(15):6031-6041, 1984.
- Shurvinton and Ream, *J Bacteriol.*, 173(17):5558-5563, 1991.
- Slighton *et al.*, *EMBO J.*, 4(12):3069-3077, 1985.
- Toro *et al.*, *J. Bacteriol.*, 171(12):6845-6859, 1989.
- Toro *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8558-8562, 1988.
- Uchimiya and Murashige, *Plant Physiol.* 15:73, 1962.
- Van Haaren *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 15(21):8983-8997, 1987a.
- Van Haaren *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 11:773-781, 1988.
- Van Haaren *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 8:95-104, 1987b.
- Wang *et al.*, *Cell*, 38:455-462 1984.
- Zhang *et al.*, *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 56:37-46, 1999.

What is claimed is:

1. A method of increasing the efficiency of Rhizobia-mediated plant transformation, comprising: transforming a plant cell with a *Rhizobia bacterium*, said *Rhizobia bacterium* comprising a plant transformation vector which comprises at least one T-DNA border sequence from *Agrobacterium tumefaciens* and a transformation enhancer sequence operably linked to said T-DNA border sequence; said transformation enhancer sequence comprising two or more copies of SEQ ID NO:6 or the full length complement of SEQ ID NO:6.

2. The method of claim 1, wherein the transformation enhancer sequence is located proximal to a T-DNA right border (RB) sequence.

3. The method of claim 2, wherein the transformation enhancer sequence is from an Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*.

4. The method of claim 1, wherein the Rhizobia-mediated transformation is *Agrobacterium*-mediated transformation.

5. The method of claim 1, wherein the Rhizobia-mediated transformation is *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, or *Bradyrhizobium*-mediated transformation.

6. The method of claim 1, wherein the plant cell is from a plant selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco, sunflower, barley, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, Chinese cabbage, cucumber, eggplant, leek, lettuce, melon, oat, onion, pea, pepper, peanut, potato, pumpkin, radish, sorghum, spinach, squash, sugarbeet, tomato and watermelon.

7. The method of claim 1, wherein said transformation enhancer sequence comprises SEQ ID NO:11, or a full-length complement of SEQ ID NO:11.

8. The method of claim 1, wherein the plant cell is a corn or soybean cell.

9. The method of claim 1, wherein the T-DNA border region comprises from 1 to about 18 copies of said transformation enhancer sequence.

10. The method of claim 1, further comprising the step of regenerating a transgenic plant from said plant cell.

11. A recombinant DNA construct comprising a T-DNA border sequence, operably linked to a transformation enhancer sequence comprising one or more copies of SEQ ID NO:11, a sequence complementary to the full-length of SEQ ID NO:11 or combinations thereof.

12. The construct of claim 11, wherein the enhancer sequence comprises at least about four copies of said sequence.

13. The construct of claim 11, wherein the border sequence is a right border (RB) sequence.

14. The construct of claim 11, wherein the border sequence is a left border (LB) sequence.

15. A transgenic cell transformed with the construct of claim 11.

16. The cell of claim 15, defined as a plant or bacterial cell.

17. The cell of claim 16, wherein the cell is an *Agrobacterium* cell.

18. The cell of claim 16, wherein the cell is a *Rhizobium* cell.

19. The cell of claim 16, wherein the plant cell is from a plant selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco, sunflower, barley, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, Chinese cabbage, cucumber, eggplant, leek, lettuce, melon, oat, onion, pea, pepper, peanut, potato, pumpkin, radish, sorghum, spinach, squash, sugarbeet, tomato, and watermelon.

20. A transgenic plant transformed with the construct of claim 11.

21. The transgenic plant of claim 20, defined as selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco, sunflower, barley, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, Chinese cabbage, cucumber, eggplant, leek, lettuce, melon, oat, onion, pea, pepper, peanut, potato, pumpkin, radish, sorghum, spinach, squash, sugarbeet, tomato, and watermelon.

22. A method of increasing the efficiency of Rhizobia-mediated plant transformation, comprising:

a) introducing at least one additional transformation enhancer sequence into a plant transformation vector comprising at least one T-DNA border region including a transformation enhancer sequence; and

b) transforming a plant cell with a *Rhizobia bacterium* comprising said plant transformation vector, wherein the additional transformation enhancer sequence comprises at least one copy of SEQ ID NO:6 or the full length complement of SEQ ID NO:6.

23. The method of claim 22, wherein the additional transformation enhancer sequence is located proximal to a T-DNA right border (RB) sequence.

24. The method of claim 22, wherein the additional transformation enhancer sequence is from an Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*.

25. The method of claim 22, wherein the Rhizobia-mediated transformation is *Agrobacterium*-mediated transformation.

26. The method of claim 22, wherein the Rhizobia-mediated transformation is *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, or *Bradyrhizobium*-mediated transformation.

27. The method of claim 22, wherein the plant cell is from a plant selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco, sunflower, barley, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, Chinese cabbage, cucumber, eggplant,

25

leek, lettuce, melon, oat, onion, pea, pepper, peanut, potato, pumpkin, radish, sorghum, spinach, squash, sugarbeet, tomato and watermelon.

28. The method of claim **22**, wherein said additional transformation enhancer sequence comprises SEQ ID NO:11, or a full-length complement of SEQ ID NO:11.

29. The method of claim **22**, wherein the plant cell is a corn or soybean cell.

26

30. The method of claim **22**, wherein the T-DNA border region comprises from 1 to about 18 copies of said additional transformation enhancer sequence.

31. The method of claim **22**, further comprising the step of regenerating a transgenic plant from said plant cell.

* * * * *

32. A method of producing a recombinant construct comprising:
introducing at least one additional transformation enhancer sequence into a plant transformation vector, said vector comprising at least one T-DNA border region, and said border region including a first transformation enhancer sequence, thereby producing a recombinant construct comprising at least two transformation enhancer sequences, wherein the transformation enhancer sequences comprise one or more copies of SEQ ID NO:6 and one or more copies of a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:13, and wherein the transformation enhancer sequences are operably linked to the T-DNA border region.
33. A recombinant DNA construct comprising a T-DNA border sequence operably linked to a transformation enhancer sequence that comprises a combination of one or more copies of SEQ ID NO:6, and one or more copies of a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:13.
34. The construct of claim 33, wherein the border sequence is a right border (RB) sequence.
35. The construct of claim 33, wherein the border sequence is a left border (LB) sequence.
36. The construct of claim 34, wherein the RB sequence is from a nopaline Ti plasmid.
37. The construct of claim 34, wherein the RB sequence is from an octopine Ti plasmid.
38. A transgenic cell transformed with the construct of claim 33.
39. The cell of claim 38, defined as a plant or bacterial cell.
40. The cell of claim 39, wherein the cell is an *Agrobacterium* cell.
41. The cell of claim 39, wherein the cell is a *Rhizobium* cell.
42. The cell of claim 39, wherein the plant cell is from a plant selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco, sunflower, barley, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, Chinese cabbage, cucumber, eggplant, leek, lettuce, melon, oat, onion, pea, pepper, peanut, potato, pumpkin, radish, sorghum, spinach, squash, sugarbeet, tomato, and watermelon.
43. A transgenic plant transformed with the construct of claim 33.

44. The transgenic plant of claim 43, defined as selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco, sunflower, barley, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, Chinese cabbage, cucumber, eggplant, leek, lettuce, melon, oat, onion, pea, pepper, peanut, potato, pumpkin, radish, sorghum, spinach, squash, sugarbeet, tomato, and watermelon.
45. The method of claim 32, wherein the border region is a right border (RB) sequence.
46. The method of claim 32, wherein the border region is a left border (LB) sequence.
47. The method of claim 32, further comprising transforming a plant cell with said recombinant construct by Rhizobia-mediated transformation, wherein the Rhizobia bacterium is competent for the transformation of said plant cell.
48. The method of claim 47, wherein the Rhizobia-mediated transformation is *Agrobacterium*-mediated transformation.
49. The method of claim 47, wherein the Rhizobia-mediated transformation is *Agrobacterium*-, *Rhizobium*-, *Sinorhizobium*-, *Mesorhizobium*-, or *Bradyrhizobium*-mediated transformation.
50. The method of claim 47, wherein the plant cell is from a plant selected from the group consisting of soybean, corn, cotton, canola, rice, wheat, alfalfa, common bean, peanut, tobacco, sunflower, barley, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, Chinese cabbage, cucumber, eggplant, leek, lettuce, melon, oat, onion, pea, pepper, peanut, potato, pumpkin, radish, sorghum, spinach, squash, sugarbeet, tomato and watermelon.
51. The method of claim 50 wherein the plant cell is a corn or soybean cell.
52. The method of claim 32, wherein the T-DNA border region comprises from 2 to about 18 copies of said transformation enhancer sequence.
53. The method of claim 47, further comprising regenerating a transgenic plant from said plant cell.

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions for improving the efficiency of *Agrobacterium*- and *Rhizobium*-mediated plant cell transformation by use of additional transformation enhancer sequences, such as overdrive or TSS sequences, operably linked to a T-DNA border sequence on a recombinant construct that comprises T-DNA.



[illegible]

FIG. 4

【配列表】

2018171069000002.app