

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6652383号
(P6652383)

(45) 発行日 令和2年2月19日 (2020.2.19)

(24) 登録日 令和2年1月27日 (2020.1.27)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z N A Z
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00 A
A O 1 H 5/00 (2018.01)	A O 1 H 5/00 A
C O 7 K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00

請求項の数 22 (全 114 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-507149 (P2015-507149)	(73) 特許権者	501035309
(86) (22) 出願日	平成25年4月17日 (2013.4.17)		ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー
(65) 公表番号	特表2015-514426 (P2015-514426A)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462
(43) 公表日	平成27年5月21日 (2015.5.21)		68, インディアナポリス, ジオンス
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/036980		ヴィレ ロード, 9330
(87) 国際公開番号	W02013/158766	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成25年10月24日 (2013.10.24)		弁理士 小林 浩
審査請求日	平成28年4月15日 (2016.4.15)	(74) 代理人	100095360
審判番号	不服2018-6306 (P2018-6306/J1)		弁理士 片山 英二
審判請求日	平成30年5月8日 (2018.5.8)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	61/625, 222		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成24年4月17日 (2012.4.17)	(74) 代理人	100126354
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 藤田 尚

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、

プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドによって特徴付けられ、前記ポリヌクレオチドが

葉緑体輸送ペプチド (CTP) をコードするヌクレオチド配列であって、前記 CTP が、配列番号 3 または配列番号 4 と少なくとも 95% 同一であり、かつ、前記 CTP が葉緑体輸送能を有するヌクレオチド配列と、

対象とするポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とを含み、

前記ポリヌクレオチドが前記 CTP および前記対象とするポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードする、単離された核酸分子。 10

【請求項 2】

前記 CTP が、配列番号 3 または配列番号 4 である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記プロモーターが植物細胞において機能的である、請求項 1 または 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記対象とするポリペプチドが 3-エノールビルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ (EPSPS) である、請求項 3 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記分子が植物発現ベクターまたは植物形質転換ベクターである、請求項 3 または 4 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

キメラタンパク質であって、請求項 1 または 2 に記載の核酸分子によってコードされ、対象とするポリペプチドが、プラスチド含有細胞中のプラスチドにターゲッティングされる、キメラタンパク質。

【請求項 7】

前記対象とするポリペプチドが、植物細胞中の葉緑体にターゲッティングされると C T P が除去される、請求項 6 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 8】

前記対象とするポリペプチドが、アセトラクターゼシンターゼ (A L S)、突然変異 A L S、A L S の前駆体、ゼアキサンチンエポキシダーゼ、コリンモノオキシゲナーゼ、フェロケラターゼ、オメガ 3 脂肪酸不飽和化酵素、グルタミンシンセターゼ、プロビタミン A、植物ホルモン、B t 毒素タンパク質および蛍光ポリペプチドからなる群から選択される、請求項 7 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 9】

前記対象とするポリペプチドが 3-エノールビルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ (E P S P S) である、請求項 7 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 10】

請求項 3 に記載の核酸分子を含むトランスジェニック植物材料であって、前記植物材料が、植物細胞、植物組織、植物組織培養物、カルス培養物および植物の一部からなる群から選択される、植物材料。

【請求項 11】

前記植物材料が、アラビドプシス属、アルファルファ、アブラナ属、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、ワタ、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウマメ、コショウ、ピーナッツ、ジャガイモ、カボチャ (pumpkin)、ダイコン、ナタネ、ホウレンソウ、ダイズ、カボチャ (squash)、サトウダイコン、ヒマワリ、タバコ、トマト、スイカ、タマネギ、コメ、ソルガム、コムギ、ライムギ、アワ、サトウキビ、カラスムギ、ライコムギ、スイッチグラスおよびシバクサからなる群から選択される植物に由来する、請求項 10 に記載のトランスジェニック植物材料。

【請求項 12】

前記植物材料がトウモロコシに由来する、請求項 10 に記載のトランスジェニック植物材料。

【請求項 13】

前記対象とするポリペプチドが 3-エノールビルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ (E P S P S) である、請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載のトランスジェニック植物材料。

【請求項 14】

請求項 3 に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック植物または種子。

【請求項 15】

前記植物または種子が、アラビドプシス属、アルファルファ、アブラナ属、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、ワタ、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウマメ、コショウ、ピーナッツ、ジャガイモ、カボチャ (pumpkin)、ダイコン、ナタネ、ホウレンソウ、ダイズ、カボチャ (squash)、サトウダイコン、ヒマワリ、タバコ、トマト、スイカ、タマネギ、コメ、ソルガム、コムギ、ライムギ、アワ、サトウキビ、カラスムギ、ライコムギ、スイッチグラスおよびシバクサからなる群から選択される植物に由来する、請求項 14 に記載のトランスジェニック植物または種子。

【請求項 16】

前記植物または種子がトウモロコシである、請求項 14 に記載のトランスジェニック植

10

20

30

40

50

物または種子。

【請求項 17】

前記対象とするポリペプチドが 3-エノールピルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ (EPSPS) である、請求項 14～16 のいずれかに記載のトランスジェニック植物または種子。

【請求項 18】

トランスジェニック植物材料を製造する方法であって、
植物材料を、請求項 5 に記載の核酸分子を用いて形質転換することによって特徴付けられる、方法。

【請求項 19】

請求項 14～17 のいずれかに記載のトランスジェニック植物または種子の、野外に播種する、第 2 の植物と交雑させる、および／またはトランスジェニック植物を再生するための、使用。

【請求項 20】

請求項 3 または請求項 4 に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック植物商品生産物。

【請求項 21】

前記植物または種子が植物である、請求項 14～17 のいずれかに記載のトランスジェニック植物または種子。

【請求項 22】

トランスジェニック植物の後代を製造する方法であって、請求項 21 に記載の第 1 のトランスジェニック植物を第 2 の植物と交雑することによって特徴付けられる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本願は、2012 年 4 月 17 日に出願された米国特許仮出願番号第 61/625,222 号の利益を主張する。

【0002】

37 C. F. R. § 1.821 (c) または (e) に従う声明-ASCII テキストファイルとして提出された配列表

37 C. F. R. § 1.821 (c) または (e) に準拠して、配列表の ASCII テキスト版を含有するファイルが、本願とともに提出されている。

【0003】

本開示は、プラスチド含有細胞のプラスチドヘターゲティングされるポリペプチドを遺伝的にコードし、発現するための組成物および方法に関する。特定の実施形態では、本開示は、ポリペプチドを葉緑体 (例えば、高等植物の) にターゲティングするアミノ酸配列および／またはそれをコードする核酸分子に関する。特定の実施形態では、本開示は、キメラポリペプチドのプラスチドへの輸送を制御するアミノ酸配列を含むキメラポリペプチドおよび／またはそれをコードする核酸分子に関する。

【背景技術】

【0004】

植物細胞は、特徴的な膜系によって区切られており、細胞内で特殊な機能を果たす、一般に「プラスチド」と呼ばれる、個別の細胞内オルガネラを含有する。個々のプラスチドは、光合成、ならびに特定の化学化合物の合成および保存に関与している。すべてのプラスチドは、植物の成長点領域中に存在するプロプラスチドに由来する。プロプラスチドは、例えば、葉緑体、エチオプラスト、有色体、ゲロントプラスト (gerontoplasts)、白色体、アミロプラスト、エライオプラストおよびプロティノプラストに発達し得る。プラスチドは、細胞内に半自律的に存在し、自身の遺伝子系およびタンパク質合成機構を含有するが、その発達および生合成活性において核細胞質系との密接な協力関係に依存してい

10

20

30

40

50

る。

【0005】

高等植物の光合成葉細胞では、最も顕著なプラスチドは葉緑体である。葉緑体の最も必須の機能は、光合成の光によって駆動される反応の実施である。しかし、葉緑体はまた、植物細胞にとって重要な多数のその他の生合成プロセスも実施する。例えば、細胞の脂肪酸のすべては、葉緑体ストロマに局在する酵素によって、そこで容易に入手可能なATP、NADPHおよび炭水化物を使用して製造される。さらに、光活性化された電子の還元力は、葉緑体における亜硝酸化合物 (NO_2^-) のアンモニア (NH_3) への還元を駆動し、このアンモニアが、植物に、アミノ酸およびヌクレオチドの合成に必要な窒素を提供する。

10

【0006】

葉緑体はまた、農業化学産業において特に重要なプロセスに参加する。例えば、多くの除草剤が、葉緑体内で実施される機能を遮断することによって作用するということがわかっている。最近の研究によって、いくつかの除草剤の特異的標的が同定された。例えば、トリアジン由来除草剤は、プラストキノ分子を、光化学系IIの32kDポリペプチド中のその結合部位から移動させることによって光合成を阻害する。この32kDのポリペプチドは、葉緑体ゲノム中にコードされ、オルガネラ機構によって合成される。トリアジン除草剤に対して耐性である突然変異体植物が得られている。これらの植物は、トリアジン除草剤によってプラストキノが、もはや移動され得ない突然変異体32kDポリペプチドを含有する。スルホニル尿素は、葉緑体においてアセト乳酸シンターゼを阻害する。アセト乳酸シンターゼは、イソロイシンおよびバリン合成に関与している。グリホサートは、芳香族アミノ酸の合成に関与する酵素である、5-エノールピルビル-3-ホスホキミ酸シンターゼ (EPSPS) の機能を阻害する。すべてのこれらの酵素は、核ゲノムによってコードされるが、葉緑体中に転位置され、そこで実際のアミノ酸合成が起こる。

20

【0007】

ほとんどの葉緑体タンパク質は、植物細胞の核中にコードされ、サイトゾルにおいて大きな前駆体タンパク質として合成され、翻訳後、葉緑体中に輸送される。ストロマへの外包膜および内包膜を越える輸送は、ストロマ、チラコイド膜およびチラコイドルーメンに向かう予定であるタンパク質が入るための主要な手段である。チラコイド膜およびチラコイドルーメンへの輸送される前駆体タンパク質の局在性は、細菌タンパク質輸送系と相同である2種を含めた4種の別個の機序によって達成される。したがって、葉緑体におけるタンパク質局在性のための機序は、幾分かは、原核生物の内部共生体由来する。Cline and Henry (1996), *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12:1-26.

30

【0008】

葉緑体発現に向かう予定である前駆体タンパク質は、葉緑体輸送ペプチド (CTP) として知られるN末端伸長部分を含有する。輸送ペプチドは、葉緑体表面の特異的認識および葉緑体包膜を越える、ゆえに、葉緑体内の種々のサブコンパートメント (例えば、ストロマ、チラコイドおよびチラコイド膜) へのプレタンパク質の翻訳後転位置の媒介に役立つ。これらのN末端輸送ペプチド配列は、葉緑体タンパク質のプラスチド中への輸送に必要な情報のすべてを含有し、輸送ペプチド配列は、プラスチド輸送にとって必要であり、十分である。

40

【0009】

そのN末端に天然にコードされる輸送ペプチド配列を有すると報告される植物遺伝子として、リブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ (RuBisCo) の葉緑体小サブユニット (de Castro Silva-Filho et al. (1996), *Plant Mol. Biol.* 30:769-80; Schnell et al. (1991), *J. Biol. Chem.* 266:3335-42); EPSPS (例えば、Archer et al. (1990), *J. Bioenerg. and Biomemb.* 22:789-810および米国特許第6, 867, 293号、同7, 045, 684号およびRe. 36, 449を参照のこと); トリプトファンシンターゼ (Zhao et al. (1995), *J. Biol. Chem.* 270:6081-7); プラスチアニン (Lawrence et al. (1997), *J. Biol. Chem.* 272:20357-63); コリスミ酸シンターゼ (S

50

chmidt et al. (1993), J. Biol. Chem. 268:27447-57) ; 集光性葉緑素 a / b 結合タンパク質 (L H B P) (Lamppa et al. (1988), J. Biol. Chem. 263:14996-14999) ; およびシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の葉緑体タンパク質 (Lee et al. (2008), Plant Cell 20:1603-22) が挙げられる。米国特許出願公開 U S 2 0 1 0 / 0 0 7 1 0 9 0 は、クラミドモナス (*Chlamydomonas*) 種に由来する特定の葉緑体ターゲティングペプチドを提供する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

しかし、葉緑体ターゲティングペプチドによってコードされる情報の構造的必要要件は、その高レベルの配列多様性および共通またはコンセンサス配列モチーフの欠如のためにわかりにくいままであるが、独立した構造モチーフを有する葉緑体ターゲティングペプチドの別個のサブグループがある可能性がある。Lee et al. (2008)、前掲。さらに、これらの配列の一部のものが、高等植物における葉緑体にターゲティングされるタンパク質の異種発現において有用である。

【課題を解決するための手段】

【0011】

植物におけるポリペプチドのプラスチドターゲティングのための組成物および方法が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、組成物は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチド（例えば、T r a P 8 ペプチドおよび T r a P 9 ペプチド）をコードする少なくとも 1 種のヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。特定の実施形態では、このような核酸分子は、単子葉植物または双子葉植物における、対象とするヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの発現およびターゲティングにとって有用であり得る。対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも 1 種のヌクレオチド配列を含む核酸分子を含むベクターが、さらに記載される。

【0012】

いくつかの実施形態では、合成アブラナ属由来 C T P をコードするヌクレオチド配列は、アブラナ属種遺伝子（例えば、セイヨウアブラナ (*B. napus*)、B. ラパ (*rapa*)、カラシナ (*B. juncea*) およびアビシニアガラシ (*B. carinata*)）から得られた参照ヌクレオチド配列に由来するヌクレオチド配列またはその機能的変異体であり得る。いくつかの実施形態では、合成アブラナ属由来 C T P をコードするヌクレオチド配列は、アブラナ属種遺伝子に由来するヌクレオチド配列をコードする部分 C T P またはその機能的変異体を含むキメラヌクレオチド配列であり得る。特定の実施形態では、合成アブラナ属由来 C T P をコードするヌクレオチド配列は、参照アブラナ属種 C T P およびアブラナ属種の異なる遺伝子、異なるアブラナ属種または異なる生物（例えば、植物、原核生物および下等光合成真核生物）に由来する C T P または前記のものいずれかの機能的変異体の各々から得られた連続するヌクレオチド配列を含有し得る。特定の実施形態では、連続するヌクレオチド配列は、参照アブラナ属種遺伝子（例えば、異なるアブラナ属種ゲノム）の異なる生物のオーソログから得られる参照アブラナ属 C T P のオーソログヌクレオチド配列から得られ得る。これらおよびさらなる実施形態では、合成アブラナ属由来 C T P をコードするヌクレオチド配列は、2 種以上の C T P をコードするヌクレオチド配列を含むキメラヌクレオチド配列であり得る。

【0013】

いくつかの例では、合成アブラナ属由来 C T P をコードするヌクレオチド配列は、セイヨウアブラナ (*B. napus*) および B. ラパ (*rapa*) のいずれかの由来の部分 C T P ヌクレオチド配列またはその機能的変異体を含むキメラヌクレオチド配列であり得る。特定の例では、合成アブラナ属由来 C T P をコードするヌクレオチド配列は、セイヨウアブラナ (*B. napus*) および B. ラパ (*rapa*) のいずれかから得られた連続ヌクレオチド配列またはその機能的変異体を含むし得る。

【0014】

いくつかの実施形態では、組成物は、ポリペプチドを葉緑体にターゲティングするための少なくとも1種のアブラナ属由来の手段を含む核酸分子を含む。対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している、ポリペプチドを葉緑体にターゲティングするための少なくとも1種のアブラナ属由来の手段を含む核酸分子を含む核酸分子がさらに記載される。特定の実施形態では、このような核酸分子は、単子葉植物または双子葉植物における、対象とするヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの発現およびターゲティングにとって有用であり得る。本開示の目的上、ポリペプチドを葉緑体にターゲティングするためのアブラナ属由来の手段とは、特定の合成ヌクレオチド配列を指す。特定の実施形態では、ポリペプチドを葉緑体にターゲティングするためのアブラナ属由来の手段は、T r a P 8およびT r a P 9と本明細書において呼ばれるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなる群から選択される。

10

【0015】

また、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している合成アブラナ属由来C T Pをコードする少なくとも1種のヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む植物材料（例えば、限定するものではないが、植物、植物組織および植物細胞）も本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、植物材料は、そのゲノム中に安定に組み込まれたこのような核酸分子を有し得る。いくつかの実施形態では、植物材料は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している合成アブラナ属由来C T Pをコードする少なくとも1種のヌクレオチド配列を含む核酸分子の産物を一時的に発現し得る。いくつかの実施形態では、植物材料は、それから植物体が再生され得ない植物細胞である。

20

【0016】

プラスチド含有細胞（例えば、植物）において、プラスチド含有細胞のプラスチド（例えば、葉緑体）においてヌクレオチド配列を発現するための方法も記載される。特定の実施形態では、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している合成アブラナ属由来C T Pをコードする少なくとも1種のヌクレオチド配列を含む核酸分子は、対象とするヌクレオチド配列の発現生成物と融合している合成アブラナ属由来C T Pを含む前駆体融合ポリペプチドが、植物細胞の細胞質において産生され、次いで、融合ポリペプチドが、植物細胞の葉緑体中にi n v i v oで輸送されるよう、植物細胞を形質転換するために使用され得る。いくつかの実施形態では、植物細胞は、植物体に再生できない。

30

【0017】

対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している合成アブラナ属由来C T Pをコードする少なくとも1種のヌクレオチド配列を含む核酸分子を含むトランスジェニック植物の製造のための方法がさらに記載される。また、このようなトランスジェニック植物から製造される植物商品生産物（例えば、種子）も記載される。いくつかの実施形態では、これらのトランスジェニック植物または植物商品生産物は、それから植物体が再生され得ないトランスジェニック細胞を含有する。

【0018】

以下およびその他の特徴は、添付の図面を参照して進行するいくつかの実施形態の以下の詳細な説明から、より明らかとなる。

40

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】対象とするヌクレオチド配列に作動可能に連結している、合成アブラナ属由来C T Pをコードするヌクレオチド配列（例えば、T r a P 8、およびT r a P 9）の特定の例を代表するm R N A分子を示す図である。いくつかの実施形態において、m R N A分子（例えば、示されているもの）は、対象とするヌクレオチド配列に作動可能に連結している、合成アブラナ属由来C T Pをコードする配列を含むオープンリーディングフレームを含むD N A分子から転写され得る。対象とするヌクレオチド配列は、いくつかの実施形態において、対象とするペプチドをコードする配列であってもよく、例えば、限定されないが、プラスチドにターゲティングされるマーカー遺伝子産物またはペプチドであってもよ

50

い。

【図2】プラスミドマップ p D A B 1 0 1 9 7 7 を示す図である。

【図3】プラスミドマップ p D A B 1 0 1 9 0 8 を示す図である。

【図4】タバコ葉組織に浸潤させた T r a P 8 - Y F P がタバコ葉組織の葉緑体に移動したことを示す顕微鏡画像を示す図である。

【図5】タバコ葉組織に浸潤させた T r a P 9 - Y F P がタバコ葉組織の葉緑体に移動したことを示す顕微鏡画像を示す図である。

【図6】タバコ葉組織の葉緑体に取り込まれなかったタバコ葉組織に浸潤させた非標的化 Y F P 対照の顕微鏡画像を示す図である。

【図7】プラスミドマップ p D A B 1 0 6 5 9 7 を示す図である。

10

【図8】トウモロコシプロトプラストの葉緑体に移動したことを示す、トウモロコシプロトプラストに形質転換して入れた T r a P 8 - Y F P 構築物の顕微鏡画像を示す図である。

【図9】プラスミドマップ p D A B 1 0 5 5 2 6 を示す図である。

【図10】プラスミドマップ p D A B 1 0 5 5 2 7 を示す図である。

【図11】プラスミドマップ p D A B 1 0 9 8 0 7 を示す図である。

【図12】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 6 8 7 を示す図である。

【図13】プラスミドマップ p D A B 1 1 1 4 8 1 を示す図である。

【図14】プラスミドマップ p D A B 1 1 1 4 7 9 を示す図である。

【図15】プラスミドマップ p D A B 1 1 1 3 3 8 を示す図である。

20

【図16】プラスミドマップ p D A B 1 1 2 7 1 0 を示す図である。

【図17】図17は、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) (配列番号1) およびブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*) (配列番号2) 由来の E P S P S タンパク質について予測された葉緑体輸送ペプチドのアラインメントを含む。アスタリスクは、配列が切断され、再結合されて、T r a P 8 と T r a P 9 を形成した場所を示す。

【図18】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 5 2 7 を示す図である。

【図19】プラスミドマップ p D A B 1 0 5 5 3 0 を示す図である。

【図20】プラスミドマップ p D A B 1 0 5 5 3 1 を示す図である。

【図21】プラスミドマップ p D A B 1 0 5 5 3 2 を示す図である。

【図22】プラスミドマップ p D A B 1 0 5 5 3 3 を示す図である。

30

【図23】プラスミドマップ p D A B 1 0 5 5 3 4 を示す図である。

【図24】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 5 3 2 を示す図である。

【図25】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 5 3 4 を示す図である。

【図26】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 5 3 3 を示す図である。

【図27】プラスミドマップ p D A B 4 1 0 4 を示す図である。

【図28】プラスミドマップ p D A B 1 0 2 7 1 5 を示す図である。

【図29】プラスミドマップ p D A B 1 0 2 7 1 6 を示す図である。

【図30】プラスミドマップ p D A B 1 0 2 7 1 7 を示す図である。

【図31】プラスミドマップ p D A B 1 0 2 7 8 5 を示す図である。

【図32】プラスミドマップ p D A B 1 0 2 7 1 9 を示す図である。

40

【図33】プラスミドマップ p D A B 1 0 2 7 1 8 を示す図である。

【図34】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 6 6 3 を示す図である。

【図35】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 6 6 4 を示す図である。

【図36】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 6 6 5 を示す図である。

【図37】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 6 6 6 を示す図である。

【図38】プラスミドマップ p D A B 1 0 9 8 1 2 を示す図である。

【図39】プラスミドマップ p D A B 1 0 1 5 5 6 を示す図である。

【図40】プラスミドマップ p D A B 1 0 7 6 9 8 を示す図である。

【図41】プラスミドマップ p D A B 1 0 8 3 8 4 を示す図である。

【図42】プラスミドマップ p D A B 1 0 8 3 8 5 を示す図である。

50

【図43】プラスミドマップpDAB108386を示す図である。

【図44】プラスミドマップpDAB108387を示す図である。配列表 添付の配列表に列挙される核酸配列は、37 C. F. R. § 1. 822に定義されるように、ヌクレオチド塩基の標準文字略語を使用して示されている。各核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、相補鎖は示された鎖への任意の参照によって含まれると理解される。添付の配列表において、配列番号1は、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) EPSPS葉緑体輸送ペプチドのアミノ酸を示す。配列番号2は、ブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*) EPSPS葉緑体輸送ペプチドのアミノ酸を示す。配列番号3は、TraP8キメラ葉緑体輸送ペプチドのアミノ酸を示す。配列番号4は、TraP9キメラ葉緑体輸送ペプチドのアミノ酸を示す。配列番号5は、TraP8キメラ葉緑体輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号6は、TraP9キメラ葉緑体輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号7は、リンカー配列をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号8は、TraP8 v2キメラ葉緑体輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号9は、TraP9 v2キメラ葉緑体輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号10は、cry2aa遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号11は、vip3abl v6遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号12は、vip3abl v7遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号13は、アミノ酸配列、Ser-Val-Ser-Leuを有するペプチドを示す。配列番号14は、配列番号1のセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) EPSPS葉緑体輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号15は、配列番号2のブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*) EPSPS葉緑体輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号16は、dgt-28 v5をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号17は、dgt-28 v6をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号18は、コドン最適化されたdgt-1のポリヌクレオチド配列を示す。

配列番号19は、コドン最適化されたdgt-3 v2 (G173A)のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号20は、コドン最適化されたdgt-3 v3 (G173A; P178S)のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号21は、コドン最適化されたdgt-3 v4 (T174I; P178S)のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号22は、コドン最適化されたdgt-7 v4 (T168I; P172S)のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号23は、コドン最適化されたdgt-32 v3のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号24は、コドン最適化されたdgt-33 v3のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号25は、コドン最適化されたdgt-31 v3のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号26は、輸送ペプチドTraP4 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号27は、輸送ペプチドTraP5 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号28は、輸送ペプチドTraP8 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号29は、輸送ペプチドTraP9 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号30は、輸送ペプチドTraP12 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号31は、輸送ペプチドTraP13 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号32は、TraP4 v2: dgt-28 v5のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号33は、TraP5 v2: dgt-28 v5のポリヌクレオチド配列を示す。

配列番号34は、TraP8 v2: dgt-28 v5のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号35は、TraP9 v2: dgt-28 v5のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号36は、TraP12 v2: dgt-28 v5のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号37は、TraP13 v2: dgt-28 v5のポリヌクレオチド配列を示す。配列番号38は、輸送ペプチドTraP14 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号39は、輸送ペプチドTraP23 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号40は、輸送ペプチドTraP24 v2をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号41は、TraP14 v2

10

20

30

40

50

と融合された輸送ペプチド d g t - 3 2 v 3 をコードするポリヌクレオチド配列を示す。
配列番号 4 2 は、T r a P 2 4 v 2 と融合された輸送ペプチド d g t - 3 3 v 3
をコードするポリヌクレオチド配列を示す。配列番号 4 3 は、T r a P 2 3 v 2 と
融合された輸送ペプチド d g t - 3 1 v 3 をコードするポリヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 4 は、D S M 2 A プライマーのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号
4 5 は、D S M 2 S プライマーのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 4 6 は、D
S M 2 C y 5 プローブのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 4 7 は、D G T 2
8 F プライマーのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 4 8 は、D G T 2 8 R プラ
イマーのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 4 9 は、T A F F Y - H E X プロー
ブのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 5 0 は、T A F I I 1 5 - F プライマー
のオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 5 1 は、T A F I I 1 5 - R プライマーの
オリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 5 2 は、d g t - 2 8 遺伝子発現カセット確
認のために使用されるフォワードオリゴのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 5
3 は、d g t - 2 8 遺伝子発現カセット確認のために使用されるリバーソオリゴのオリゴ
ヌクレオチド配列を示す。配列番号 5 4 は、A T 2 6 4 1 0 L P プライマーのオリゴヌ
クレオチド配列を示す。配列番号 5 5 は、A T 2 6 4 1 0 R P プライマーのオリゴヌ
クレオチド配列を示す。配列番号 5 6 は、D G T 2 8 F プライマーのオリゴヌクレオチド
配列を示す。配列番号 5 7 は、D G T 2 8 R プライマーのオリゴヌクレオチド配列を示
す。配列番号 5 8 は、G A A D 1 F プライマーのオリゴヌクレオチド配列を示す。配
列番号 5 9 は、G A A D 1 P プローブのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 6 0
は、G A A D 1 R プライマーのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 6 1 は、I V
- プローブのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 6 2 は、I V F - T a q プライ
マーのオリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 6 3 は、I V R - T a q プライマーの
オリゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 6 4 は、z m D G T 2 8 F プライマーのオリ
ゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 6 5 は、z m D G T 2 8 F A M プローブのオリ
ゴヌクレオチド配列を示す。配列番号 6 6 は、z m D G T 2 8 R プライマーのオリ
ゴヌクレオチド配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

I. いくつかの実施形態の概要

葉緑体輸送ペプチド (C T P) (またはプラスチド輸送ペプチド) は、C T P を含むポ
リペプチドをプラスチド (例えば、葉緑体) に向かわせるよう、同時翻訳的または翻訳後
に機能する。本発明のいくつかの実施形態では、内因性葉緑体タンパク質または異種タン
パク質のいずれかが、C T P を含む大きな前駆体ポリペプチドとして、このようなタンパ
ク質の発現によって葉緑体に向けられ得る。特定の実施形態では、C T P は、例えば、限
定されるものではないが、異なる生物から得られたオーソログ遺伝子に由来する少なく
とも 1 種の連続する配列またはその機能的変異体を組み込むことによって、アブラナ属種
遺伝子から得られたヌクレオチド配列から駆動され得る。

【0021】

例示的な一実施形態では、各々、C T P をコードする核酸配列を、セイヨウアブラナ (40
Brassica napus) (N C B I データベース受託番号 P 1 7 6 8 8) およびブラシカ・ラパ
(Brassica rapa) (N C B I データベース受託番号 A A S 8 0 1 6 3) から得られた E
P S P S 遺伝子配列から単離した。C T P をコードする核酸配列は、E P S P S 遺伝子配
列を、C h l o r o P 予測サーバーを用いて解析することによって単離した。Emanuelsson
et al. (1999), Protein Science 8:978-84 (cbs.dtu.dk/services/ChloroP で入手可能
)。単離された C T P をコードする配列の予測されるタンパク質産物は、およそ 6 0 ~ 7
0 個のアミノ酸長の輸送ペプチドである。この例では、天然セイヨウアブラナ (B. napus
) C T P を、参照配列として使用し、セイヨウアブラナ (B. napus) C T P 中の特定の位
置にその他の C T P から得られた連続する配列を融合することによって例示的合成アブラ
ナ属由来 C T P を設計した。この設計プロセスは、アブラナ属種核酸配列からの、いくつ 50

かの態様による、新規合成CTPの開発を例示する。これらの例示的合成アブラナ属由来CTPは、本開示内容を通じて、Trap8および9と呼ばれる。これらの例示的合成Trapを、プラスチドをターゲティングする機能について試験し、個々に、少なくとも、天然アブラナ属配列について観察されたものと同程度に好都合であるプラスチドターゲティングを示すとわかった。

【0022】

さらなる例示的一実施形態では、各々、本発明の合成Trapペプチドをコードする核酸配列を独立に合成し、黄色蛍光タンパク質(YFP)をコードする核酸配列と作動可能に連結させて、各々、キメラTrap:YFP融合ポリペプチドをコードする合成核酸分子を製造した。各々、キメラTrap:YFPポリペプチドをコードするこのような核酸分子を、各々、Trap:YFPをコードする核酸配列が、AtUbi10プロモーターと作動可能に連結されるよう、各々、バイナリーベクターに導入した。

10

【0023】

なおさらなる例示的一実施形態では、各々、AtUbi10プロモーターと作動可能に連結されたTrap:YFPをコードする核酸配列を含むバイナリーベクターを、独立に、アグロバクテリウム媒介性形質転換によってタバコ(Nicotiana benthamiana)に一時的に形質転換した。共焦点顕微鏡観察およびウエスタンブロット解析によって、各Trapが、YFPをタバコ葉緑体に成功裏にターゲティングしたことを確認した。

【0024】

さらなる例示的一実施形態では、各々、本発明の合成Trapペプチドをコードする核酸配列を独立に合成し、農業的に重要な遺伝子配列をコードする核酸配列に作動可能に連結させた。Trap配列を、除草剤耐性形質(例えば、dgt-28およびdgt-14)に融合して、各々、キメラTrap:DG T-28またはTrap:DG T-14融合ポリペプチドをコードする合成核酸分子を製造した。各々、キメラTrap:DG T-28またはTrap:DG T-14ポリペプチドをコードするこのような核酸分子を、各Trap:dgt-28またはTrap:dgt-14をコードする核酸配列が、プロモーターおよびその他の遺伝子調節エレメントと作動可能に連結されるようにバイナリーベクター中に導入した。Trap:dgt-28またはTrap:dgt-14をコードする核酸配列を含有するバイナリーを使用して、バロピス(varopis)植物種を形質転換した。トランスジェニック植物を、DG T-28またはDG T-14酵素の葉緑体への発現および転位置の結果としての除草剤耐性についてアッセイした。

20

30

【0025】

さらなる例示的一実施形態では、各々、本発明の合成Trapペプチドをコードする核酸配列を独立に合成し、農業的に重要な遺伝子配列をコードする核酸配列に作動可能に連結させた。Trap配列を、昆虫耐性形質(例えば、cry2Aaおよびvip3ab1)を付与する遺伝子と融合して、各々、キメラTrap:Cry2AaまたはTrap:Vip3Ab1融合ポリペプチドをコードする合成核酸分子を製造した。各々、キメラTrap:Cry2AaまたはTrap:Vip3Ab1ポリペプチドをコードするこのような核酸分子を、各Trap:Cry2AaまたはTrap:Vip3Ab1をコードする核酸配列が、プロモーターおよびその他の遺伝子調節エレメントと作動可能に連結されるように、各々、バイナリーベクターに導入した。Trap:Cry2AaまたはTrap:Vip3Ab1をコードする核酸配列を含有するバイナリーを使用して、種々の植物種を形質転換した。トランスジェニック植物を、Cry2AaまたはVip3Ab1酵素の葉緑体への発現および転位置の結果としての昆虫抵抗性についてバイオアッセイした。

40

【0026】

上記の詳細な実施例を考慮して、本発明の合成アブラナ属由来CTP配列およびそれをコードする核酸は、任意のポリペプチドを、様々なプラスチドを含有する細胞中のプラスチドに向かわせるために使用され得る。例えば、本開示によって当業者に利用可能になった方法によって、任意の第2のペプチド配列のN末端に融合された合成アブラナ属由来CTP配列を含むキメラポリペプチドを、第2のペプチド配列のプラスチドターゲティン

50

グのためにプラスチド含有宿主細胞中に導入してもよい（またはそこで発現させてもよい）。したがって、特定の実施形態では、本発明の T r a P ペプチドは、天然 C T P と比較した場合に、プラスチド発現が望まれるペプチドの輸送およびプロセシングの増大された効率を提供し得る。

【0027】

II. 略語

C T P	葉緑体輸送ペプチド
B t	バチルス・チューリングゲンシス (bacillus thuringiensis)
E P S P S	3-エノールピルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ
Y F P	黄色蛍光タンパク質
T i	腫瘍誘導性 (A. ツメファシエンス (A. tumefaciens) に由来するプラスミド)
T-DNA	トランスファーDNA

【0028】

III. 用語

本開示の種々の実施形態の再調査を容易にするために、特定の用語の以下の説明を提供する：

【0029】

葉緑体輸送ペプチド：本明細書において、用語「葉緑体輸送ペプチド」(C T P)（または「プラスチド輸送ペプチド」）とは、ポリペプチドのN末端に存在する場合に、ポリペプチドの輸送を、プラスチドを含有する細胞（例えば、全植物体または植物細胞培養物などの中の植物細胞）のプラスチド中に向かわせるアミノ酸配列を指し得る。C T P は、一般に、タンパク質の輸送を、宿主細胞のプラスチド（例えば、一次、二次または葉緑体などの三次プラスチド）中に向かわせるのに必要であり、十分である。推定葉緑体輸送ペプチドは、いくつかの利用可能なアルゴリズム（例えば、P S O R T および C h l o r o P (cbs.dtu.dk/services/ChloroPで入手可能)）のうち1種によって同定され得る。C h l o r o P は、C T P の特に良好な予測を提供し得る。Emanuelsson et al. (1999), Protein Science 8:978-84。しかし、機能的C T P の予測は、いずれの既存のアルゴリズムによっても100%の効率では達成されない。したがって、同定された推定C T P が、例えば、i n v i t r o または i n v i v o 方法論において意図されるように実際に機能することを確認することは重要である。

【0030】

葉緑体輸送ペプチドは、プラスチド中に輸送されるポリペプチドのN末端に位置し得る。C T P は、C T P を含むポリペプチドの、プラスチドへの同時翻訳輸送または翻訳後輸送を容易にし得る。葉緑体輸送ペプチドは、通常、約40個から約100個の間のアミノ酸を含み、このようなC T P は、特定の共通する特徴を含有することが観察された。例えば、C T P は、あったとしても、極めて少ない負に帯電したアミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンまたはグルタミンなど）しか含有しない；C T P のN末端領域は、帯電したアミノ酸、グリシンおよびプロリンを欠く；C T P の中央領域はまた、極めて高い割合の塩基性またはヒドロキシル化アミノ酸（セリンおよびトレオニンなど）を含有する可能性が高い；C T P のC末端領域は、アルギニンが豊富であり、両親媒性のベータシート構造を含む能力を有する可能性が高い。プラスチドプロテアーゼは、ポリペプチドのプラスチド中への輸送後に、C T P を、C T P を含むポリペプチドの残部から切断し得る。

【0031】

接触：本明細書において、用語、細胞、組織または生物（例えば、植物細胞；植物組織；および植物体）「と接触する」または「によって取り込まれる」は、核酸分子に関して、核酸分子の、生物への内部移行、例えば、限定されるものではないが、生物を核酸分子を含む組成物と接触させること；および生物を核酸分子を含む溶液に浸漬することを含む。

10

20

30

40

50

【0032】

内因性：本明細書において、用語「内因性」とは、特定の生物、組織または細胞内に起因する物質（例えば、核酸分子およびポリペプチド）を指す。例えば、植物細胞において発現された「内因性」ポリペプチドは、同一種の遺伝子操作されていない植物から得られた同一種の細胞において正常に発現されるポリペプチドを指し得る。いくつかの例では、アブラナ属種から得られた内因性遺伝子（例えば、E P S P S 遺伝子）が、参照アブラナ属 C T P 配列を得るために使用され得る。

【0033】

発現：本明細書において、コード配列（例えば、遺伝子または導入遺伝子）の「発現」とは、核酸転写単位（例えば、ゲノム DNA または c DNA を含む）のコードされた情報が、細胞の作動可能な、作動可能でない、または構造的部分に変換されるプロセスを指し、タンパク質の合成を含むことが多い。遺伝子発現は、外部シグナル；例えば、遺伝子発現を増大または減少させる薬剤に対する細胞、組織または生物の曝露によって影響を受け得る。遺伝子の発現はまた、DNA から RNA へ、タンパク質への経路のどこでも調節され得る。遺伝子発現の調節は、例えば、転写、翻訳、RNA 輸送およびプロセッシング、mRNA などの中間分子の分解に対して作用する制御によって、または特定のタンパク質分子の、製造された後の活性化、不活性化、コンパートメント化もしくは分解によって、またはそれらの組合せによって起こる。遺伝子発現は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、限定されるものではないが、ノーザンブロット；RT-PCR；ウエスタンブロット；または *in vitro*；*in situ*；および *in vivo* タンパク質活性アッセイ（複数可）によって、RNA レベルまたはタンパク質レベルで測定され得る。

【0034】

遺伝物質：本明細書において、用語「遺伝物質」は、DNA および RNA などのすべての遺伝子および核酸分子を含む。

【0035】

異種：本明細書において、用語「異種」とは、特定の生物、組織または細胞内に起因しない物質（例えば、核酸分子およびポリペプチド）を指す。例えば、植物細胞において発現された「異種」ポリペプチドとは、同一種の遺伝子操作されていない植物から得られた同一種の細胞において正常には発現されないポリペプチド（例えば、同一生物の異なる細胞または異なる生物の細胞において発現されるポリペプチド）を指し得る。

【0036】

単離された：本明細書において、用語「単離された」とは、分子が天然に存在する生物の細胞において、分子が正常には関連している同種のその他の分子（例えば、その他の核酸分子およびその他のポリペプチド）から実質的に分離または精製されている分子（例えば、核酸分子およびポリペプチド）を指す。例えば、単離された核酸分子は、核酸分子が天然に存在する生物の細胞において、染色体 DNA または染色体外 DNA から実質的に分離または精製され得る。したがって、この用語は、その他の核酸分子、ポリペプチドおよび細胞成分が除去されるように生化学的に精製された組換え核酸分子およびポリペプチドを含む。この用語はまた、組換え核酸分子、化学合成された核酸分子および組換えによって製造されたポリペプチドを含む。

【0037】

本明細書において、用語「実質的に精製された」とは、その天然状態ではそれと正常に関連しているその他の分子から分離されている分子を指す。実質的に精製された分子が、組成物中に存在する主な種であり得る。実質的に精製された分子は、例えば、天然混合物中に存在する溶媒以外に、その他の分子を少なくとも 60% 含まない、少なくとも 75% 含まない、または少なくとも 90% 含まないものであり得る。用語「実質的に精製された」は、その天然状態で存在する分子を指さない。

【0038】

核酸分子：本明細書において、用語「核酸分子」とは、ヌクレオチドのポリマー形態を指し、RNA、cDNA、ゲノム DNA のセンスおよびアンチセンス鎖の両方ならびに上

10

20

30

40

50

記のものの合形成態および混合ポリマーを含み得る。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはいずれかの種類のヌクレオチドの修飾形態を指す場合もある。本明細書において「核酸分子」とは、「核酸」および「ポリヌクレオチド」と同義語である。核酸分子は、特に断りのない限り、普通、少なくとも10塩基長である。この用語は、DNAの一本鎖および二本鎖形態を含む。核酸分子は、二量体の（いわゆる、タンデム）形態および核酸分子の転写産物を含む。核酸分子は、天然に存在する、および／または天然に存在しないヌクレオチド結合によって一緒に連結している、天然に存在するヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドのいずれかまたは両方を含み得る。

【0039】

当業者には、容易に理解されるように、核酸分子は、化学的または生化学的に修飾され得るか、または非天然もしくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含有し得る。このような修飾として、例えば、標識、メチル化、天然に存在するヌクレオチドのうち1個または複数の類似体との置換、ヌクレオチド間修飾（例えば、無電荷結合：例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホラミデート、カルバメートなど；電荷結合：例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど；懸垂部分：例えば、ペプチド；介入物：例えば、アクリジン、ソラレンなど；キレート剤；アルキル化剤；および修飾された結合：例えば、アルファアノマー核酸など）が挙げられる。用語「核酸分子」はまた、一本鎖、二本鎖、部分二本鎖、三本鎖、ヘアピン、環状およびパドロック型（padlocked）コンホメーションを含めた任意のトポロジカルコンホメーションも含む。

【0040】

本明細書において、DNAに関して、用語「コード配列」、「構造的ヌクレオチド配列」または「構造的核酸分子」とは、適当な調節配列の制御下に置かれた場合に、転写およびmRNAによってポリペプチドに最終的に翻訳されるヌクレオチド配列を指す。RNAに関して、用語「コード配列」とは、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に翻訳されるヌクレオチド配列を指す。コード配列の境界は、5'末端の翻訳開始コドンおよび3'末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列として、それだけには限らないが、ゲノムDNA；cDNA；EST；および組換えヌクレオチド配列が挙げられる。

【0041】

いくつかの実施形態では、本発明は、例えば、例えば、イオン交換クロマトグラフィーなどの分離方法を使用して；分子の大きさに基づく排除によって、または親和性によって、種々の溶媒における溶解度に基づく分画技術ならびに増幅、クローニングおよびサブクローニングなどの遺伝子工学の方法によって、単離、精製または部分精製され得るヌクレオチド配列を含む。

【0042】

配列同一性：本明細書において、2種の核酸またはポリペプチド配列に関連して、用語「配列同一性」または「同一性」とは、特定の比較ウィンドウにわたって最大一致を求めてアラインされた場合に同一である2種の配列中の残基を指し得る。

【0043】

本明細書において、用語「配列同一性のパーセンテージ」とは、2種の最適にアラインされた配列（例えば、核酸配列およびアミノ酸配列）を比較ウィンドウにわたって比較することによって決定される値を指し得、ここで、比較ウィンドウ中の配列の部分は、2種の配列の最適アラインメントを求めて参照配列（付加または欠失を含まない）に対して比較されると付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。パーセンテージは、両配列中に同一ヌクレオチドまたはアミノ酸残基が生じる位置の数を決定し、対応する位置の数を得ること、対応する位置の数を、比較ウィンドウ中の位置の総数によって除することおよび結果に100を乗じて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。

【0044】

比較のために配列をアラインするための方法は、当技術分野で周知である。種々のプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、例えば、Smith and Waterman (1981), Adv

10

20

30

40

50

. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970), J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988), Gene 73:237-44; Higgins and Sharp (1989), CABIOS 5:151-3; Corpet et al. (1988), Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992), Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pearson et al. (1994), Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatiana et al. (1999), FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50に記載されている。配列アラインメント方法および相同性算出の詳細な検討事項は、例えば、Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10に見出すことができる。

【0045】

米国国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST (商標); Altschul et al. (1990)) は、いくつかの配列解析プログラムに関連して使用するために、米国国立バイオテクノロジー情報センター (Bethesda, MD) およびインターネットを含め、いくつかの供給源から入手可能である。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法の説明は、BLAST (商標) の「ヘルプ」セクションの下でインターネットで入手可能である。核酸配列を比較するために、BLAST (商標) (Blastn) プログラムの「BLAST2配列」機能が、デフォルトパラメータに設定されたデフォルトBLOSUM62マトリックスを使用して用いられ得る。参照配列に対してさらに大きな類似性を有する核酸配列は、この方法によって評価されると、増大する同一性パーセンテージを示す。

【0046】

特異的にハイブリダイズ可能な／特異的に相補的な：本明細書において、用語「特異的にハイブリダイズ可能な」および「特異的に相補的な」とは、核酸分子および標的核酸分子間で安定な、特異的な結合が生じるよう、十分な相補性を示す用語である。2種の核酸分子間のハイブリダイゼーションは、2種の核酸分子の核酸配列間の逆行性アラインメントの形成を含む。次いで、2種の分子は、反対の鎖の対応する塩基と水素結合を形成して二本鎖分子を形成でき、これは十分に安定である場合には当技術分野で周知の方法を使用して検出可能である。核酸分子は、特異的にハイブリダイズ可能であるその標的配列に対して100%相補的である必要はない。しかし、特異的であるハイブリダイゼーションのために存在しなくてはならない配列相補性の量は、使用されるハイブリダイゼーション条件の関数である。

【0047】

特定の程度のストリンジェンシーをもたらすハイブリダイゼーション条件は、選択されるハイブリダイゼーション方法の性質および組成物およびハイブリダイズする核酸配列の長さに応じて変わる。一般に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーションバッファーのイオン強度（特に、 Na^+ および／または Mg^{++} 濃度）が、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを左右するが、洗浄時間も、ストリンジェンシーに影響を及ぼす。特定の程度のストリンジェンシーを得るのに必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算は、当業者には公知であり、例えば、Sambrook et al. (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nded., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11; および Hames and Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985に論じられている。核酸のハイブリダイゼーションに関するさらなる詳細な指示および案内は、例えば、Tijssen, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」, in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993; および Ausubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995に見出すことができる。

【0048】

本明細書において、「ストリンジェントな条件」は、ハイブリダイゼーションが、ハイ

10

20

30

40

50

ブリダイゼーション分子および標的核酸分子内の相同配列間に20%未満のミスマッチがある場合にのみ起こる条件を包含する。「ストリンジェントな条件」は、さらに特定のレベルのストリンジェンシーを含む。したがって、本明細書において、「中程度のストリンジェンシー」条件とは、20%を超える配列ミスマッチを有する分子が、ハイブリダイズしないものであり；「高ストリンジェンシー」の条件とは、10%を超えるミスマッチを有する配列が、ハイブリダイズしないものであり；「極めて高ストリンジェンシー」の条件とは、5%を超えるミスマッチを有する配列が、ハイブリダイズしないものである。

【0049】

以下は、代表的な、限定するものではないハイブリダイゼーション条件である。

高ストリンジェンシー条件（少なくとも90%の配列同一性を共有する配列を検出する）：65℃で16時間の5×SSCバッファー中でのハイブリダイゼーション；室温で各15分の2×SSCバッファーでの2回の洗浄；および65℃で各20分間の0.5×SSCバッファーでの2回の洗浄。

10

中程度のストリンジェンシー条件（少なくとも80%の配列同一性を共有する配列を検出する）：65～70℃で16～20時間の5×～6×SSCバッファー中でのハイブリダイゼーション；室温で各5～20分の2×SSCバッファーでの2回の洗浄；および55～70℃で各30分間の1×SSCバッファーでの2回の洗浄。

非ストリンジェント対照条件（少なくとも50%の配列同一性を共有する配列がハイブリダイズする）：室温～55℃で16～20時間の6×SSCバッファーでのハイブリダイゼーション；室温～55℃で各20～30分の2×～3×SSCバッファーでの少なくとも2回の洗浄。

20

【0050】

本明細書において、用語「実質的に相同な」または「実質的相同性」とは、連続する核酸配列に関して、ストリンジェントな条件下で、参照核酸配列とハイブリダイズする連続するヌクレオチド配列を指す。例えば、参照核酸配列に対して実質的に相同である核酸配列とは、ストリンジェントな条件（例えば、上記で示される、中程度のストリンジェンシー条件）下で、参照核酸配列とハイブリダイズする核酸配列である。実質的に相同な配列は、少なくとも80%配列同一性を有し得る。例えば、実質的に相同な配列は、約80%～100%配列同一性、例えば、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約98.5%、約99%、約99.5%、および約100%を有し得る。実質的相同性の特性は、特異的ハイブリダイゼーションと密接に関連している。例えば、核酸分子は、特異的結合が望まれる条件下で、例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、核酸の、非標的配列との非特異的結合を避けるための十分な程度の相補性がある場合に、特異的にハイブリダイズ可能である。

30

【0051】

本明細書において、用語「オーソログ」（または「オーソログス」）とは、共通の先祖ヌクレオチド配列から進化した2種以上の種における遺伝子を指し、2種以上の種において同一機能を保持し得る。

40

【0052】

本明細書において、2種の核酸配列分子は、5'から3'方向に読まれる配列のどのヌクレオチドも、3'から5'方向に読まれる場合のもう一方の配列のどのヌクレオチドとも相補的である場合に、「完全相補性」を示すといわれる。参照ヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列は、参照ヌクレオチド配列の逆相補配列に対して配列同一性を示す。これらの用語および説明は、当技術分野で十分に定義されており、当業者に容易に理解される。

【0053】

アミノ酸配列間の配列同一性パーセンテージを決定する場合には、アラインメントによって提供された所与の位置におけるアミノ酸の同一性は、アラインされた配列を含むポリ

50

ペプチドの所望の特性に影響を及ぼすことなく異なり得るということは、当業者には周知である。これらの例では、配列同一性パーセントは、保存的に置換されたアミノ酸間の類似性を説明するよう調整され得る。これらの調整は、当業者には周知であり、よく使用される。例えば、Myers and Miller (1988), Computer Applications in Biosciences 4:11-7を参照のこと。

【0054】

本発明の実施形態は、例示的プラスチド輸送ペプチドアミノ酸配列の機能的変異体およびそれをコードする核酸配列を含む。例示的輸送ペプチド配列の機能的変異体は、例えば、例示的輸送ペプチドアミノ酸配列の断片（N末端またはC末端断片など）、または全長の例示的輸送ペプチドアミノ酸配列もしくは例示的輸送ペプチドアミノ酸配列の断片の修飾された配列であり得る。例示的輸送ペプチドアミノ酸配列は、修飾され得、いくつかの実施形態では、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を導入し得る。「保存的」アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、同様の機能的側鎖、同様の大きさおよび／または同様の疎水性を有するアミノ酸残基によって置き換えられているものである。保存的置換を導入するために同一ファミリーの別のアミノ酸を置き換えるために使用され得るアミノ酸のファミリーは、当技術分野で公知である。例えば、これらのアミノ酸ファミリーとして、塩基性アミノ酸（例えば、リシン、アルギニンおよびヒスチジン）；酸性アミノ酸（例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸）；無電荷（生理学的pHで）極性アミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシンおよびシトシン）；非極性アミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファン）；ベータ分岐アミノ酸（例えば、トレオニン、バリンおよびイソロイシン）；および芳香族アミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびヒスチジン）が挙げられる。例えば、Sambrook et al. (Eds.), 前掲;およびInnis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press, NY, USAを参照のこと。

【0055】

作動可能に連結された：第1のヌクレオチド配列は、第1のヌクレオチド配列が、第2のヌクレオチド配列と機能的関係にある場合に、第2のヌクレオチド配列と「作動可能に連結している」。例えば、プロモーターは、プロモーターが、コード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合に、コード配列と作動可能に連結している。組換えによって作製された場合には、作動可能に連結しているヌクレオチド配列は、一般に、連続しており、2つのタンパク質コード領域をつなげる必要がある場合には、同一リーディングフレーム中にある。しかし、ヌクレオチド配列は、作動可能に連結されるよう連続している必要はない。

【0056】

用語「作動可能に連結された」とは、調節配列およびコード配列に関して使用される場合には、調節配列が、連結されたコード配列の発現に影響を及ぼすことを意味する。「調節配列」または「制御エレメント」とは、関連しているコード配列の転写のタイミングおよびレベル／量、RNAプロセッシングもしくは安定性または翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を指す。調節配列は、プロモーター；翻訳リーダー配列；イントロン；エンハンサー；ステムループ構造；リプレッサー結合性配列；終結配列；ポリアデニル化認識配列などを含み得る。特定の調節配列は、それに作動可能に連結しているコード配列の上流および／または下流に配置され得る。また、コード配列と作動可能に連結している特定の調節配列は、二本鎖核酸分子の関連する相補鎖上に配置され得る。

【0057】

2種以上のアミノ酸配列に関連して使用される場合には、用語「作動可能に連結している」とは、第1のアミノ酸配列が、少なくとも1種のさらなるアミノ酸配列と機能的関係にあることを意味する。例えば、輸送ペプチド（例えば、CTP）は、輸送ペプチドが、ポリペプチドまたは第2のアミノ酸配列の発現または輸送に影響を及ぼす場合に、両配列を含むポリペプチド内の第2のアミノ酸配列と作動可能に連結している。

【0058】

プロモーター：本明細書において、用語「プロモーター」とは、転写の開始から上流であり得る、RNAポリメラーゼおよび転写を開始するためのその他のタンパク質の認識および結合に参与し得るDNAの領域を指す。プロモーターは、細胞における発現のためにコード配列と作動可能に連結され得るか、またはプロモーターは、細胞における発現のためにコード配列と作動可能に連結され得るシグナル配列をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結され得る。「植物プロモーター」は、植物細胞において転写を開始できるプロモーターであり得る。発達制御下にあるプロモーターの例として、葉、根、種子、繊維、木部導管、仮導管または厚壁組織などの特定の組織における転写を優先的に開始するプロモーターが挙げられる。このようなプロモーターは、「組織優先型」と呼ばれる。特定の組織においてのみ転写を開始するプロモーターは、「組織特異的」と呼ばれる。「細胞種特異的」プロモーターは、主に、1種または複数の器官中の特定の細胞種、例えば、根または葉中の維管束細胞において発現を駆動する。「誘導可能な」プロモーターとは、環境制御下にあるプロモーターであり得る。誘導プロモーターによる転写を開始し得る環境条件の例として、嫌気性条件および光の存在が挙げられる。組織特異的、組織優先的、細胞種特異的および誘導性プロモーターは、「非構成的」プロモーターのクラスを構成する。「構成的」プロモーターとは、ほとんどの環境条件下で活性であり得るプロモーターである。

10

【0059】

本発明のいくつかの実施形態では、任意の誘導プロモーターが使用され得る。Ward et al. (1993), Plant Mol. Biol. 22:361-366参照のこと。誘導プロモーターを用いると、誘導物質に応じて転写の速度が増大する。例示的誘導プロモーターとして、それだけには限らないが、銅と反応するACEI系；ベンゼンスルホンアミド除草剤解毒剤と反応するトウモロコシ由来のIn2遺伝子；Tn10由来のTetリプレッサーに由来するプロモーター；およびステロイドホルモン遺伝子由来の誘導プロモーターが挙げられ、糖質コルチコステロイドホルモンによってそれらの転写活性が誘導され得る (Schena et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421)。

20

【0060】

例示的構成プロモーターとして、それだけには限らないが、CaMV由来の35Sプロモーター；コメアクチン遺伝子由来のプロモーター；ユビキチンプロモーター；pEMU；MAS；トウモロコシH3ヒストンプロモーター；およびALSプロモーター、セイヨウアブラナ (Brassica napus) ALS3構造遺伝子の5'のXba1/NcoI断片（または前記Xba1/NcoI断片と同様のヌクレオチド配列）（国際PCT出願番号WO96/30530）などの植物ウイルス由来のプロモーターが挙げられる。

30

【0061】

本発明のいくつかの実施形態では、さらに、任意の組織特異的または組織優先的プロモーターが利用され得る。組織特異的プロモーターと作動可能に連結しているコード配列を含む核酸分子で形質転換された植物は、もっぱら、または優先的に特定の組織においてコード配列の産物を製造し得る。例示的組織特異的または組織優先的プロモーターとして、それだけには限らないが、ファゼオリン遺伝子由来のものなどの根優先的プロモーター；cabまたはリブ羅斯ニリン酸カルボキシラーゼ由来のものなどの葉特異的および光誘導性プロモーター；LAT52由来のものなどの別の特異的プロモーター；Zml3由来のものなどの花粉特異的プロモーター；およびapg由来のものなどの小孢子優先的プロモーターがある。

40

【0062】

形質転換：本明細書において、用語「形質転換」または「形質導入」とは、1種または複数の核酸分子の細胞への転移を指す。細胞は、核酸分子の細胞ゲノムへの組み込みまたはエピソーム複製のいずれかによって、核酸分子が細胞によって安定に複製されるようになった場合に、細胞に軽質導入される核酸分子によって「形質転換される」。本明細書において、用語「形質転換」は、核酸分子が、このような細胞中に導入され得るすべての技

50

術を包含する。例として、それだけには限らないが：ウイルスベクターを用いるトランスフェクション；プラスミドベクターを用いる形質転換；エレクトロポレーション (Fromm et al. (1986), Nature 319:791-3)；リポフェクション (Felgner et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7)；マイクロインジェクション (Mueller et al. (1978), Cell 15:579-85)；アグロバクテリウム媒介性転移 (Fraley et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7)；直接DNA取り込み；および微粒子銃 (Klein et al. (1987), Nature 327:70) が挙げられる。

【0063】

導入遺伝子：外因性核酸配列。いくつかの例では、導入遺伝子は、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードする配列であり得る。特定の例では、導入遺伝子は、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPおよびプラスチド発現が望ましい、少なくとも1種のさらなるペプチド配列（例えば、除草剤抵抗性を付与するペプチド配列）を含むポリペプチドをコードし得る。これらおよびその他の例では、導入遺伝子は、導入遺伝子のコード配列と作動可能に連結している調節配列（例えば、プロモーター）を含有し得る。本開示の目的上、用語「トランスジェニック」は、生物（例えば、植物）を指すために使用される場合には、外因性核酸配列を含む生物を指す。いくつかの例では、外因性核酸配列を含む生物は、分子形質転換技術によって核酸配列が導入された生物であり得る。その他の例では、外因性核酸配列を含む生物は、例えば、遺伝子移入または植物における他家受粉によって核酸配列が導入された生物であり得る。

【0064】

輸送：本明細書において、用語「輸送」、「ターゲッティング」、および「転移」とは、宿主細胞の核から宿主細胞のプラスチドへの、アミノ酸配列を含むポリペプチドの移動を促進する、本発明の特定のアミノ酸配列の特性を指す。特定の実施形態では、このようなアミノ酸配列（すなわち、合成アブラナ属由来CTP配列）は、アミノ酸配列を含むポリペプチドの約100%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、および／または少なくとも約50%を、宿主細胞のプラスチド中に輸送できる可能性がある。

【0065】

ベクター：例えば、形質転換された細胞を製造するために、細胞中に導入されるような核酸分子。ベクターは、複製起点などの、宿主細胞においてそれが複製するのを可能にする核酸配列を含み得る。ベクターの例として、それだけには限らないが、プラスミド；コスミド；バクテリオファージ；または外因性DNAを細胞中に運ぶウイルスが挙げられる。ベクターはまた、1種または複数の遺伝子、アンチセンス分子および／または選択マーカー遺伝子および当技術分野で公知のその他の遺伝子エレメントを含み得る。ベクターは、細胞を形質導入、形質転換または感染し、それによって、細胞に、ベクターによってコードされる核酸分子および／またはタンパク質を発現させ得る。ベクターは、任意選択で、核酸分子の細胞（例えば、リソソーム、タンパク質コーティングなど）への侵入の達成を補助する物質を含んでもよい。

【0066】

具体的に示され、暗示されない限り、用語「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、本明細書において「少なくとも1つの」を示す。

【0067】

具体的に説明されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。分子生物学における一般的な用語の定義は、例えば、Lewin B., Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); および Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見出すことができる。別に記載されない限り、すべてのパーセンテージは、重量によるものであり、すべての

溶媒混合物割合は、容量によるものである。すべての温度は、摂氏度である。

【0068】

I V. 合成アブラナ属由来C T Pをコードする配列を含む核酸分子

いくつかの実施形態では、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している合成アブラナ属由来C T Pをコードする少なくとも1種のヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。特定の実施形態では、対象とするヌクレオチド配列は、対象とするポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であり得る。特定の例では、T r a P 8またはT r a P 9配列が対象とするポリペプチドのN末端と融合しているポリペプチドをコードする単一の核酸分子が、提供される。

【0069】

合成アブラナ属由来C T Pは、アブラナ属E P S P S遺伝子から導くことができる。このような実施形態の特定の実施例では、アブラナ属E P S P S遺伝子は、配列番号14として示される核酸配列もしくは異なるE P S P S遺伝子に由来する相同核酸配列を含むものであり得るか、または配列番号14として示される核酸配列を含むアブラナ属E P S P S遺伝子のオーソログ（例えば、配列番号15として示される核酸配列を含むアブラナ属E P S P S遺伝子）であり得る。

【0070】

いくつかの実施形態では、合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチドは、キメラアブラナ属由来C T Pであり得る。合成キメラアブラナ属由来C T Pは、参照アブラナ属C T P配列内に含まれる第1の連続するアミノ酸配列を、異なるC T P配列（例えば、第2のアブラナ属C T P配列）内に含まれる第2の連続するアミノ酸配列をつなげることによって参照アブラナ属C T P配列から導くことができる。特定の実施形態では、第2の連続するアミノ酸配列を含む異なるC T P配列は、参照配列が得られたアブラナ属の種のもの以外（例えば、異なるアブラナ属の種、アブラナ属の種以外の植物；下等光合成真核生物、例えば、緑藻植物；および原核生物、例えば、シアノバクテリアまたはアグロバクテリウム）のゲノムから得られた相同遺伝子配列によってコードされ得る。したがって、合成アブラナ属由来C T Pをコードするヌクレオチド配列は、参照アブラナ属C T P配列の連続するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、参照アブラナ属C T P配列の残部と相同である異なるC T P配列に由来する連続するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と融合することによって、参照アブラナ属C T Pをコードする遺伝子配列から導くことができる。これらおよびその他の例では、参照アブラナ属C T P配列の連続するアミノ酸配列は、合成アブラナ属由来C T Pの5'末端または3'末端に位置され得る。

【0071】

いくつかの実施形態では、合成キメラアブラナ属由来C T Pは、1種のアブラナ属C T P配列内に含まれる連続するアミノ酸配列を、異なるアブラナ属C T P配列内に含まれる連続するアミノ酸配列とつなげることによって複数のアブラナ属C T P配列（参照アブラナ属C T P配列を含む）から導くことができる。特定の実施形態では、複数のアブラナ属C T P配列は、異なるアブラナ属の種中のオーソログ遺伝子配列によってコードされ得る。いくつかの例では、複数のアブラナ属C T P配列は、正確に2種のアブラナ属C T P配列であり得る。したがって、合成キメラアブラナ属由来C T Pをコードするヌクレオチド配列は、一方のアブラナ属C T P配列の連続するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、第1のアブラナ属C T P配列の残部と相同であるもう一方のアブラナ属C T P配列に由来する連続するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と融合することによって、2種の相同な（例えば、実質的に相同な）アブラナ属C T Pをコードする遺伝子配列（例えば、オーソログ遺伝子配列）から導くことができる。T r a P 8およびT r a P 9は、このような合成キメラアブラナ属由来C T Pの具体例である。

【0072】

当業者ならば、参照アブラナ属C T P配列内の第1の連続するアミノ酸配列の選択後に、前述の誘導プロセスに従う、相同なC T P配列の残部からの連続するアミノ酸配列の同定および選択は、明白なものであり、自動的であるということは理解されよう。いくつか

10

20

30

40

50

の例では、第1の連続するアミノ酸配列は、約25から約41個の間のアミノ酸長（例えば、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41および42個のアミノ酸長）であり得る。いくつかの実施形態では、参照アブラナ属CTP配列内の第1の連続するアミノ酸配列は、一部のアブラナ属EPSPS遺伝子内で保存されている「SVSL」（配列番号13）モチーフの3'末端の位置によって定義される。

【0073】

前記のプロセスに従う、合成キメラアブラナ属由来CTP配列の例は、配列番号3および配列番号4によって表される。当業者によれば、遺伝暗号の縮重を考慮して、これらのペプチドをコードするヌクレオチド配列の種類は、すぐに思い浮かぶ。このようなポリヌクレオチド配列の例として、配列番号5、6、8および9が挙げられる。これらの特定の例は、セイヨウアブラナ（*B. napus*）EPSPS遺伝子のいくつかのEPSPSオーソログの1種から得た相同CTPに由来する連続する配列を組み込むことによって、合成キメラアブラナ属由来CTPの構造的特徴を例示する。

【0074】

いくつかの実施形態は、合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチドおよび／またはそれをコードする核酸の機能的変異体を含む。このような機能的変異体として、例えば、限定するものではないが、配列番号14および／または配列番号15として示されるアブラナ属CTPの一方または両方をコードする配列の相同体および／もしくはオーソログから導かれた合成アブラナ属由来CTPをコードする配列ならびに／またはそれによってコードされるCTP；配列番号1および／または配列番号2内の連続するアミノ酸配列を含む合成アブラナ属由来CTPをコードする核酸および／またはそれによってコードされるCTP；配列番号5、6、8および9のうち1種内の連続する核酸配列を含む末端切断型合成アブラナ属由来CTPをコードする配列；配列番号5、6、8および9のうち1種に対して実質的に相同である、連続する核酸配列を含む末端切断型合成アブラナ属由来CTPをコードする配列；配列番号3および4内の連続するアミノ酸配列を含む末端切断型合成アブラナ属由来CTP；配列番号5、6、8および9のうち1種内の連続するアミノ酸配列を含む合成アブラナ属由来CTPをコードする核酸および／またはそれによってコードされるCTP；1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号3および4のうち1種内の連続するアミノ酸配列を含む合成アブラナ属由来CTPをコードする核酸および／またはそれによってコードされるCTP；ならびに、作動可能に連結しているペプチドをプラスチドを含有する細胞中のプラスチドに向けると実証されている、1つまたは複数の非保存的アミノ酸置換を有する、配列番号3および4のうち1種内の連続するアミノ酸配列を含む合成アブラナ属由来CTPをコードする核酸および／またはそれによってコードされるCTPが挙げられる。

【0075】

したがって、本発明のいくつかの実施形態は、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含む合成キメラアブラナ属由来CTPをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。このような核酸分子は、例えば、分子生物学の技術における本発明のCTPをコードする配列の製造を容易にすることにおいて有用であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、本発明のCTPをコードする配列は、発現ベクターに配列をサブクローニングするために適したベクター中に導入され得るか、または本発明のCTPをコードする配列は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結しているCTPをコードする配列を含むさらなる核酸分子の製造を容易にする核酸分子中に導入され得る。これらのおよびさらなる実施形態では、合成キメラアブラナ属由来CTPの配列中の1つまたは複数のアミノ酸位置が欠失している場合がある。例えば、合成キメラアブラナ属由来CTPの配列は、配列中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20位のアミノ酸（複数可）が欠失されるよう修飾され得る。相同CTP配列のアラインメントを使用して、どのアミノ酸が、合成CTPの機能に影響を及ぼすことなく欠失され得るかについてのガイダンスが提供され得る。

【0076】

特定の例では、合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチドは、80個未満のアミノ酸長である。例えば、合成アブラナ属由来CTPは、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60個またはそれより少ないアミノ酸長であり得る。特定の例では、合成アブラナ属由来CTPは、約65、約68、約72または約74個のアミノ酸長であり得る。これらおよびさらなる例では、合成アブラナ属由来CTPは、配列番号3および4のうち1種に示されるアミノ酸配列または前記のもののいずれかの機能的変異体を含み得る。したがって、合成アブラナ属由来CTPは、合成アブラナ属由来CTPの長さが、80個未満のアミノ酸長である、配列番号3および4のうち1種を含むアミノ酸配列またはその機能的変異体を含み得る。特定の例では、合成アブラナ属由来CTPは、例えば、配列番号3および4のうち1種に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含み得る。

10

【0077】

特定の合成アブラナ属由来CTP、例えば、配列番号3のTrap8ペプチドおよび配列番号4のTrap9ペプチドまたは任意の特定の欠失および／もしくは保存的アミノ酸置換を含む前記のもののいずれかの機能的変異体をコードするヌクレオチド配列のすべてが、本開示を考慮して当業者には認識されよう。遺伝暗号の縮重は、特定のアミノ酸配列について有限数のコード配列を提供する。合成アブラナ属由来CTPをコードするよう特定の配列を選択することは、実施者の判断の自由の範囲内にある。異なる適用では、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主における合成アブラナ属由来CTPの発現を増大するために、宿主のコドン使用バイアスに影響を及ぼすコード配列が、選択され得る。例として、合成アブラナ属由来CTPは、配列番号5、6、8および9の1種として示されるヌクレオチド配列によってコードされ得る。

20

【0078】

本発明のいくつかの実施形態において提供される核酸分子では、合成アブラナ属由来CTPをコードするヌクレオチド配列の最後のコドンおよび対象とするヌクレオチド配列の第1のコドンは、例えば、イントロンまたは「停止」をコードしない任意の数のヌクレオチドトリプレットによって離れている場合もある。いくつかの例では、天然前駆体ポリペプチドにおいて葉緑体輸送ペプチドと普通関連している成熟タンパク質の第1のアミノ酸をコードする配列が、合成アブラナ属由来CTPをコードするヌクレオチド配列の最後のコドンと、対象とするヌクレオチド配列の第1のコドンの間に存在し得る。合成アブラナ属由来CTPをコードするヌクレオチド配列と、対象とするヌクレオチド配列の第1のコドンを分離する配列は、例えば、コードされるアミノ酸配列が、キメラポリペプチドの翻訳およびプラスチドへのその転位置を大幅に変更する可能性が低いような任意の配列からなり得る。これらおよびさらなる実施形態では、合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列の最後のコドンは、位相レジスタにおいて、対象とするヌクレオチド配列の第1のコドンとそれと直接連続して、または合成ヌクレオチドリンカー（例えば、融合を達成するために使用されることばあるヌクレオチドリンカー）によってコードされるような短いペプチド配列だけそれから離れて融合され得る。

30

40

【0079】

いくつかの実施形態では、例えば、特定の宿主におけるコード配列の発現を増強するために、対象とするヌクレオチド配列および／または単一コード配列にそれと融合している合成アブラナ属由来CTPをコードする配列のヌクレオチドを修飾することが望ましい場合がある。遺伝暗号は、64種の可能性あるコドンと重複しているが、ほとんどの生物は、これらのコドンのサブセットを優先的に使用する。種において最も多く利用されるコドンは、最適コドンと呼ばれ、あまり多くは利用されないものは、稀に使用されるコドンまたは低使用コドンとして分類される。Zhang et al. (1991), Gene 105:61-72. コドンは、

50

「コドン最適化」と呼ばれることもあるプロセスにおいて、特定の宿主の好ましいコドン使用を反映するよう置換され得る。例えば、翻訳の速度を高めるよう、または望ましい特性（例えば、最適化されていない配列から製造された転写物と比較して、より長い半減期）を有する組換えRNA転写物を製造するよう、個々の原核生物または真核生物宿主によって好まれるコドンを含む最適化されたコード配列が調製され得る。

【0080】

合成アブラナ属由来CTP配列を組み込むことによって、任意のポリペプチドが、プラスチドを含む細胞のプラスチドにターゲッティングされ得る。例えば、いくつかの実施形態では、連結しているポリペプチド-CTP分子が発現される細胞において、ポリペプチドをプラスチドに向かわせるために、ポリペプチドが合成アブラナ属由来CTP配列に連結され得る。特定の実施形態では、合成アブラナ属由来CTP配列の組み込みによってプラスチドにターゲッティングされるポリペプチドは、例えば、ポリペプチドが天然に発現される細胞のプラスチドにおいて普通発現されるポリペプチドであり得る。例えば、限定するものではないが、合成アブラナ属由来CTP配列の組み込みによってプラスチドにターゲッティングされるポリペプチドは、除草剤抵抗性、ウイルス抵抗性、細菌病原体抵抗性、昆虫抵抗性、線虫抵抗性または真菌抵抗性に関与しているポリペプチドであり得る。例えば、米国特許第5,569,823号；同5,304,730号；同5,495,071号；同6,329,504号；および同6,337,431号を参照のこと。合成アブラナ属由来CTP配列の組み込みによってプラスチドにターゲッティングされるポリペプチドは、別法として、例えば、限定するものではないが、草勢または収量に関するポリペプチド（極端な温度、土壌条件、光量レベル、水分レベルおよび化学的環境に対する耐性に関与しているポリペプチドを含む）または対象とする形質（例えば、選択マーカー遺伝子産物、種子色に関与しているポリペプチドなど）を含む植物を同定するためのマーカーとして使用され得るポリペプチドであり得る。

【0081】

本発明のいくつかの実施形態において、合成アブラナ属由来CTP配列と連結され得る、除草剤抵抗性に関与しているポリペプチドの限定されない例として、アセトラクターゼシンターゼ（ALS）、突然変異ALSおよびALSの前駆体（例えば、米国特許第5,013,659号を参照のこと）；CP4 EPSPS、クラスIII EPSPSまたはクラスIV EPSPSなどのEPSPS（例えば、米国特許第4,971,908号および同6,225,114号を参照のこと）；光合成および脂肪酸、アミノ酸、油、アロテノイド（arotenoid）、テルペノイド、デンプンの合成などを含めたプラスチドにおいて生じる生理学的プロセスを修飾する酵素が挙げられる。特定の実施形態において、合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチドと連結され得るポリペプチドのその他の限定されない例として、ゼアキサンチンエポキシダーゼ、コリンモノオキシゲナーゼ、フェロケラターゼ、オメガ3脂肪酸不飽和化酵素、グルタミシンセターゼ、デンプン変性酵素、必須アミノ酸の合成に関与しているポリペプチド、プロビタミンA、ホルモン、Bt毒素タンパク質などが挙げられる。前記のペプチドをコードするヌクレオチド配列は、当技術分野で公知であり、このようなヌクレオチド配列は、合成アブラナ属由来CTPと連結している対象とするポリペプチドを含むポリペプチドに発現されるよう、合成アブラナ属由来CTPをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結され得る。さらに、前記のポリペプチドのいずれかをコードするさらなるヌクレオチド配列は、当業者によって同定され得る（例えば、特定のポリペプチドをコードするその他の遺伝子に対して高い相同性を有する遺伝子のクローニングによって）。このようなヌクレオチド配列が同定されると、同定されたヌクレオチド配列と作動可能に連結された合成アブラナ属由来CTPをコードする配列を含むヌクレオチド配列または同等のポリペプチドをコードする配列を設計することが簡単なプロセスである。

【0082】

V. 合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドの発現

いくつかの実施形態では、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペ

チドまたはその機能的同等物をコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1種の核酸分子が、そこでのポリペプチドの発現のために細胞、組織または生物中に導入され得る。特定の実施形態では、核酸分子は、合成アブラナ属由来C T Pをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結している対象とするヌクレオチド配列を含み得る。例えば、核酸分子は、少なくとも1種の合成アブラナ属由来C T Pと、対象とするヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも1種のさらなるペプチド配列を含むポリペプチドをコードするコード配列を含み得る。いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子が、プラスチドを含有する宿主細胞、組織または生物（例えば、植物細胞、植物組織および植物体）中に導入され得、その結果、ポリペプチドが、プラスチドを含有する宿主細胞、組織または生物中の核酸分子から発現され得、発現されたポリペプチドが、少なくとも1種の合成アブラナ属由来C T Pおよび対象とするヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも1種のさらなるペプチド配列を含む。特定の例では、このような発現されたポリペプチドの合成アブラナ属由来C T Pは、少なくともさらなるペプチド配列を含むポリペプチドの一部を、宿主細胞、組織または生物のプラスチドへのターゲッティングを容易にし得る。

【0083】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子は、当業者に公知の方法論のいずれかのうち1種によってプラスチドを含有する細胞中に導入され得る。特定の実施形態では、宿主細胞、組織または生物は、細胞、組織または生物中に核酸分子を導入するために本発明の核酸分子と接触され得る。特定の実施形態では、細胞は、核酸分子が細胞中に導入され、核酸分子が、細胞のゲノム中に安定に組み込まれるように、本発明の核酸分子を用いて形質転換され得る。いくつかの実施形態では、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結している合成アブラナ属由来C T Pをコードする少なくとも1種のヌクレオチド配列を含む核酸分子が、細胞、例えば、プラスチドを含有する細胞（例えば、植物細胞）の形質転換のために使用され得る。発現を開始または増強するために、核酸分子は、1種または複数の調節配列を含んでもよく、この調節配列は、少なくとも1種の合成アブラナ属由来C T Pを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結され得る。

【0084】

核酸分子は、例えば、例えば、直鎖または閉じた環状プラスミドを含めたベクター系であり得る。特定の実施形態では、ベクターは、発現ベクターであり得る。本発明の核酸配列は、例えば、核酸配列が、1種または複数の調節配列と作動可能に連結されるようベクター中に挿入され得る。多数のベクターが、この目的のために利用可能であり、特定のベクターの選択は、例えば、ベクター中に挿入される核酸の大きさおよびベクターを用いて形質転換される個々の宿主細胞に応じて変わり得る。ベクターは、通常、種々の成分を含有し、その同一性は、ベクターの機能（例えば、DNAの増幅およびDNAの発現）およびベクターが適合する個々の宿主細胞（複数可）に応じて変わる。

【0085】

いくつかの実施形態は、少なくとも1種の合成アブラナ属由来C T Pを含むポリペプチドをコードする1種または複数のヌクレオチド配列と作動可能に連結している上記の調節配列のうち少なくとも1種を含むヌクレオチド配列を含む植物形質転換ベクターを含み得る。1種または複数のヌクレオチド配列は、ポリペプチドの少なくとも一部を、植物細胞、組織または生物のプラスチドにターゲッティングする合成アブラナ属由来C T Pを含むポリペプチドを製造するよう、植物細胞、組織または生物において調節配列（複数可）の制御下で発現され得る。

【0086】

いくつかの実施形態では、少なくとも1種の合成アブラナ属由来C T Pを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結している調節配列は、核酸分子が増幅される細菌細胞または核酸分子が発現される植物細胞などの宿主細胞において機能するプロモーター配列であり得る。本発明の核酸分子における使用に適したプロモーターとして、誘導可能、ウイルス性、合成または構成性であるものが挙げられ、そのすべてが、当技術分野で周知である。本発明の実施形態において有用であり得るプロモーターの限定さ

10

20

30

40

50

れない例は、米国特許第 6, 437, 217 号 (トウモロコシ RS81 プロモーター) ; 同 5, 641, 876 号 (コメアクチンプロモーター) ; 同 6, 426, 446 号 (トウモロコシ RS324 プロモーター) ; 同 6, 429, 362 号 (トウモロコシ PR-1 プロモーター) ; 同 6, 232, 526 号 (トウモロコシ A3 プロモーター) ; 同 6, 177, 611 号 (構成的トウモロコシプロモーター) ; 同 5, 322, 938 号、同 5, 352, 605 号、同 5, 359, 142 号および同 5, 530, 196 号 (35S プロモーター) ; 同 6, 433, 252 号 (トウモロコシ L3 オレオシンプロモーター) ; 同 6, 429, 357 号 (コメアクチン 2 プロモーターおよびコメアクチン 2 イントロン) ; 同 6, 294, 714 号 (光誘導性プロモーター) ; 同 6, 140, 078 号 (塩誘導性プロモーター) ; 同 6, 252, 138 号 (病原体誘導性プロモーター) ; 同 6, 175, 060 号 (亜リン酸欠乏誘導性プロモーター) ; 同 6, 388, 170 号 (双方向性プロモーター) ; 同 6, 635, 806 号 (γ -コイキシン (coixin) プロモーター) ; および米国特許出願番号第 09/757, 089 号 (トウモロコシ葉緑体アルドラーゼプロモーター) によって提供される。

【0087】

さらなる例示のプロモーターとして、ノパリンシンターゼ (NOS) プロモーター (Ebert et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9) ; オクトピンシンターゼ (OCS) プロモーター (アグロバクテリウム・ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) の腫瘍誘導性プラスミドで実施される) ; カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 19S プロモーターなどのカリモウイルスプロモーター (Lawton et al. (1987), Plant Mol. Biol. 9:315-24) ; CaMV 35S プロモーター (Odell et al. (1985), Nature 313:810-2; ゴマノハグサ (figwort) モザイクウイルス 35S プロモーター (Walker et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8) ; スクロースシンターゼプロモーター (Yang and Russell (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8) ; R 遺伝子複合体プロモーター (Chandler et al. (1989), Plant Cell 1:1175-83) ; クロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子プロモーター ; CaMV 35S (米国特許第 5, 322, 938 号、同 5, 352, 605 号、同 5, 359, 142 号および同 5, 530, 196 号) ; FMV 35S (米国特許第 6, 051, 753 号および同 5, 378, 619 号) ; PC1SV プロモーター (米国特許第 5, 850, 019 号) ; SCP1 プロモーター (米国特許第 6, 677, 503 号) ; および AGRTU. nos プロモーター (GenBank 受託番号 V00087; Depicker et al. (1982), J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan et al. (1983), Nature 304:184-7) が挙げられる。

【0088】

特定の実施形態では、本発明の核酸分子は、組織特異的プロモーターを含み得る。組織特異的プロモーターは、生物のその他の組織と比較して、プロモーターが特異的である組織において、作動可能に連結しているヌクレオチド配列のより高レベルの転写を指示するヌクレオチド配列である。組織特異的プロモーターの例として、限定するものではないが、タペータム特異的プロモーター ; 別の特異的プロモーター ; 花粉特異的プロモーター (例えば、米国特許第 7, 141, 424 号および国際 PCT 出願番号 WO99/042587 を参照のこと) ; 胚珠特異的プロモーター ; (例えば、米国特許出願第 2001/047525 号 A1 を参照のこと) ; 果実特異的プロモーター (例えば、米国特許第 4, 943, 674 号および同 5, 753, 475 号参照のこと) ; および種子特異的プロモーター (例えば、米国特許第 5, 420, 034 号および同 5, 608, 152 号参照のこと) が挙げられる。いくつかの実施形態では、発達段階特異的プロモーター (例えば、発達の後期段階で活性なプロモーター) が、本発明の組成物または方法において使用され得る。

【0089】

いくつかの実施形態において、核酸分子と作動可能に連結され得るさらなる調節配列として、翻訳リーダー配列として機能するプロモーター配列とコード配列の間に位置する 5' UTR が挙げられる。翻訳リーダー配列は、完全にプロセシングされた mRNA 中に存

10

20

30

40

50

在し、一次転写物のプロセッシングおよび／またはRNA安定性に影響を及ぼし得る。翻訳リーダー配列の例として、トウモロコシおよびペチュニア熱ショックタンパク質リーダー（米国特許第5,362,865号）、植物ウイルスコートタンパク質リーダー、植物リブ्रोースニリン酸カルボキシラーゼリーダーおよびその他のものが挙げられる。例えば、Turner and Foster (1995), Molecular Biotech. 3(3):225-36を参照のこと。5'UTRの限定されない例は、GmHsp（米国特許第5,659,122号）；PhDnaK（米国特許第5,362,865号）；AtAnt1；TEV（Carrington and Freed (1990), J. Virol. 64:1590-7）；およびAGR腫瘍（GenBank受託番号V00087）；およびBevan et al. (1983), Nature 304:184-7）によって提供されている。

【0090】

いくつかの実施形態において、核酸分子と作動可能に連結され得るさらなる調節配列はまた、3'非翻訳配列、3'転写終結領域またはポリアデニル化領域も含む。これらは、ヌクレオチド配列の下流に位置する遺伝子エレメントであり、ポリアデニル化シグナルおよび／または転写もしくはmRNAプロセッシングに影響を及ぼすことができるその他の調節シグナルを提供するポリヌクレオチドを含む。ポリアデニル化シグナルは、植物において、mRNA前駆体の3'末端へのポリアデニル化（polyadenylate）ヌクレオチドの付加を引き起こすよう機能する。ポリアデニル化配列は、様々な植物遺伝子から、またはT-DNA遺伝子から導かれ得る。3'転写終結領域の限定されない例として、ノパリンシンターゼ3'領域（nos3'；Fraley et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7）がある。異なる3'非翻訳領域の使用の例が、Ingelbrecht et al., (1989), Plant Cell 1:671-80に提供されている。ポリアデニル化シグナルの限定されない例として、エンドウ（Pisum sativum）RbcS2遺伝子に由来するもの（Ps.RbcS2-E9；Coruzzi et al. (1984), EMBO J. 3:1671-9）およびAGRtu.nos（GenBank受託番号E01312）が挙げられる。

【0091】

本発明の組換え核酸分子またはベクターは、植物細胞などの形質転換された細胞に選択可能な表現型を付与する選択マーカースを含み得る。選択マーカースはまた、本発明の組換え核酸分子を含む植物または植物細胞を選択するために使用され得る。マーカースは、殺生物剤抵抗性、抗生物質抵抗性（例えば、カナマイシン、ジェネテシン（G418）、ブレオマイシン、ハイグロマイシンなど）または除草剤抵抗性（例えば、グリホサートなど）をコードし得る。選択マーカースの例として、それだけには限らないが、カナマイシン抵抗性をコードし、カナマイシン、G418などを使用して選択され得るneo遺伝子；ピアラホス抵抗性をコードするpatまたはbar遺伝子；グリホサート抵抗性をコードする変異株EPSPシンターゼ遺伝子；プロモキシニルに対する抵抗性を付与するニトリラーゼ遺伝子；イミダゾリノン（imidazolinone）またはスルホニル尿素抵抗性を付与する変異株アセト乳酸シンターゼ遺伝子（ALS）；メトトレキサート抵抗性DHFR遺伝子が挙げられる。アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノトリシン、ピューロマイシン、スペクチノマイシン、リファンピシン、ストレプトマイシンおよびテトラサイクリンなどに対する抵抗性を付与する複数の選択マーカースが利用可能である。このような選択マーカースの例は、例えば、米国特許第5,550,318号；同5,633,435号；同5,780,708号および同6,118,047号に例示されている。

【0092】

本発明の組換え核酸分子またはベクターはまた、またはあるいは、スクリーニング可能なマーカースを含み得る。スクリーニング可能なマーカースは、発現をモニタリングするために使用され得る。例示的なスクリーニング可能なマーカースとして、β-グルクロニダーゼまたは種々の発色基質が公知である酵素をコードするuidA遺伝子（GUS）（Jefferson et al. (1987), Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405）；植物組織におけるアントシアニン色素（赤色）の産生を調節する産物をコードするR遺伝子座遺伝子（Dellaporta et

10

20

30

40

50

al. (1988), 「Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac.」 In 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson and R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82); β -ラクタマーゼ遺伝子 (Sutcliffe et al. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3737-41); 種々の発色基質が公知である酵素をコードする遺伝子 (例えば、PADAC、発色性セファロsporin); ルシフェラーゼ遺伝子 (Ow et al. (1986), Science 234:856-9); 発色性カテコールを変換できるカテコールジオキシゲナーゼをコードする xylE 遺伝子 (Zukowski et al. (1983), Gene 46(2-3):247-55); アミラーゼ遺伝子 (Ikata et al. (1990), Bio/Technol. 8:241-2); チロシンを DOPA およびドーパキノンに酸化でき、それが、順に、メラニンに縮合する酵素をコードするチロシナーゼ遺伝子 (Katz et al. (1983), J. Gen. Microbiol. 129:2703-14); および α -ガラクトシダーゼが挙げられる。

10

【0093】

宿主細胞の形質転換に適した方法として、例えば、限定するものではないが、プロトプラストの形質転換によって (例えば、米国特許第 5, 508, 184 号を参照のこと); 乾燥/阻害媒介性 DNA 取り込みによって (例えば、Potrykus et al. (1985), Mol. Gen. Genet. 199:183-8 を参照のこと); エレクトロポレーションによって (例えば、米国特許第 5, 384, 253 号を参照のこと); シリコンカーバイドファイバーを用いる攪拌によって (例えば、米国特許第 5, 302, 523 号および同 5, 464, 765 号を参照のこと); アグロバクテリウム媒介性形質転換によって (例えば、米国特許第 5, 563, 055 号、同 5, 591, 616 号、同 5, 693, 512 号、同 5, 824, 877 号、同 5, 981, 840 号および同 6, 384, 301 号を参照のこと); および DNA がコーティングされた粒子の加速によって (例えば、米国特許第 5, 015, 580 号、同 5, 550, 318 号、同 5, 538, 880 号、同 6, 160, 208 号、同 6, 399, 861 号および同 6, 403, 865 号を参照のこと) など、DNA が細胞中に導入され得る任意の方法が挙げられる。これらなどの技術の適用によって、実質的にいかなる種の細胞も、安定に形質転換され得る。いくつかの実施形態では、形質転換 DNA は、宿主細胞のゲノム中に組み込まれる。多細胞性種の場合には、トランスジェニック細胞は、トランスジェニック生物に再生され得る。あるいは、トランスジェニック細胞は、植物体に再生できない場合がある。例えば、トランスジェニック植物のゲノム中に本発明の 1 種または複数の核酸配列を含むトランスジェニック植物を生成するために、これらの技術のいずれも使用され得る。

20

30

【0094】

発現ベクターを植物中に導入するために最も広く利用されている方法は、アグロバクテリウムの天然形質転換システムに基づいている。A. ツメファシエンス (A. tumefaciens) および A. リゾゲネス (A. rhizogenes) は、植物細胞を遺伝的に形質転換する植物病原性土壌細菌である。A. ツメファシエンス (A. tumefaciens) および A. リゾゲネス (A. rhizogenes) の Ti および Ri プラスミドは、それぞれ、植物の遺伝子形質転換に関与する遺伝子を保持する。Ti (腫瘍誘導性) プラスミドは、形質転換された植物に転移される T-DNA として知られる大きなセグメントを含有する。Ti プラスミドの別のセグメント、vir 領域が、T-DNA 転移に関与している。T-DNA 領域は、末端反復に隣接している。一部の修飾されたバイナリーベクターでは、腫瘍誘導性遺伝子が欠失されており、T-DNA 境界配列に隣接している外来 DNA を転移させるために、vir 領域の機能が利用される。T-DNA 領域はまた、例えば、トランスジェニック植物および細胞の効率的な回収のための選択マーカーならびに合成アブラナ属由来 CTP をコードする核酸などの転移のための配列を挿入するための多重クローニング部位を含有し得る。

40

【0095】

したがって、いくつかの実施形態では、植物形質転換ベクターは、A. ツメファシエンス (A. tumefaciens) の Ti プラスミド (例えば、米国特許第 4, 536, 475 号、同 4, 693, 977 号、同 4, 886, 937 号および同 5, 501, 967 号; および欧州特許 EP 0 122 791 を参照のこと) または A. リゾゲネス (A. rhizogenes) の

50

R i プラスミドから導くことができる。さらなる植物形質転換ベクターとして、例えば、限定するものではないが、Herrera-Estrella et al. (1983), Nature 303:209-13; Bevan et al. (1983), Nature 304:184-7; Klee et al. (1985), Bio/Technol. 3:637-42; によって、および欧州特許 E P O 1 2 0 5 1 6 において記載されたものおよび前記のいずれかから誘導されたものが挙げられる。植物と天然に相互作用する、シノリゾビウム (Sinorhizobium)、根粒菌 (Rhizobium) およびメソリゾビウム (Mesorhizobium) などのその他の細菌が、いくつかの多様な植物への遺伝子導入を媒介するよう修飾され得る。これらの植物と関連する共生細菌は、武装解除された T i プラスミドおよび適したバイナリーベクターの両方を獲得することによって遺伝子導入に適任にされ得る。

【0096】

10

外因性 D N A をレシピエント細胞に提供した後、一般に、さらなる培養および植物再生のために形質転換された細胞が同定される。形質転換された細胞を同定する能力を改善するために、形質転換体を生成するために使用されるベクターとともに、先に示されたよう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を使用することが望ましい場合がある。選択マーカーが使用される場合には、形質転換された細胞は、細胞を、選択物質（単数または複数）に曝露することによって、形質転換された可能性のある細胞集団内で同定される。スクリーニング可能なマーカーが使用される場合には、細胞は、所望のマーカー遺伝子形質についてスクリーニングされ得る。

【0097】

20

選択物質に対する曝露を生き延びる細胞またはスクリーニングアッセイにおいて陽性とスコアされた細胞が、植物の再生を支持する培地で培養され得る。いくつかの実施形態では、任意の適した植物組織培養培地（例えば、M S および N 6 培地）は、成長調節物質などのさらなる物質を含むことによって修飾され得る。組織は、植物再生の試みを開始するのに、または手作業での選択の反復ラウンド後に十分な組織が利用可能になるまで、組織の形態が再生に適するまで（例えば、少なくとも 2 週間）、成長調節物質を含む基本培地で維持され、次いで、シュート形成につながる培地に移され得る。培養物は、十分なシュート形成が起こるまで周期的に移される。シュートが形成されると、それらは、根形成につながる培地に移される。十分な根が形成されると、植物は、さらなる成長および成熟度のために土壌に移され得る。

【0098】

30

再生植物における対象とする核酸分子（例えば、少なくとも 1 種の合成アブラナ属由来 C T P を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列）の存在を確認するために、様々なアッセイが実施され得る。このようなアッセイとして、例えば、サザンおよびノーザンブロッティング、P C R および核酸配列決定などの分子生物学的アッセイ；例えば、免疫学的手段によって（E L I S A および／またはウエスタンブロット）、または酵素機能によってタンパク質産物の存在を検出することなどの生化学的アッセイ；葉または根のアッセイなどの植物部分アッセイ；および再生した植物体全体の表現型の解析が挙げられる。

【0099】

40

例として、組み込み事象は、例えば、対象とするヌクレオチド配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用する P C R 増幅によって解析され得る。P C R 遺伝子型判定は、ゲノムに組み込まれた、対象とする核酸分子を含有すると予測される単離された宿主植物組織に由来するゲノム D N A のポリメラーゼ連鎖反応（P C R）増幅と、それに続く P C R 増幅産物の標準的なクローニングおよび配列解析を含むが、それに限定されないと理解される。P C R 遺伝子型判定の方法は、十分に記載されており（例えば、Rios, G. et al. (2002), Plant J. 32:243-53 を参照のこと）、任意の植物種（例えば、トウモロコシ (Z. mays) またはダイズ (G. max) ）または細胞培養物を含めた組織種に由来するゲノム D N A に適用され得る。

【0100】

50

アグロバクテリウム依存性形質転換法を使用して形成されたトランスジェニック植物は

、通常、1つの染色体に挿入された単一の組換えDNA配列を含有する。単一组換えDNA配列は、「トランスジェニック事象」または「組み込み事象」と呼ばれる。このようなトランスジェニック植物は、挿入されたDNA配列についてヘテロ接合性である。いくつかの実施形態では、導入遺伝子に関してホモ接合性のトランスジェニック植物体は、単一の外因性遺伝子配列を含有する独立した分離個体のトランスジェニック植物を、自身と性的に交配すること（自家受粉）によって得られ得る、例えば、F₁種子を製造するためのF₀植物。製造されたF₁種子の4分の1が、導入遺伝子に関してホモ接合体となる。F₁種子を発芽させることが、通常、SNPアッセイまたはヘテロ接合性とホモ接合性間の区別を可能にする熱増幅アッセイ（すなわち、接合状態アッセイ）を使用してヘテロ接合性について試験され得る植物をもたらす。

10

【0101】

特定の実施形態では、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含む少なくとも1種のポリペプチドのコピーが、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含む少なくとも1種のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1種の核酸分子が導入されているプラスチドを含有する細胞において製造される。少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含む各ポリペプチドは、異なる形質転換事象において導入された複数の核酸配列から、または単一の形質転換事象において導入された単一の核酸配列から発現され得る。いくつかの実施形態では、複数のこのようなポリペプチドが、単一プロモーターの制御下で発現される。その他の実施形態では、複数のこのようなポリペプチドが、複数のプロモーターの制御下で発現される。複数のペプチド配列を含み、ペプチド配列の各々が、プラスチドにターゲッティングされるべき、単一のポリペプチドが、発現され得る。

20

【0102】

組換え核酸分子を用いる植物の直接形質転換に加えて、少なくとも1つのトランスジェニック事象を有する第1の植物を、このような事象を欠く第2の植物と交雑させることによってトランスジェニック植物が調製され得る。例えば、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を、形質転換を受け入れる第1の植物株に導入して、トランスジェニック植物を製造してもよく、このトランスジェニック植物を、第2の植物と交雑させて、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を第2の植物株中に遺伝子移入してもよい。

30

【0103】

VI. 合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチドによって指示されるポリペプチドを含む植物材料

いくつかの実施形態では、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む植物細胞が提供される。特定の実施形態では、このような植物細胞は、植物体を生成するよう再生できない植物細胞の形質転換によって製造され得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む植物細胞を含む植物が、提供される。特定の実施形態では、このような植物は、植物組織または植物細胞の形質転換および全植物体の再生によって製造され得る。さらなる実施形態では、このような植物は、市販の供給源から、または少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸の生殖質への遺伝子移入によって得られ得る。特定の実施形態では、このような植物は、植物体を生成するよう再生できない、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む植物細胞を含む。少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む植物細胞を含む植物材料も提供される。このような植物材料は、植物細胞を含む植物から得られ得る。

40

【0104】

少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むトランスジェニック植物、再生不可能な植物細胞または植物材料は、いく

50

つかの実施形態では、以下の特徴：植物の細胞におけるポリペプチドの発現；植物の細胞のプラスチドにおけるポリペプチドの一部の発現；植物の細胞のサイトゾルから細胞のプラスチドへのポリペプチドの輸送；植物の細胞におけるポリペプチドのプラスチド特異的発現；および／または植物の細胞におけるポリペプチドの局在性のうち1種または複数を示し得る。このような植物は、コードされるポリペプチドの発現以外の1種または複数の望ましい形質をさらに有し得る。このような形質は、例えば：昆虫、その他の有害生物および疾患を引き起こす物質に対する抵抗性；除草剤に対する耐性；増強された安定性、収率または有効期間；環境耐性；薬剤製造；工業製品製造；および栄養強化を含み得る。

【0105】

本発明のトランスジェニック植物は、本発明の核酸分子を用いて形質転換され得る任意の植物であり得る。したがって、植物は、双子葉植物または単子葉植物であり得る。本方法において使用可能な双子葉類植物の限定されない例として、アラビドプシス属、アルファルファ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、ワタ、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウマメ、コショウ、ピーナッツ、ジャガイモ、カボチャ (pumpkin)、ラディッシュ、ナタネ、ホウレンソウ、ダイズ、カボチャ (squash)、サトウダイコン、ヒマワリ、タバコ、トマトおよびスイカが挙げられる。本方法において使用可能な単子葉類植物の限定されない例として、トウモロコシ、アブラナ属、タマネギ、コメ、ソルガム、コムギ、ライムギ、アワ、サトウキビ、カラスムギ、ライコムギ、スイッチグラスおよびシバクサが挙げられる。本発明のトランスジェニック植物は、任意の方法で使用または栽培され得る。

【0106】

いくつかの実施形態はまた、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードする1種または複数のヌクレオチド配列を含有する商品生産物、例えば、1種または複数のこのようなヌクレオチド配列を含有する組換え植物または種子から製造される商品生産物を提供する。少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードする1種または複数のヌクレオチド配列を含有する商品生産物として、例えば、限定するものではないが、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードする1種または複数のヌクレオチド配列を含む、食品、食事、油または破碎された穀類もしくは全粒または植物の種子が挙げられる。1種または複数の商品または商品生産物における少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードする1種または複数のヌクレオチド配列の検出は、商品または商品生産物が、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードする1種または複数のヌクレオチド配列を含む植物から、少なくとも幾分かは製造されたという事実上の証拠である。特定の実施形態では、本発明の商品生産物は、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードする核酸配列の検出可能な量を含む。いくつかの実施形態では、このような商品生産物は、例えば、トランスジェニック植物を得ることおよびそれから食物または餌を調製することによって製造され得る。

【0107】

いくつかの実施形態では、少なくとも1種の合成アブラナ属由来CTPを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含むトランスジェニック植物、再生不可能な植物細胞または種子はまた、限定するものではないが、iRNA分子；殺虫性タンパク質（例えば、バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) 殺虫性タンパク質）をコードする遺伝子；除草剤耐性遺伝子（例えば、グリホサートに対する耐性を提供する遺伝子）；およびトランスジェニック植物において望ましい表現型（例えば、増大した収量、変更された脂肪酸代謝または細胞質雄性不稔の回復）に貢献する遺伝子が転写されるトランスジェニック事象を含めた、少なくとも1種のその他のトランスジェニック事象を、そのゲノム中に含み得る。

【0108】

VII. プラスチドへの、遺伝子産物の合成アブラナ属由来葉緑体輸送ペプチド媒介性局在

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態は、プラスチド（例えば、葉緑体）への遺伝子産物の発現および／または局在のための方法を提供する。特定の実施形態では、遺伝子産物は、マーカー遺伝子産物、例えば、蛍光分子であり得る。合成アブラナ属由来C T Pを含むポリペプチドの一部としての遺伝子産物の発現は、特定の合成アブラナ属由来C T P配列のプラスチド局在能を評価するためのシステムを提供し得る。いくつかの実施形態では、合成アブラナ属由来C T Pを含有するポリペプチドの一部としてのマーカー遺伝子産物の発現は、マーカー遺伝子産物の発現を、ポリペプチドが発現される細胞のプラスチドにターゲティングするために使用される。特定の実施形態では、このようなマーカー遺伝子産物は、宿主細胞のプラスチド（複数可）に局在している。例えば、マーカー遺伝子産物は、プラスチド（複数可）において、宿主細胞のサイトゾルまたはその他のオルガネラよりも高レベルで発現され得るか；マーカー遺伝子産物は、本質的にプラスチド（複数可）のみにて発現され得るか；またはマーカー遺伝子産物は、サイトゾルまたは非プラスチドオルガネラにおける発現が検出され得ないよう、プラスチド（複数可）において完全に発現され得る。

10

【0109】

いくつかの実施形態では、マーカー遺伝子産物と作動可能に連結している、合成アブラナ属由来C T Pの機能的変異体を含むポリペプチドは、機能的変異体ペプチドの特徴を評価するために使用される。例えば、合成アブラナ属由来C T Pの配列は、例えば、少なくとも1つの保存的突然変異を合成アブラナ属由来C T P中に導入することによって変更され得、得られた変異体ペプチドは、マーカー遺伝子産物に連結され得る。適した宿主細胞（例えば、発現構築物中の1つまたは複数の調節エレメントが作動可能である細胞）における発現後、マーカー遺伝子産物の発現が決定され得る。参照合成アブラナ属由来C T P—マーカー構築物と変異体ペプチド—マーカー構築物間のマーカー遺伝子産物の細胞内局在性を比較することによって、変異体ペプチドが、例えば、より大きなプラスチド局在性を提供するか、または実質的に同一のプラスチド局在性を提供するかどうか決定され得る。このような変異体は、機能的変異体と考えられ得る。より大きなプラスチド（plastic）局在性を提供する合成アブラナ属由来C T Pの機能的変異体を同定することによって、このような変異体における突然変異が、合成アブラナ属由来C T Pのさらなる変異体に組み込まれ得る。この評価プロセスの複数ラウンドを実施すること、続いて、同定された好都合な突然変異を合成アブラナ属由来C T P配列に組み込むことは、合成アブラナ属由来C T P配列の最適化のための反復プロセスをもたらし得る。このような最適化された合成アブラナ属由来C T P配列およびそれをコードするヌクレオチド配列は、このような最適化された合成アブラナ属由来C T P配列が、さらなる突然変異によってさらに最適化され得るか否かにかかわらず、本発明の一部と考えられる。

20

30

【0110】

本明細書で議論される参考文献は、単に、本願の出願日に先立つその開示のために提供される。本明細書において、先行発明のために、本発明者らがこのような開示に先行する権利がないという承認と解釈されるべきものはない。

【0111】

以下の実施例は、特定の個々の特徴および／または態様を例示するために提供される。これらの実施例は、本開示を、記載される個々の特徴または態様に制限すると解釈されてはならない。

40

（実施例）

【実施例1】

【0112】

キメラ葉緑体輸送ペプチド（T r a P）配列の設計および生成

プラスチドは、高等植物種に見出される細胞小器官であり、すべての植物組織中に存在する。葉緑体は、本質的な生理機能に参与している緑色の光合成組織に見られる特定のタイプのプラスチドである。例えば、このような1つの主要な生理機能は、植物に必要とされる芳香族アミノ酸の合成である。核コードされた酵素は、この生合成経路に必要とされ

50

、細胞質から葉緑体の内部に輸送される。これらの核コードされた酵素は、通常、葉緑体のストロマへのペプチド輸送を促進するために、葉緑体の膜と相互作用するN末端輸送ペプチドを有する。Bruce B. (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function, and evolution. Trends Cell Bio. 10: 440-447。取り込み時に、間質ペプチダーゼは輸送ペプチドを切断し、葉緑体に取り込まれた成熟機能性タンパク質を残す。Richter S, Lamppa GK. (1999) Stromal processing peptidase binds transit peptides and initiates their ATP-dependent turnover in chloroplasts. Journ. Cell Bio. 147: 33-43。葉緑体輸送ペプチドは、長さ、組成および機構において高度に分岐している可変配列である。Bruce B. (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function, and evolution. Trends Cell Bio. 10: 440-447。葉緑体輸送ペプチドの配列類似性は、異なる植物種由来の相同タンパク質間で有意に分岐する。異なる植物種から得られた相同タンパク質は、プロセッシングされた成熟機能性タンパク質を比較する場合、典型的に、比較的高レベルの配列類似性を共有することを考慮すると、葉緑体輸送ペプチド間の分岐量は予期されない。

10

【0113】

新規なキメラ葉緑体輸送ペプチド配列を設計し、生成し、in plantaにおいて試験した。新規なキメラ葉緑体輸送ペプチドは、葉緑体内への農学的に重要なタンパク質の取り込みのための効果的な移行およびプロセッシング特性を有することが示された。最初に、異なる植物種由来の天然の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ (EPSPS) タンパク質配列は、<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>にて利用可能なChloroP (商標) コンピュータプログラムを介して分析され、推定上の葉緑体輸送ペプチド配列を同定した (Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G, (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites, Protein Science 8; 978-984)。天然の葉緑体輸送ペプチドを同定した後、第1の葉緑体輸送ペプチド配列を第2の生物由来の第2の葉緑体輸送ペプチド配列と整列させた。図17は、セイヨウアブラナ (Brassica napus) (NCBI受託番号: P17688) およびブラシカ・ラパ (Brassica rapa) (NCBI受託番号 AAS80163) のEPSPS葉緑体輸送ペプチド配列のアラインメントを示す。葉緑体輸送ペプチド配列アラインメントを利用して、新規なキメラ葉緑体輸送ペプチドは、およそ1:1の比率で、第1の生物由来の葉緑体輸送ペプチド配列の第1の半分と、第2の生物由来の葉緑体輸送ペプチド配列の第2の半分の組み合わせることによって設計された。新たに設計されたキメラ葉緑体輸送ペプチドの例示的な配列は、Trap8 (配列番号3) およびTrap9 (配列番号4) である。これらの新規なキメラ葉緑体輸送ペプチド配列は、セイヨウアブラナ (Brassica napus) [ATCC受託番号: P17688] およびブラシカ・ラパ (Brassica rapa) [ATCC受託番号 AAS80163] のEPSPSタンパク質由来である。Trap8 (配列番号3) キメラ葉緑体輸送ペプチド配列はセイヨウアブラナ (Brassica napus) 由来であるN末端を含み、葉緑体輸送ペプチドのC末端はブラシカ・ラパ (Brassica rapa) 由来である。Trap9 (配列番号4) 葉緑体輸送ペプチド配列はブラシカ・ラパ (Brassica rapa) 由来であるN末端を含み、葉緑体輸送ペプチドのC末端はセイヨウアブラナ (Brassica napus) 由来である。キメラ葉緑体輸送ペプチドは、一過性in planta発現システムを含む複数のアッセイを介して、農学的に重要な導入遺伝子配列に融合された遺伝子発現エレメントを含む安定な形質転換事象として遺伝子導入的に試験された。

20

30

40

【実施例2】

【0114】

キメラ葉緑体輸送ペプチド (Trap) 配列の一過性in planta試験
タバコ一過性アッセイ:

最初に、一過性in plantaアッセイを介して、Trap8およびTrap9のキメラ葉緑体輸送ペプチド配列を試験した。Trap8 (配列番号5) およびTrap9 (配列番号6) のキメラ葉緑体輸送ペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を合

50

成した。リンカー配列（配列番号7）をT r a P配列とy f pコード配列間に組み込んだ。得られた構築物は2つの植物転写単位（P T U）を含有した。第1のP T Uは、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）ユビキチン10プロモーター（A t U b i 10プロモーター；Callis, et al, (1990) J. Biol. Chem., 265: 12486-12493）、T r a P-黄色蛍光タンパク質融合遺伝子（T r a P-Y F P；米国特許出願公開第2007/0298412号）、およびアグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）O R F 23 3'非翻訳領域（A t u O R F 23 3' U T R；米国特許第5,428,147号）で構成された。第2のP T Uは、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター（C s V M Vプロモーター；Verdaguer et al, (1996) Plant Molecular Biology, 31: 1129-1139）、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ（P A T；Wohlleben et al., (1988) Gene, 70: 25-37）、およびアグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）O R F 1 3'非翻訳領域（A t u O R F 1 3' U T R；Huang et al, (1990) J. Bacteriol, 172: 1814-1822）で構成された。構築物p D A B 101977は、T r a P 8のキメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図2）。構築物p D A B 101978は、T r a P 9のキメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する。y f p遺伝子の5'上流に葉緑体輸送ペプチド配列を含んでいなかった対照プラスミド、101908は、構築され、研究に含まれていた（図3）。構築物を制限酵素消化および配列決定を介して確認した。最後に、構築物をアグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）に形質転換し、グリセロールストックとして保存した。

【0115】

アグロバクテリウムグリセロールストックから、凍結培養物で満ちたループを14mlの滅菌チューブ中のY P D（100 μ g/ml スペクチノマイシン）の2mlに接種した。接種した培地を200 rpmで振とうしながら、28℃にて一晩インキュベートした。翌日、約100 μ lの培養物を用いて、125mlの滅菌したトリバッフル付きフラスコ中に25mlのY P D（100 μ g/ml スペクチノマイシン）を接種し、200 rpmで振とうしながら一晩28℃にて一晩インキュベートした。翌日、滅菌d d H₂O（pH 8.0）中でO D₆₀₀が0.5になるまで培養物を希釈した。希釈されたアグロバクテリウム株は、1:1の比率でP19ヘルパータンパク質を含有する第2のアグロバクテリウム株と混合した。培養物は、Voinnet O, Rivas S, Mestre P, and Baulcombe D., (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the pi9 protein of tomato bushy stunt virus, The Plant Journal, 33: 949-956の方法を介して、タバコ葉浸潤に使用された。浸潤されたタバコ植物は、アッセイするまで、少なくとも3日間、24℃にて16時間の光に設定されたC o n v i r o n（商標）に置かれた。

【0116】

顕微鏡の結果：

アグロバクテリウム浸潤したタバコの葉を植物から切断し、脱水を防ぐために水とともにペトリ皿に入れた。浸潤したタバコの葉は、Y F Pレポータータンパク質を首尾よく発現している葉の損傷がない領域を同定するために、Dark Reader Hand Lamp（商標）（Clare Chemical Research Co.；Dolores, CO）を用いて、適所に保持されたロングパスフィルターガラスを用いた青色光励起下で観察された。具体的に同定された葉の領域は葉から切断され、共焦点顕微鏡（Leica TCS-SP5 AOBs（商標）；Buffalo Grove, IL）による画像化のために水中でマウントされた。Y F Pレポータータンパク質は、マルチラインアルゴンイオンレーザーを用いて、514nmのレーザー線で励起した。検出スリットの幅は、バックグラウンドの葉の自己蛍光を排除するために、非発現（暗）対照の葉試料を用いて調整された。クロロフィルの自己蛍光は、葉緑体の局在を決定するための蛍光レポータータンパク質シグナルとの直接比較のために第2のチャンネルに同時に回収された。

【0117】

顕微鏡撮像の結果は、T r a P 8またはT r a P 9の葉緑体輸送ペプチドを含むY F P 蛍光タンパク質が、タバコ細胞の細胞質の葉緑体に移行しなかった対照Y F P 蛍光タンパク質と比較して、タバコ細胞の細胞質に位置した葉緑体内に蓄積したことを示した（図4および図5）。これらの顕微鏡撮像の結果は、葉緑体へのY F Pタンパク質の移行が、T r a P 8またはT r a P 9の葉緑体輸送ペプチドの結果であったことを示唆している。図5および図6に示すように、Y F P 蛍光シグナルは、顕微鏡撮像条件下での自己蛍光に起因して、赤色蛍光も発する葉緑体に局在する。比較的に、図7は、葉緑体輸送ペプチドを含まない対照構築物p D A B 1 0 1 9 0 8で浸潤されたタバコ葉組織の顕微鏡画像を与える。この画像内の葉緑体は、顕微鏡撮像条件下で自己蛍光に起因して、赤色蛍光だけを発し、T r a P 浸潤されたタバコ細胞において示されるいずれものY F P 蛍光シグナルを欠いている。むしろ、対照タバコ植物細胞におけるY F P 蛍光シグナルは、タバコ植物細胞の細胞質全体に拡散的に発現される。

10

【0118】

ウエスタンブロットの結果：

浸潤したタバコ植物の試料をウエスタンブロッティングを介してアッセイした。リーフパンチを収集し、ビーズミルに供した。約100～200mgの葉材料は、K l e c o（商標）ビーズミル中で3分間、2 B B（鋼球）（D a i s y；R o g e r s、A R）および500mlのP B S Tと混合された。次に、試料を14,000×g、4℃にて遠心機でスピンドウンした。上清を除去し、ウエスタンブロットまたは免疫沈降のいずれかを介して直接分析した。製造業者のプロトコールに従って、P i e r c e D i r e c t I Pキット（商標）（T h e r m o S c i e n t i f i c；R o c k f o r d、I L）を用いて免疫沈降を行った。およそ50μgの抗Y F Pを樹脂に結合させた。試料を樹脂とともに一晩、4℃にてインキュベートした。次に、試料を洗浄し、翌朝溶出した。等量の2×8M尿素試料緩衝液を合わせ、その後、試料を5分間煮沸することによって分析用に準備した。M O P S緩衝液中の4～12% S D S－B i s T r i sゲル上で煮沸試料を40分間泳動した。次に、製造業者のプロトコールに従って、I n v i t r o g e n i B l o t（商標）（L i f e T e c h n o l o g i e s；C a r l s b a d、C A）を用いてゲルをブロットした。ブロットしたメンブレンをP B S－T w e e n溶液中の5%脱脂粉乳を用いて10分間ブロックした。P B S－T w e e n溶液中の5%脱脂粉乳で1：1000希釈で使用した一次抗体（ウサギのモノクローナル抗G F P）を用いてメンブレンを1時間探査した。次に、すべての未結合の一次抗体を除くために、P B S－T w e e nを用いて5分間3回、メンブレンを濯いだ。1：1000希釈で使用したヤギの二次モノクローナル抗ウサギ抗体（L i f e T e c h n o l o g i e s）を用いてメンブレンを60分間探査した。メンブレンを上記に記載の通りに洗浄し、T h e m o B C I P／N B T基質を添加することによって発色させた。比色基質は、5～10分間発色させ、続いて、乾燥させる前にブロットを水で濯いだ。

20

30

【0119】

ウエスタンブロットの結果は、Y F Pタンパク質が浸潤したタバコ細胞で発現したことを示した。p D A B 1 0 1 9 7 7とp D A B 1 0 1 9 7 8浸潤したタバコ植物葉組織はともに、Y F P抗体に反応したタンパク質バンドの存在によって示されるように、Y F Pタンパク質を発現し、Y F P対照構築物で浸潤されたタバコ植物葉組織から得られたY F Pタンパク質バンドと大きさにおいて同等であった。さらに、これらの結果は、T r a Pキメラ葉緑体輸送ペプチドがプロセシングされ、Y F Pタンパク質から切断されたことを示した。T r a p 8－Y F PおよびT r a p 9－Y F P構築物は、対照Y F Pタンパク質よりも分子量が大きい事前にプロセシングされたタンパク質バンドを発現する。対照Y F Pとサイズにおいて同等であるウエスタンブロット上のバンドの存在は、T r a P 8とT r a P 9の葉緑体輸送ペプチド配列がプロセシングされ、それによって、Y F P対照と同等である分子量の大きさにY F Pの大きさを小さくしたことを示す。

40

【0120】

トウモロコシプロトプラスト一過性アッセイ：

50

T r a P 8 キメラ葉緑体輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号 5）とリンカーをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号 7）は、黄色蛍光タンパク質遺伝子上流にクローニングされ、トウモロコシプロトプラストの一過性 i n p l a n t a アッセイを介した試験のために構築物 p D A B 1 0 6 5 9 7（図 7）に組み込まれた。得られた構築物は、単一の植物転写単位（P T U）を含有した。P T Uは、トウモロコシ（Zea mays）ユビキチン 1 プロモーター（Z m U b i 1 プロモーター；Christensen, A., Sharrock R., and Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, Plant Molecular Biology, 18: 675-689）、T r a P-黄色蛍光タンパク質融合遺伝子（T r a P 8-Y F P；米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 9 8 4 1 2 号）、およびトウモロコシ（Zea mays）ペルオキシダーゼ 5 3' 非翻訳領域（Z m P e r 5 3' U T R；米国特許第 6 3 8 4 2 0 7 号）で構成された。制限酵素消化および配列決定を介して構築物を確認した。

【0121】

トウモロコシ（Zea mays）変種 B 1 0 4 の種子は、2～3 滴の T w e e n 2 0 を含む 5 0 % C l o r o x（3 % 次亜塩素酸ナトリウム）中で、約 2 0 分間激しく振とうすることによって表面を滅菌した。種子を滅菌蒸留水で十分に濯いだ。無菌種子は、P h y t a t r a y または類似タイプのボックス中で 1 / 2 M S 培地に播種され、暗所（2 8 °C）にて 1 2 ～ 2 0 日間成長させた。トウモロコシプロトプラスト一過性アッセイを用いて、B 1 0 4-トウモロコシの葉からのトウモロコシプロトプラストを得てトランスフェクトした。このトウモロコシプロトプラストアッセイは、Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J., (2007), Arabidopsis Mesophyll Protoplasts: A Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis, Nature Protocols, 2: 1565-1572 によって記載されているシステムの変法である。溶液を Yoo ら（2007）によって記載されるように調製したが、以下の実験に使用したマンニトール濃度を 0. 6 M に変更したことを除く。

【0122】

1 0 0 ～ 5 0 0 μ l のプロトプラスト（ $1-5 \times 10^5$ ）のトランスフェクションは、室温にて、約 4 0 μ g のプラスミド DNA（p D A B 1 0 6 5 9 7）を含む 2 m l の微量遠心管にプロトプラストを添加することによって完了した。DNA の体積は、好ましくは、プロトプラストの体積の約 1 0 % に維持された。プロトプラストおよび DNA は、時々、5 分間のインキュベーション期間中に混合された。等体積の P E G 溶液を 1 回につき 2 滴、プロトプラストと DNA にゆっくりと添加し、P E G 溶液の液滴の添加間に混合した。チューブは、時々穏やかに混合しながら約 1 0 分間インキュベートした。次に、1 m l の W 5 + 溶液を添加し、チューブを数回反転させることによって混合した。チューブ（複数可）を 4 °C の温度にて 7 5 × g で 5 分間遠心分離した。最後に、上清を除去し、ペレットを 1 m l の W I 溶液に再懸濁し、プロトプラストを小さなペトリ皿（3 5 × 1 0 m m）または 6 ウェルのマルチウェルプレート中に置き、一晩、暗所にて室温でインキュベートした。Y F P の蛍光を、1 2 時間のインキュベーション後に顕微鏡で観察した。前述した顕微鏡の条件を撮像のために使用した。

【0123】

顕微鏡撮像の結果は、T r a P 8 キメラ葉緑体輸送ペプチドを含む Y F P 蛍光タンパク質が、トウモロコシ細胞の細胞質の葉緑体内に移行しない対照 Y F P 蛍光タンパク質と比較して、トウモロコシ細胞の細胞質に位置する葉緑体に蓄積されたことを示した（図 8）。これらの顕微鏡撮像の結果は、葉緑体への Y F P タンパク質の移行が、T r a P 8 のキメラ葉緑体輸送ペプチドの結果であったことを示唆している。

【実施例 3】

【0124】

アラビドプシス属における農学的に重要な導入遺伝子の発現のためのキメラ葉緑体輸送ペプチド（T r a P）配列

大腸菌（Escherichia coli）の 5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸シンターゼ酵

10

20

30

40

50

素（E P S Pシンターゼ）における1アミノ酸突然変異（G 9 6 A）は、グリホサート非感受性をもたらすことができる（Padgett et al, (1991); Eschenburg et al., (2002); Priestman et al, (2005); Haghani et al, (2008)）。この突然変異はグリホサートに対する耐性を付与するが、その天然基質であるホスホエノールピルビン酸（P E P）によるE P S Pシンターゼの結合に悪影響を及ぼすことも知られている。基質結合効率において生じた変化は、グリホサートに対するin plantaにおける耐性を提供するために、突然変異した酵素を不適当なものにし得る。

【0125】

E P S Pシンターゼ酵素内の、該酵素の大腸菌（E.coli）バージョンに導入したG 9 6 A突然変異と類似した位置でアラニンを天然に含有するE P S Pシンターゼタンパク質配列とポリヌクレオチド配列についてインシリコにおいてNCBI Genbankデータベースをスクリーニングした（Padgett et al, (1991); Eschenburg et al, (2002); Priestman et al, (2005); Haghani et al, (2008)）。

【0126】

この位置で天然のアラニンを含むことが同定された1つの酵素は、ストレプトマイセス・スピセウス（Streptomyces svaceus）ATCC 29083由来のDGT-28（GENBANK受託番号：ZP_06917240.1）であった。さらに、インシリコのデータマイニングは、DGT-28；DGT-31（GENBANK受託番号：YP_004922608.1）；DGT-32（GENBANK受託番号：ZP_04696613）；およびDGT-33（GENBANK受託番号：NC_010572）により高い相同性を有する3つの他の固有のストレプトマイセス酵素を示した。これらの酵素のそれぞれは、E P S Pシンターゼ酵素内の、該酵素の大腸菌（E.coli）バージョンに導入されたG 9 6 A突然変異と類似した位置で天然のアラニンを含有する。図1。

【0127】

異なる生物由来のE P S Pシンターゼタンパク質は長さが異なるため、E P S Pシンターゼ酵素の大腸菌（E.coli）バージョンの突然変異の番号付けは、他の生物由来のE P S Pシンターゼ酵素の突然変異の番号付けと必ずしも対応しない。これらの同定されたE P S Pシンターゼ酵素は、グリホサート耐性またはP E P基質親和性に関して従前特徴付けられていなかった。さらに、これらのE P S Pシンターゼ酵素は、E P S Pシンターゼ酵素の新しいクラスを表し、前述のクラスI（米国再発行特許第39247号にさらに記載されている植物由来の配列）、II（米国再発行特許第39247号にさらに記載されている細菌由来の配列）、およびIII（国際特許出願WO 2006/110586にさらに記載されている細菌由来の配列）のE P S Pシンターゼ酵素を特徴付けるために使用されているいずれもの配列モチーフを含まない。

【0128】

新規なDGT-14、DGT-28、DGT-31、DGT-32、およびDGT-33酵素は、クラスIのE P S Pシンターゼ酵素と比較することによって、グリホサート耐性およびP E P基質親和性について特徴付けられた。以下のクラスIの酵素；ダイズ（Glycine max）由来のDGT-1、セイヨウアブラナ（Brassica napus）由来のDGT-3（GENBANK受託番号：P17688）、およびコムギ（Triticum aestivum）由来のDGT-7（GENBANK受託番号：EU977181）は比較のためのものであった。クラスIのE P S Pシンターゼ酵素およびその変異改変体を合成し、評価した。植物E P S Pシンターゼ酵素に導入された突然変異は、酵素の大腸菌（E.coli）バージョン由来のG 9 6 A突然変異と同様の位置で、E P S Pシンターゼ酵素内でなされたグリシンからアラニンへの突然変異からなっていた。さらに、トレオニンからイソロイシンおよびプロリンからセリンの突然変異は、Funke et al., (2009)において記載されているように、大腸菌（E.coli）のE P S Pシンターゼにおけるアミノ酸97（TからI）とアミノ酸101（PからS）の突然変異と類似した位置で、これらのクラスIのE P S Pシンターゼ酵素内に導入された。

【0129】

D G T 1 4 :

d g t - 1 4 導入遺伝子と融合された T r a P 8 および T r a P 9 キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有するトランスジェニック T₁ アラビドプシス属植物を、Clough and Bent (1998), Plant J. 16:735-743からのフローラルディップ (floral dip) 法を使用して製造した。トランスジェニックアラビドプシス属植物を入手し、分子確認によって、導入遺伝子を含有すると確認した。トランスジェニック植物は、異なる比率のグリホサートで噴霧された。増加した比率を含む様々な濃度のグリホサート比率の分布は、抵抗性の相対レベル (105、420、1、680、または3、360 g a e / h a) を決定するために、この研究において適用された。グリホサートの典型的な1×フィールド使用率は1、120 g a e / h aである。この研究で使用した T₁ アラビドプシス属植物は、d g t - 1 4 導入遺伝子のコピー数において変動した。低コピー数の d g t - 1 4 T₁ アラビドプシス属植物は、分子確認アッセイを用いて同定され、自家受粉し、使用して、T₂ 植物を作製した。表1は、グリホサート除草剤抵抗性遺伝子である d g t - 1 (米国特許出願番号12558351に記載されている) を含む対照植物と比較して、d g t - 1 4 トランスジェニック植物に対する抵抗性を示す。

【0130】

アラビドプシス属 T₁ 形質転換体は、最初に、グルホシネート選択スキームを使用して、非形質転換種子のバックグラウンドから選択された。3フラット、または30、000個の種子をそれぞれの T₁ 構築物について分析した。選択された T₁ 植物は分子的に特徴付けられ、該植物は、その後、個別のポットに移植され、前述のように、様々な比率の市販のグリホサートで噴霧された。これらの植物の用量反応は、処置から2週間後 (W A T)、視覚的損傷%の観点から提示される。損傷がほとんどないもしくは全くない (<20%)、中程度の損傷 (20~40%)、または重度の損傷 (>40%) を提示する個々の植物を示すデータが、下記の表に示されている。算術平均および標準偏差は、アラビドプシス属形質転換のために使用されるそれぞれの構築物について提示される。個別の応答における範囲もまた、それぞれの比率および形質転換に関して、最後の列に示されている。野生型、非形質転換アラビドプシス属 (栽培品種コロンビア) は、グリホサート感受性対照として用いた。

【0131】

植物応答のレベルは T₁ アラビドプシス属植物において変化した。この差異は、それぞれの植物が独立した形質転換事象を表すという事実起因することができ、したがって、対象とする遺伝子のコピー数は、植物ごとに変動する。比率による全体的な集団の損傷平均は表1に示され、様々な比率のグリホサートに対して、T r a P 8 v 2 または T r a P 9 v 2 の葉緑体輸送ペプチド対 d g t - 1 および非形質転換の野生型対照と連結された d g t - 1 4 構築物のそれぞれによって提供される耐性を実証する。事象は、構築物 p D A B 1 0 5 5 2 6 (図9) に含まれる T r a P 8 v 2 (配列番号8) および構築物 p D A B 1 0 5 5 2 7 (図10) に含まれる T r a P 9 v 2 (配列番号9) と連結された d g t - 1 4 を含有した。T₁ 植物のグリホサート選択からのデータは、d g t - 1 4 がこれらの葉緑体輸送ペプチドと連結された場合、高レベルのグリホサートに対する強固な耐性が提供されたことを実証した。比較的に、非形質転換 (または野生型) 対照は、類似した比率のグリホサートで処理したとき、高濃度のグリホサートの処理に対して耐性を提供しなかった。さらに、d g t - 1 4 の3つ以上のコピーを含有することが示された事象が、増大した比率のグリホサートに対してより感受性である例があった。これらの例は、表1に示される視覚的な損傷範囲の割合内で実証される。アラビドプシス属植物内での高いコピー数の導入遺伝子の存在が、d g t - 1 4 導入遺伝子の存在にもかかわらず、導入遺伝子サイレンシングまたはグリホサートに対する感受性をもたらす他のエピジェネティックな効果をもたらす可能性がある。

【0132】

【表 1】

表 1. *dgt-1*(T_2)分離集団および非形質転換対照と比較した、発芽後適用されたある範囲のグリホサート比率に対する、*dgt-14* 形質転換された T_1 アラビドプシス属の応答。適用から 2 週間後の視覚的損傷%。

TraP8 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105526)						
損傷範囲% (再現数)				損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	0	2	2	40.0	14.1	20-50
420 g ae/ha グリホサート	3	0	1	23.8	31.5	0-70
1680 g ae/ha グリホサート	0	1	3	66.3	28.4	25-85
3360 g ae/ha グリホサート	3	0	1	26.5	42.5	0-90

TraP9 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105527)						
損傷範囲% (再現数)				損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	2	1	1	23.0	25.7	0-50
420 g ae/ha グリホサート	2	0	2	37.5	37.7	0-70
1680 g ae/ha グリホサート	2	0	2	48.8	39.0	15-85
3360 g ae/ha グリホサート	1	0	3	63.8	39.2	5-85

<i>dgt-1</i> (pDAB3759)						
損傷範囲% (再現数)				損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	0	3	1	40.0	14.1	30-60
420 g ae/ha グリホサート	0	4	0	30.0	0.0	30
1680 g ae/ha グリホサート	0	3	1	55.0	30.0	40-100
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	57.5	8.7	45-65

非形質転換対照						
損傷範囲% (再現数)				損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
420 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100

【0133】

導入遺伝子の挿入物の低コピー数（1～3コピー）を含むことが同定された、選択された T_1 アラビドプシス属植物は、グリホサート耐性のさらなる評価のために自家受粉され、第2世代を生成した。*TraP8*と*TraP9*のキメラ葉緑体輸送ペプチドに融合した1～3コピーの*dgt-14*導入遺伝子を含んだ第2世代のアラビドプシス属植物（ T_2 ）は、グリホサート耐性およびグルホシネート耐性についてさらに特徴付けられた（グルホシネート抵抗性は、PAT発現カセットが無傷であり、 T_1 植物の自殖の際に再配列を受けなかったことを示した）。 T_2 世代において、ヘミ接合およびホモ接合植物は、それぞれの事象についての試験に利用可能であり、したがって、試験されたそれぞれの比率の

グリホサートに含まれた。ヘミ接合植物は、遺伝子座で同じ2つの対立遺伝子を含むホモ接合植物と比較して、遺伝子座で2つの異なる対立遺伝子を含む。T₂植物のコピー数と倍数性レベルは、分子分析プロトコルを用いて確認された。同様に、グリホサートは、前述のような方法および比率を用いて適用された。植物の用量反応は、処置から2週間後(WAT)、視覚的損傷%に関して示される。データは、損傷がほとんどないもしくは全くない(<20%)、中程度の損傷(20~40%)、または重度の損傷(>40%)を提示する個体のヒストグラムとして示される。算術平均および標準偏差は、アラビドプシス属形質転換のために使用される各構築物について提示されている。個別の応答における範囲もまた、それぞれの比率および形質転換に関して、最後の列に示される。野生型、非形質転換アラビドプシス属(栽培品種コロンビア)は、グリホサート感受性対照として用いた。さらに、グリホサート除草剤抵抗性遺伝子であるdgt-1(米国特許出願番号12558351に記載されている)を含む植物を正の対照として含めた。

10

【0134】

T₂世代では、単一コピーおよび低コピー(2または3コピー)のdgt-14事象の両方がグリホサート耐性について特徴付けられた。比率による全体的な集団の損傷平均は表2に示され、様々な比率のグリホサートに対して、葉緑体輸送ペプチド対dgt-1および非形質転換の野生型対照と連結されたdgt-14構築物のそれぞれによって提供される耐性を実証する。T₂世代の事象は、Trap8-v2(pDAB105526)およびTrap9-v2(pDAB105527)と連結されたdgt-14を含有した。これらの事象の両方は、グリホサートに対して非常に抵抗性である。結果は、T₂アラビドプシス属植物についての損傷範囲が、試験されたグリホサートのすべての濃度について20%未満であったことを示した。比較的に、非形質転換(または野生型)対照は、類似した比率のグリホサートで処理したとき、高濃度のグリホサートの処理に対して耐性を提供しなかった。全体的に、結果は、Trap8とTrap9のキメラ輸送ペプチドタンパク質に融合したDGT-14を含み、発現する植物が、フィールド比率の最大3倍(1120g a e/h a)のレベルにグリホサートに対する市販レベルの抵抗性をもたらしたことを示した。

20

【0135】

【表 2】

表 2. *dgt-1*(T₂)分離集団および非形質転換対照と比較した、発芽してから成熟するまでに適用されたある範囲のグリホサート比率に対する *dgt-14* で形質転換された T₂アラビドプシス属の応答。適用から 2 週間後の視覚的損傷%。データは、遺伝スクリーニングにおける単一の遺伝座として分離されたそれぞれの構築物由来の選択された 1 コピー株を表す。

TraP8 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105526)		損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.5	1.0	0-2
840 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha グリホサート		4	0	0	2.5	2.9	0-5
3360 g ae/ha グリホサート		4	0	0	5.0	4.8	0-10
TraP9 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105527)		損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha グリホサート		4	0	0	1.8	2.4	0-5
3360 g ae/ha グリホサート		2	2	0	17.5	17.6	0-35
<i>dgt-1</i> (pDAB3759)		損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート		2	0	2	40.0	40.4	5-75
840 g ae/ha グリホサート		0	2	2	47.5	31.8	20-75
1680 g ae/ha グリホサート		0	2	2	41.3	23.9	20-70
3360 g ae/ha グリホサート		0	4	0	35.0	0.0	35
非形質転換対照		損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート		0	0	4	100.0	0.0	100
840 g ae/ha グリホサート		0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha グリホサート		0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha グリホサート		0	0	4	100.0	0.0	100

【0136】

導入遺伝子の挿入物の低コピー数（1～3コピー）を含むことが同定された、無作為に

10

20

30

40

50

選択された T_2 アラビドプシス属植物は、グリホサート耐性のさらなる評価のために自家受精され、第3世代を生成した。第3世代(T_3)からのアラビドプシス属種子を植え、先に記載したのと同じプロトコルを用いてグリホサート耐性について評価した。 T_3 世代で試験された事象は、ホモ接合性のそれぞれの系統からの反復を含んでいた(高度な植物のいずれかが導入遺伝子の分離を示したかどうかを識別するためにグルホシネート抵抗性スクリーニングを使用することによって決定された)。これらの事象は、植物がDGT-14タンパク質を発現していることを確認するために、LC-MS-MSによってアッセイされた。グリホサートの比率による全体的な集団の損傷平均に関する T_3 世代の結果は表3に示され、この表は、様々な比率のグリホサートについて、dgt-14構築物のそれぞれが提供するグリホサートに対する耐性を示している。典型的な抵抗性 T_3 事象は、Trap8 v2 (pDAB105526)およびTrap9 v2 (pDAB105527)と連結されたdgt-14を含んでいた。これらの事象の両方は、グリホサートに対して非常に抵抗性である。結果は、 T_3 アラビドプシス属植物についての損傷範囲が、試験されたグリホサートのすべての濃度について20%未満であったことを示した。比較的に、非形質転換(または野生型)対照は、類似した比率のグリホサートで処理したとき、高濃度のグリホサートの処理に対して耐性を提供しなかった。全体的に、結果は、DGT-14を含み、これを発現する植物が、フィールド比率の最大3倍(1120 g a e/h a)のレベルにグリホサートに対する市販レベルの抵抗性をもたらしたことを示した。

10

【0137】

20

【表 3】

表 3. *dgt-1*(T₂)分離集団と非形質転換対照と比較した、発芽してから成熟するまでに適用されたある範囲のグリホサート比率に対する、*dgt-14* 形質転換された T₃ アラビドプシス属の応答。適用から 2 週間後の視覚的損傷%。データは、T₂ 遺伝スクリーニングにおける単一の遺伝座として分離されたそれぞれの構築物由来の選択された 1 コピー集団を表す。

TraP8 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105526)		損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha グリホサート		4	0	0	1.3	2.5	0-5
1680 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
3360 g ae/ha グリホサート		4	0	0	4.0	4.0	2-10
TraP9 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105527)		損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
3360 g ae/ha グリホサート		4	0	0	4.3	1.5	2-5
<i>dgt-1</i> (pDAB3759)		損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート		0	2	2	42.5	9.6	30-50
840 g ae/ha グリホサート		0	4	0	40.0	0.0	40
1680 g ae/ha グリホサート		0	3	1	47.5	15.0	40-70
3360 g ae/ha グリホサート		0	0	4	77.5	17.1	60-100
非形質転換対照		損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート		0	0	4	100.0	0.0	100
840 g ae/ha グリホサート		0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha グリホサート		0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha グリホサート		0	0	4	100.0	0.0	100

【0138】

データは、グリホサート耐性酵素（例えば、DGT-28）の発現は、融合タンパク質

10

20

30

40

50

においてT r a P輸送ペプチドによって植物細胞の葉緑体へターゲティングされる場合に、グリホサート耐性を植物細胞およびこれらの細胞からなる植物体へ付与できることを示す。

【0139】

D G T-28、D G T-31、D G T-32、およびD G T-33：

新たに設計された、双子葉植物の最適化されたd g t-28 v5ポリヌクレオチド配列は配列番号16に列挙されている。新たに設計された、単子葉植物の最適化されたd g t-28 v6ポリヌクレオチド配列は配列番号17に列挙されている：この配列は、制限酵素部位を導入するために、第2のアミノ酸位置でアラニンを含むことによって僅かに改変された。得られたDNA配列は、高度なコドン多様性、所望の塩基組成を有し、戦略的に配置された制限酵素認識部位を含み、遺伝子の転写または生成物mRNAの翻訳を干渉し得る配列を欠損している。

10

【0140】

6個のフレーム終止（コード配列の3'端に追加された全6個のリーディングフレームに位置した終止コドン）およびクローニングのための5'制限部位などの追加配列を含有する配列番号16と配列番号17を含むDNA断片の合成は、商業的供給業者（DAN2.0、Menlo Park, CA）によって行われた。次に、合成核酸分子は、発現ベクターにクローニングされ、以下の実施例に記載されるように、植物または細菌に形質転換された。

【0141】

同様のコドン最適化戦略を用いて、d g t-1、d g t-3 v2（G173A）、d g t-3 v3（G173A；P178S）、d g t-3 v4（T174I；P178S）、d g t-7 v4（T168I；P172S）、d g t-32 v3、d g t-33 v3、およびd g t-31 v3を設計した。これらの遺伝子のコドン最適化バージョンは、それぞれ、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、および配列番号25として列挙されている。

20

【0142】

植物バイナリーベクター構築。標準的なクローニング法は、インフレーム融合としてd g t-28に連結した葉緑体輸送ペプチドポリヌクレオチド配列を含有するエントリーベクターの構築に使用された。d g t-28に融合した輸送ペプチド（T r a P）を含むエントリーベクターは、IN-FUSION（商標）Advantage Technology（Clontech、Mountain View, CA）を用いて組み立てられた。融合の結果として、第1のアミノ酸であるメチオニンをd g t-28から除いた。輸送ペプチドT r a P4 v2（配列番号26）、T r a P5 v2（配列番号27）、T r a P8 v2（配列番号28）、T r a P9 v2（配列番号29）、T r a P12 v2（配列番号30）、およびT r a P13 v2（配列番号31）は、それぞれ、DNA2.0（Menlo Park, CA）によって合成され、最大で固有のAccI制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含むd g t-28の5'端の断片に融合させた。

30

【0143】

様々なT r a Pおよびd g t-28発現カセットを含んだバイナリープラスミドをシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）ユビキチン10プロモーター（A t U b i 10 v2；Callis, et al, (1990) J. Biol. Chem., 265: 12486-12493）によって駆動させ、隣接してアグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）のオープンリーディングフレームの23個の3'非翻訳領域（A t u O R F 23 3' U T R v1；米国特許第5,428,147号）を並べた。

40

【0144】

組み立てられたT r a Pおよびd g t-28発現カセットは、GATEWAY（登録商標）技術（Invitrogen、Carlsbad, CA）を用いて遺伝子操作され、アグロバクテリウムを媒介した植物形質転換を介して植物に形質転換させた。制限エンドヌクレアーゼをNew England Biolabs（NEB；Ipswich, M

50

A) から得て、T4 DNAリガーゼ (Invitrogen) をDNAライゲーションのために使用した。選択マーカーカセットキャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター (CsVMV v2; Verdaguer et al, (1996) Plant Mol. Biol, 31: 1129-1139) -DSM-2 (米国特許出願第2007/086813号) -アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のオープンリーディングフレームの1つの3' 非翻訳領域 (AtuORF1 3' UTR v6; Huang et al, (1990) J. Bacteriol. 172: 1814-1822) を含む単一のデスティネーションベクターに1つのエンターベクターを組み込むことによって、GATEWAY (登録商標) LR CLONASE (登録商標) 酵素ミックス (Invitrogen) を用いてGateway反応を行った。プラスミド調製は、供給業者の指示に従って、NUCLEOSPIN (登録商標) プラスミドキット (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) またはプラスミドMidikit (Qiagen) を用いて行われた。DNA断片は、アガロース、Tris-アセテートゲル電気泳動後、QIAquick (商標) ゲル抽出キット (Qiagen) を用いて単離された。

【0145】

すべての組み立てられたプラスミドのコロニーは、最初に、ミニプレップDNAの制限消化によってスクリーニングされた。選択されたクローンのプラスミドDNAを、市販のシーケンシングベンダー (Eurofins (商標) MWG Operon, Huntsville, AL) によって配列決定された。配列データを組み立て、SEQUENCER (商標) ソフトウェア (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI) を用いて分析した。

【0146】

以下のバイナリー構築物は、様々なTrap: dgt-28融合遺伝子配列を発現する: pDAB107527 (図18) はTrap4 v2: dgt-28 v5 (配列番号32) を含む; pDAB105530 (図19) はTrap5 v2: dgt-28 v5 (配列番号33) を含む; pDAB105531 (図20) はTrap8 v2: dgt-28 v5 (配列番号34) を含む; pDAB105532 (図21) はTrap9 v2: dgt-28 v5 (配列番号35) を含む; pDAB105533 (図22) はTrap12 v2: dgt-28 v5 (配列番号36) を含む; pDAB105534 (図23) はTrap13 v2: dgt-28 v5 (配列番号37) を含む。pDAB105534のdgt-28 v5配列は修飾され、第1のコドン (GCA) を (GCT) に変更した。

【0147】

追加の植物バイナリーベクター構築。上述したものと類似したクローニング戦略を用いて、dgt-31、dgt-32、dgt-33、dgt-1、dgt-3、およびdgt-7を含むバイナリープラスミドを構築した。

【0148】

微生物由来の遺伝子; dgt-31、dgt-32、およびdgt-33は、先に記載したものとは異なる葉緑体輸送ペプチドと融合させた。以下の葉緑体輸送ペプチドを使用した; Trap14 v2 (配列番号38)、Trap23 v2 (配列番号39)、Trap24 v2 (配列番号40)。pDAB107532 (図24) は、Trap14 v2 (配列番号41) に融合させたdgt-32 v3を含み、pDAB107534 (図25) は、Trap24 v2 (配列番号42) と融合させたdgt-33 v3を含み、pDAB107533 (図26) は、Trap23 v2 (配列番号43) に融合させたdgt-31 v3を含む。dgt発現カセットは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ユビキチン10プロモーター (AtUb110プロモーターv2) によって駆動され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のオープンリーディングフレームの23個の3' 非翻訳領域 (AtuORF23 3' UTR v1) を並べた。キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター (CsVMV v2) -DSM-2 -アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)

10

20

30

40

50

のオープンリーディングフレームの1つの3'非翻訳領域 (A t u O R F 1 3' U T R v 6) を含む D S M - 2 選択マーカーカセットもバイナリーベクターに存在した。

【0149】

d g t - 3 1 v 3、d g t - 3 2 v 3、および d g t - 3 3 v 3 が先に記載された葉緑体輸送ペプチド配列に融合している追加のバイナリーを構築する。例えば、T r a P 8 v 2 配列は、d g t - 3 1 v 3、d g t - 3 2 v 3、および d g t - 3 3 v 3 に融合され、上記したバイナリーベクターにクローニングされる。

【0150】

クラス I 遺伝子 (d g t - 1、d g t - 3、および d g t - 7) を含むバイナリーベクターを構築した。以下のバイナリーベクターを構築し、植物に形質転換した：米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 2 4 5 0 3 号に記載されている d g t - 1 v 4 配列を含む p D A B 4 1 0 4 (図 2 7) を米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 6 4 3 7 6 号に記載されているニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) オスモチン配列；p D A B 1 0 2 7 1 5 (図 2 8)；p D A B 1 0 2 7 1 6 (図 2 9)；p D A B 1 0 2 7 1 7 (図 3 0)；および p D A B 1 0 2 7 8 5 (図 3 1) と並べる。d g t - 2 8、d g t - 3 1、d g t - 3 2、および d g t - 3 3 に融合させた様々な T r a P 葉緑体輸送ペプチドは、これらの植物由来の配列は天然の植物葉緑体輸送ペプチドを有するため、クラス I 遺伝子に追加されなかった。これらのベクターは、表 4 においてさらに詳細に記載されている。

【0151】

【表 4】

表 4. クラス I の EPSP シンターゼ遺伝子(すなわち、dgt-1、dgt-3、または dgt-7)を含むバイナリーベクターの説明

名称	説明	EPSPS 突然変異
pDAB 4104	RB7 MAR v2 :: CsVMV プロモーターv2 / NtOsm 5' UTR v2 / dgt-1 v4 / NtOsm 3' UTR v2 / AtuORF24 3' UTR v2 :: AtUbi10 プロモーターv4 / pat v3 / AtuORF1 3'UTR v3 バイナリーベクター	TI PS
pDAB 10271 5	AtUbi10 プロモーターv2 / dgt-3 v2 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV プロモーターv2 / pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 バイナリーベクター	GA
pDAB 10271 6	AtUbi10 プロモーターv2 / dgt-3 v3 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV プロモーターv2 / pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 バイナリーベクター	GA PS
pDAB 10271 7	AtUbi10 プロモーターv2 / dgt-3 v4 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV プロモーターv2 / pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 バイナリーベクター	TI PS
pDAB 10278 5	AtUbi10 プロモーターv2 / dgt-7 v4 / AtuORF23 3'UTR :: CsVMV プロモーターv2 / DSM-2 v2 / AtuORF1 3'UTR v6 バイナリーベクター	TI PS

【0152】

シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) の形質転換。アラビドプシス属は、Clough および Bent (1998) のフローラルディップ法を用いて形質転換された。上記のバイナリープラスミドの1つを含む選択されたアグロバクテリウムコロニーを使用して、スペクチノマイシン (1 0 0 m g / L) およびカナマイシン (5 0 m g / L) を含む Y E P ブロスの1つまたは複数の 1 0 0 m L の前培養物を植菌した。培養物を 2 2 5 r p m で一定に攪拌しながら一晩 2 8 °C にてインキュベートした。細胞を 1 0 分間、室温にて約 5 0 0 0 × g でペレットにし、得られた上清を捨てた。5 % (w / v) スクロース、1 0 μ g / L の 6 - ベンジルアミノプリン、および 0 . 0 4 % S i l w e t (商標) L - 7 7 を含有する 4 0 0 m L の液体培地において穏やかに再懸濁させた。約 1 カ月齢の植物は、穏やかに攪拌しながら 5 ~ 1 0 分間、培地中に浸漬させた。植物は、それらの側面を下に置き、2 ~ 3 時間、透明または不透明なプラスチックバッグで覆い、その後、直立に配置された。植物は、2 2 °C にて 1 6 時間の明 / 8 時間の暗の光周期で成長させた。浸漬から約 4 週間後、種子を回収した。

【0153】

形質転換植物の選択。新たに回収した T_1 種子[dgtとDSM-2発現カセットを含む]を7日間室温にて乾燥させた。 T_1 種子は、 26.5×51 cmの発芽トレイに播種され、それぞれは、予め40 mLの0.1%アガロース溶液に懸濁され、4℃にて2日間保存された、層状にした T_1 種子の200 mgアリコート(約10,000個の種子)を受け、休眠要件を完了し、同期種子発芽を確保した。

【0154】

Sunshine Mix LP5は微細なバーミキュライトで覆われ、湿るまでホーグランド液で地下灌漑され、次に、重力排出を可能にした。層状にした種子のそれぞれ40 mLのアリコートは、ピペットを用いてバーミキュライト上に均一に播種され、4~5日間、湿気ドームで覆われた。ドームは、グルホシネート出芽後噴霧(同時形質転換されたDSM-2遺伝子を選択する)を使用した最初の形質転換体選択の1日前に外された。

【0155】

植え付け後(DAP)7日とさらに11DAPに、 T_1 植物は、適用あたり280 g ai/haグルホシネートの有効比率を達成するために、Devilbiss圧縮空気噴霧チップを用いて、10 mL/トレイ(703 L/ha)の噴霧体積で、Liberty除草剤(200 g ai/Lグルホシネート、Bayer Crop Sciences、Kansas City、MO)の0.2%溶液で噴霧された。生存者(活発に成長している植物)は、最終噴霧から4~7日後に特定され、ポッティングメディア(Metro Mix 360)を用いて調製された3インチ(7.62 cm)のポットに個別に移植された。移植された植物は、3~4日間、湿気ドームで覆われ、前述のように22℃の成長チャンバー内に置かれ、または温室に直接移された。その後、ドームを外し、植物を温室(22±5℃、50±30%RH、14時間の明:10時間の暗、最小500 μ E/m² s⁻¹自然+補助照明)で育てた。分子確認分析は、生存 T_1 植物について完了し、グリホサート耐性遺伝子が植物のゲノムに安定に組み込まれたことを確認した。

【0156】

分子確認。pDAB107527、pDAB105530、pDAB105531、pDAB105532、pDAB105533、またはpDAB105534で形質転換されたアラビドプシス属植物のゲノム内でdgt-28およびDSM-2導入遺伝子の存在が確認された。これらのポリヌクレオチド配列の存在は、加水分解プローブアッセイ、遺伝子発現カセットPCR(植物転写単位PCR—PTU PCRとも記載される)、サザンブロット分析、および定量的逆転写PCR分析によって確認された。

【0157】

T_1 アラビドプシス属植物は、最初に、TAQMAN(商標)に類似した加水分解プローブアッセイを介してスクリーニングされ、DSM-2およびdgt-28導入遺伝子の存在を確認した。事象は、遺伝子発現カセットPCRによりスクリーニングされ、dgt発現カセットが、再配列することなく、植物ゲノムに完全に組み込まれたかどうかを決定した。これらの研究から得られたデータを用いて、自家受精および T_2 世代への進行に関して、導入遺伝子のコピー数を決定し、選択アラビドプシス属事象を同定した。また、進行した T_2 アラビドプシス属植物を加水分解プローブアッセイによりスクリーニングし、植物染色体内にDSM-2遺伝子とdgt遺伝子の存在を確認し、そのコピー数を推定した。最後に、サザンブロットアッセイを用いて、 T_1 アラビドプシス属植物のサブセット上の推定コピー数を確認した。

【0158】

同様のアッセイを用いて、pDAB4101で形質転換された植物由来のdgt-1導入遺伝子の存在、pDAB107532で形質転換された植物由来のdgt-32導入遺伝子の存在、pDAB107534で形質転換された植物由来のdgt-33導入遺伝子の存在、pDAB102715で形質転換された植物由来のdgt-3導入遺伝子の存在、pDAB102716で形質転換された植物由来のdgt-3導入遺伝子の存在、pDAB102717で形質転換された植物由来のdgt-3導入遺伝子の存在、およびpD

AB102785で形質転換された植物由来のdgt-7導入遺伝子の存在を確認した。

【0159】

加水分解プローブアッセイ。後述する加水分解プローブアッセイを用いて、 T_1 と T_2 アラビドプシス属植物におけるコピー数を決定した。様々な数の導入遺伝子を有する植物を同定し、その後のグリホサート耐性研究に進めた。

【0160】

組織試料を96ウェルプレートに回収し、2日間凍結乾燥した。組織浸軟は、KLECO（商標）組織粉碎機とタングステンビーズを用いて実施された（Environ Metal INC.、Sweet Home、Oregon）。組織浸軟後、製造業者が示唆するプロトコールに従って、Biosprint（商標）96植物キット（Qiagen（商標）、Germantown、MD）を用いて、ハイスループット形式でゲノムDNAを単離した。ゲノムDNAをQUANT-IT（商標）PICO GREEN DNAアッセイキット（Molecular Probes、Invitrogen、Carlsbad、CA）によって定量した。定量されたゲノムDNAは、BIOROBOT3000（商標）自動化液体ハンドラー（Qiagen、Germantown、MD）を用いて、加水分解プローブアッセイのために約2 ng/μLに調整された。加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子のコピー数の決定は、LIGHTCYCLER（登録商標）480システム（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を用いたリアルタイムPCRによって行われた。アッセイは、DSM-2、dgt-28および内部参照遺伝子、TAFII15（Genbank ID: NC003075; Duarte et al., (201) BMC Evol. Biol., 10:61) について設計された。

【0161】

増幅のために、LIGHTCYCLER（登録商標）480プローブマスターミックス（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）は、DSM-2とdgt-28用のそれぞれ0.1 μMのプライマー、TAFII15についてそれぞれ0.4 μMのプライマーおよび0.2 μMのそれぞれのプローブを含有する10 μL体積の多重反応物において1×最終濃度で調製された。

【0162】

表5. 二段階増幅反応は、60℃にて40秒間の伸長を用いて行い、蛍光を得た。すべての試料を実施し、平均サイクル閾値（Ct）をそれぞれの試料の分析に使用した。リアルタイムPCRデータの分析は、相対的な定量モジュールを用いるLightCycler（商標）ソフトウェアリリース1.5を使用して行い、ΔΔCt法に基づいている。このために、1コピーの較正物質由来のゲノムDNAの試料と既知の2コピーチェックをそれぞれの実行に含めた。加水分解プローブスクリーニングのコピー数の結果は、 T_1 および T_2 トランスジェニックアラビドプシス属植物について決定された。

【0163】

【表 5】

表 5. DSM-2、dgt-28 および内部参照遺伝子(TAFII15)の加水分解プローブアッセイに関するプライマーとプローブ情報

プライマー名	配列
DSM2A (配列番号 44)	5' AGCCACATCCCAGTAACGA 3'
DSM2S (配列番号 45)	5' CCTCCCTCTTTGACGCC 3'
DSM2 Cy5 プローブ (配列番号 46)	5' CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3'
DGT28F (配列番号 47)	5' CTTCAGGAGATTTGGGATTGT 3'
DGT28R (配列番号 48)	5' GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
UPL154 プローブ	Ca# 04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)
TAFY-HEX プローブ (配列番号 49)	5' AGAGAAGTTTCGACGGATTTCGGGC 3'
TAFII15-F (配列番号 50)	5' GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3'
TAFII15-R (配列番号 51)	5' GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3'

10

【0164】

サザンブロット分析を介した d s t - 2 8 組み込み確認。サザンブロット分析を用いて、挿入された T - 鎖 DNA 断片の組み込みパターンを確立し、d g t - 2 8 を含有する事象を同定した。データを作成し、アラビドプシス属ゲノム内の導入遺伝子挿入物の組み込みと完全性を実証した。サザンブロットデータは、T - 鎖 DNA の無傷のコピーの単純な組み込みを同定するために使用された。詳細なサザンブロット分析は、d g t - 2 8 遺伝子発現カセットに特異的な P C R 増幅されたプローブを用いて行われた。特定の制限酵素で消化されたゲノム DNA とプローブのハイブリダイゼーションは、特定の分子量のゲノム DNA 断片を同定した。そのパターンを用いて、次世代への進行のための完全長の単一挿入物 T₁ トランスジェニック事象を同定した。

20

【0165】

組織試料を 2 m L のコニカルチューブ (E p p e n d o r f (商標)) に回収し、2 日間凍結乾燥した。組織浸軟は、K L E C K O (商標) 組織粉碎機とタングステンビーズを用いて実施された。組織浸軟後、C T A B 単離手法を用いてゲノム DNA を単離した。Q i a g e n (商標) G e n o m i c T i p s キットを用いて、ゲノム DNA をさらに精製した。ゲノム DNA を Q u a n t - I T (商標) P i c o G r e e n DNA アッセイキット (M o l e c u l a r P r o b e s、I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A) によって定量した。定量されたゲノム DNA は、一定濃度にするために 4 μ g に調整された。

30

【0166】

それぞれの試料について、制限酵素 S w a I (N e w E n g l a n d B i o l a b s、B e v e r l e y、M A) を用いて、4 μ g のゲノム DNA を完全に消化し、2 5 ° C で一晩インキュベートし、次に、反応に N s i I を添加し、3 7 ° C にて 6 時間インキュベートした。消化された DNA は、製造業者が示唆したプロトコルに従って、Q u i c k P r e c i p i t a t i o n S o l u t i o n (商標) (E d g e B i o s y s t e m s、G a i t h e r s b u r g、M D) を用いて沈殿させて濃縮された。その後、6 5 ° C にて 1 時間、2 5 μ L の水にゲノム DNA を再懸濁した。再懸濁した試料は、1 × T A E 中で調製された 0 . 8 % アガロースゲルに装填され、1 × T A E 緩衝液中で 1 . 1 V / c m で一晩電気泳動された。連続的に、ゲルは、3 0 分間の変性 (0 . 2 M の N a O H / 0 . 6 M の N a C l)、および 3 0 分間の中和 (0 . 5 M の T r i s - H C l (p H 7 . 5) / 1 . 5 M の N a C l) に供された。

40

【0167】

ナイロンメンブレンへの DNA 断片の転写は、クロマトグラフィーペーパーの芯や紙タオルを使用することによって、処理された I M M O B I L O N (商標) N Y + 転写メンブ

50

レン (Millipore、Billerica、MA) 上にゲルを介して一晚 $20\times$ SSC 溶液を受動的に吸い上げることによって行われた。転写後、メンブレンは、簡単に、 $2\times$ SSC で洗浄し、STRATALINKER (商標) 1800 (Stratagene、La Jolla、CA) を用いて架橋し、 80°C にて3時間、真空乾燥させた。

【0168】

モデル400ハイブリダイゼーションインキュベータ (Robbins Scientific、Synnyvale、CA) を用いて、ガラスローボトル中で1時間 65°C にてプレハイブリダイゼーション溶液 (Perfect Hyb plus、Sigma、St. Louis、MO) とともにプロットをインキュベートした。プローブは、全コード配列を含むPCR断片から調製された。PCRアンプリコンは、QIAEX (商標) IIゲル抽出キットを用いて精製され、Random RT Prime IT (商標) 標識キット (Stratagene、La Jolla、CA) を介して、 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTPで標識された。プロットは、プロットあたり約200万カウント/mLまでハイブリダイゼーション緩衝液に直接添加された変性プローブを用いて、一晚 65°C にてハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーション後、プロットは、連続して、 65°C にて $0.1\times$ SSC / 0.1% SDS で40分間洗浄された。最後に、プロットをストレージリン光イメージングスクリーンに曝露し、Molecular Dynamics Storm 860 (商標) イメージングシステムを用いて撮像した。

【0169】

この研究において完成されたサザンプロット分析を用いて、コピー数を決定し、その選択された事象がアラビドプシス属のゲノム内のdgt-28導入遺伝子を含有していることを確認した。

【0170】

PCR分析を介したdgt-28遺伝子発現カセットの確認。 T_1 の植物事象に含まれるdgt-28遺伝子発現カセットの存在は、エンドポイントPCR反応によって検出された。AtUbi10プロモーターv2とdgt-28遺伝子発現カセットのAtuORF23 3' UTR v1領域に特異的なプライマー (表6) を検出のために使用した。

【0171】

【表6】

表6. dgt-28 遺伝子発現カセット確認のために使用したオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー名	配列
フォワードオリゴ (配列番号52)	5' CTGCAGGTCAACGGATCAGGATAT 3'
リバーソオリゴ (配列番号53)	5' TGGGCTGAATTGAAGACATGCTCC 3'

【0172】

PCR反応は、遺伝子発現カセットを増幅するために、標準的な三段階のPCRサイクリングプロトコルを必要とした。すべてのPCR反応は、以下のPCR条件を使用して完了された： 94°C にて3分間、続いて、 94°C にて30秒間、 60°C にて30秒間、および 72°C にて3分間の35サイクル。製造者の指示に従って、EX-TAQ (商標) PCRキット (TaKaRa Biotechnology Inc.、Otsu、Shiga、Japan) を用いて、反応を完了させた。最終サイクル後、反応を 72°C にて10分間インキュベートした。TAEアガロースゲル電気泳動を用いて、PCRアンプリコンのサイズを決定した。予想されるサイズのPCRアンプリコンは、全長遺伝子発現カセットの存在がトランスジェニックアラビドプシス属事象のゲノム中に存在することを示した。

【0173】

定量的逆転写PCR分析を介したdgt-28相対転写の確認。dgt-28トランスジェニック植物の組織試料を96ウェルプレートに回収し、 80°C にて凍結した。組織浸

軟は、KLECO（商標）組織粉碎機とタングステンビーズ（Environ Metal INC.、Sweet Home、Oregon）を用いて行った。組織浸軟の後、全RNAは、製造業者が示唆したプロトコールに従って、カラム上のオプションのDnase I 処置を含めたQiagen（商標）Rneasy 96キット（Qiagen（商標）、Germantown、MD）を用いたハイスループット形式で単離された。その後、このステップは、溶出された全RNAの追加のDnase I（Ambion（商標）、Austin、TX）処理に続いた。cDNA合成は、製造業者が示唆した手法に従って、オリゴスクレオチド、TVNを加えて、High Capacity cDNA Reverse Transcription（商標）キット（Applied Biosystems、Austin、TX）を用いて、鋳型として全RNAを使用して行われた。発現の定量は、加水分解プローブアッセイによって完了し、LIGHTCYCLER（登録商標）480システム（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を用いたリアルタイムPCRにより行われた。アッセイは、LIGHTCYCLER（登録商標）プローブデザインソフトウェア2.0を用いて、dgt-28および内部参照遺伝子「未知タンパク質」（Genbank受託番号AT4G24610）について設計された。増幅のために、LIGHTCYCLER（登録商標）480プローブマスターミックス（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）は、0.4 μMのそれぞれのプライマー、および0.2 μMのそれぞれのプローブを含む10 μL体積の一重反応中で1×最終濃度で調製された。表7。

【0174】

【表7】

表7. dgt-28の定量的逆転写PCR分析のために使用したPCRプライマー

プライマー名	配列
AT26410LP (配列番号 54)	5' CGTCCACAAAGCTGAATGTG 3'
AT26410RP (配列番号 55)	5' CGAAGTCATGGAAGCCACTT3'
UPL146	Cat# 04694325001 (Roche, Indianapolis, IN)
DGT28F (配列番号 56)	5' CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT3'
DGT28R (配列番号 57)	5' GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
UPL154 プローブ	Cat# 04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)

【0175】

二段階の増幅反応は、60℃にて40秒間の伸長を用いて行われ、蛍光を得た。すべての試料は3重にして行い、平均サイクル閾値（Ct）をそれぞれの試料の分析に使用した。マイナス逆転写反応をそれぞれの試料について行い、gDNA汚染がないことを確認した。リアルタイムPCRデータの分析はΔΔCt法に基づいて行った。このアッセイを用いて、ヘミ接合性およびホモ接合性であることが決定されたトランスジェニックアラビドプシス属事象におけるdgt-28の相対的発現を決定した。dgt-28 mRNAの相対的転写レベルは、内部対照より2.5倍から207.5倍高い範囲であった。これらのデータは、dgt-28トランスジェニック植物が、機能的dgt-28遺伝子発現カセットを含有し、植物がdgt-28導入遺伝子を転写することができたことを示している。

【0176】

ウエスタンブロッティング分析。DGT-28は、トランスジェニックシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）植物から得られる葉の試料において検出された。dgt-28トランスジェニック植物由来の植物抽出物とDGT-28タンパク質標準は、DTTを含有するNUPAGE（登録商標）LDS試料緩衝液（Invitrogen、Carlsbad、CA）とともに、90℃にて10分間インキュベートされ、アクリルアミドプレキャストゲルにおいて電気泳動的に分離された。次に、タンパク質は、製造者のプロトコ

ールを用いて、ニトロセルロースメンブレン上に電氣的に転写された。WESTERN BREEZE（登録商標）ブロッキングミックス（Invitrogen）を用いてブロッキング後、DGT-28タンパク質を抗DGT-28抗血清、次にヤギ抗ウサギホスファターゼによって検出した。検出されたタンパク質は、化学発光基質BCIP/NBTウェスタン分析試薬（KPL, Gaithersburg, MD）によって可視化された。ウェスタンブロットを介した無傷のDGT-28タンパク質の生産は、アッセイされたdgt-28トランスジェニック植物がDGT-28タンパク質を発現したことを示した。

【0177】

dgt-28導入遺伝子を含むトランスジェニックT₁アラビドプシス属植物は、異なる比率のグリホサートで噴霧された。高い比率がこの研究において適用され、抵抗性の相対的なレベル（105、420、1、680または3、360 g ae/ha）を決定した。非形質転換アラビドプシス属を制御するグリホサートの通常の1X使用率は、1120 g ae/haである。硫酸アンモニウムが添加されたグリホサート製剤を、187 L/haで較正されたトラック噴霧機を用いてT₁植物に適用した。この研究で使用されたT₁アラビドプシス属植物は、様々なコピー数のdgt-28導入遺伝子であった。低コピーのdgt-28 T₁アラビドプシス属植物を自家受粉し、これを用いてT₂植物を生成させた。表8は、グリホサート除草剤抵抗性遺伝子、dgt-1、および野生型対照を引用したdgt-28トランスジェニック植物の比較を示す。表9は、グリホサート除草剤抵抗性遺伝子、dgt-1、および野生型対照を引用したdgt-32とdgt-33の比較を示す。表10は、新規な微生物EPSシンターゼ酵素と、クラスIのEPSシンターゼ酵素およびグリホサート比率が1、680 g ae/haの対照の比較を示す。

【0178】

形質転換されたdgt-28アラビドプシス属植物のグリホサート選択の結果。アラビドプシス属T₁形質転換体は、最初に、グルホシネート選択スキームを使用して、非形質転換の種子のバックグラウンドから選択された。3フラットまたは30、000個の種子は、各T₁構築物について分析された。上記で選択されたT₁植物は、分子的に特徴付けられ、その後、様々なコピー数の代表的な植物は、個別のポットに移植され、前述のように様々な比率の市販のグリホサートで噴霧された。これらの植物の応答は、処理から2週間後（WAT）、視覚的損傷%の観点から提示される。データは表に示され、損傷がほとんどないもしくは全くない（<20%）、中程度の損傷（20~40%）、または重度の損傷（>40%）を提示する個々の植物を示す。算術平均および標準偏差は、アラビドプシス属形質転換のために使用されるそれぞれの構築物について提示される。個別の応答における範囲もまた、それぞれの比率および形質転換に関して、最後の列に示されている。野生型、非形質転換アラビドプシス属（栽培品種コロンビア）は、グリホサート感受性対照として用いた。

【0179】

植物応答のレベルは変化した。この差異は、それぞれの植物が独立した形質転換事象を表すという事実に起因することができ、したがって、対象とする遺伝子のコピー数は、植物ごとに変動する。導入遺伝子を含んでいたいくつかの植物はグリホサートに耐性ではなく；これらの植物が導入遺伝子を発現したかどうかを判断する徹底的な分析が完了しなかったことに気付いた。T₁アラビドプシス属植物内での高いコピー数の導入遺伝子の存在は、dgt-28導入遺伝子の存在にもかかわらず、導入遺伝子サイレンシングをもたらしたかまたはグリホサートに対する感受性をもたらした他のエピジェネティックな効果をもたらした可能性がある。

【0180】

比率による全体的な集団の損傷平均は、1、680 g ae/haでのグリホサートの比率について表10に示され、dgt-3、dgt-7、dgt-28、dgt-32およびdgt-33対dgt-1および野生型対照で形質転換された植物の間に有意な差を実証する。

10

20

30

40

50

【0181】

新規な細菌E P S Pシンターゼによって提供される耐性は、特異的酵素に依存して変化した。D G T - 2 8、D G T - 3 2、およびD G T - 3 3は、予想外にグリホサートに有意な耐性を示した。d g t 遺伝子は、試験したすべての輸送ペプチド全体で個々のT₁アラビドプシス属植物に除草剤抵抗性を付与した。このように、追加的な葉緑体輸送ペプチド（すなわち、T r a P 8 - d g t - 3 2またはT r a P 8 - d g t - 3 3）の使用は、所定の処置内で報告されているのと同様の損傷レベルでグリホサートに対する保護を提供する。

【0182】

【表 8 - 1】

表 8. dgt-1(T₁)ホモ接合抵抗性集団および非形質転換対照と比較した、発芽してから成熟するまでに適用されたある範囲のグリホサート比率に対する dgt-28 で形質転換された T₁ アラビドプシス属の応答。適用から 14 日後の視覚的損傷%。

pDAB107527: TraP4 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	4	0	0	3.8	7.5	0-15
420 g ae/ha グリホサート	2	1	1	28.8	28.1	0-65
1680 g ae/ha グリホサート	0	2	2	55.0	26.8	35-85
3360 g ae/ha グリホサート	0	2	2	43.8	18.0	30-70
pDAB105530: TraP5 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	6	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	2	2	2	39.3	37.4	8-100
420 g ae/ha グリホサート	1	4	1	33.0	26.6	8-85
1680 g ae/ha グリホサート	0	4	2	47.5	27.5	25-85
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	6	76.7	13.7	50-85
pDAB105531: TraP8 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	3	1	0	10.8	10.4	0-25
420 g ae/ha グリホサート	3	0	1	22.8	18.6	8-50
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	5.3	3.8	0-8
3360 g ae/ha グリホサート	0	4	0	29.3	6.8	22-35
pDAB105532: TraP9 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	3	0	1	17.5	28.7	0-60
420 g ae/ha グリホサート	1	1	2	39.5	25.1	18-70
1680 g ae/ha グリホサート	3	0	1	26.3	36.1	5-80
3360 g ae/ha グリホサート	3	0	1	25.8	32.9	8-75

10

20

30

40

【表 8 - 2】

pDAB105533: TraP12 v2 - <i>dgt</i> -28 v5	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	5	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	4	1	0	10.0	10.0	0-25
420 g ae/ha グリホサート	1	1	3	53.6	34.6	8-85
1680 g ae/ha グリホサート	4	1	0	11.0	8.2	0-20
3360 g ae/ha グリホサート	0	2	3	55.0	25.5	25-80
pDAB105534: TraP13 v2 - <i>dgt</i> -28 v5	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	5	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	4	0	1	14.0	20.6	0-50
420 g ae/ha グリホサート	3	1	1	17.6	19.5	0-50
1680 g ae/ha グリホサート	3	0	2	39.0	47.1	5-100
3360 g ae/ha グリホサート	2	2	1	31.2	22.3	18-70
pDAB4104: <i>dgt</i> - 1 (形質転換対照)	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	5	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	0	0	4	80.0	0.0	80
420 g ae/ha グリホサート	0	0	4	80.0	0.0	80
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4	80.0	0.0	80
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	81.3	2.5	80-85
WT (非形質転換対照)	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	5	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
420 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100

【 0 1 8 3 】

【表 9】

表 9. dgt-1(T_1)ホモ接合抵抗性集団および非形質転換対照と比較した、発芽してから成熟するまでに適用されたある範囲のグリホサート比率に対する dgt-32 および dgt-33 で形質転換された T_1 アラビドプシス属の応答。適用から 14 日後の視覚的損傷%。

pDAB107532: TraP14 v2 - dgt - 32 v3						
	損傷%			損傷%		
平均	<20 %	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	2	0	2	30.0	29.4	0-60
1680 g ae/ha グリホサート	3	0	1	17.5	21.8	5-50
3360 g ae/ha グリホサート	0	3	1	35.0	30.0	20-80
pDAB107534: TraP24 v2 - dgt - 33 v3						
	損傷%			損傷%		
平均	<20 %	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	2	2	0	21.3	14.9	5-40
420 g ae/ha グリホサート	1	1	2	46.3	30.9	5-70
1680 g ae/ha グリホサート	1	0	3	62.5	38.8	5-90
3360 g ae/ha グリホサート	1	0	3	62.0	36.0	8-80
pDAB4104: dgt - 1 (形質転換対照)						
	損傷%			損傷%		
平均	<20 %	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	0	2	3	42.5	15.0	20-50
420 g ae/ha グリホサート	0	1	2	38.8	11.1	25-50
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4	79.0	19.4	50-90
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	50.0	0.0	50
WT (非形質転換対照)						
	損傷%			損傷%		
平均	<20 %	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha グリホサート	0	0	4	85.0	0.0	85
420 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100

【 0 1 8 4 】

【表 10】

表 10. *dgt-1*(T_4)ホモ接合抵抗性集団および非形質転換対照と比較した、発芽してから成熟するまでに 1,680g ae/ha で適用されたグリホサートに対する *dgt-28*、*dgt-32*、*dgt-33*、*dgt-3*、および *dgt-7* で形質転換された T_1 アラビドプシス属の応答。適用から 14 日後の視覚的損傷%。

			損傷%			損傷%		
			<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲 (%)
細菌酵素	pDAB107527	TraP4 v2 - <i>dgt-28</i> v5	0	2	2	55.0	26.8	35-85
	pDAB105530	TraP5 v2 - <i>dgt-28</i> v5	0	4	2	47.5	27.5	25-85
	pDAB105531	TraP8 v2 - <i>dgt-28</i> v5	4	0	0	5.3	3.8	0-8
	pDAB105532	TraP9 v2 - <i>dgt-28</i> v5	3	0	1	26.3	36.1	5-80
	pDAB105533	TraP12 v2 - <i>dgt-28</i> v5	4	1	0	11.0	8.2	0-20
	pDAB105534	TraP13 v2 - <i>dgt-28</i> v5	3	0	2	39.0	47.1	5-100
	pDAB107532	TraP14 v2 - <i>dgt-32</i> v3	3	0	1	17.5	21.8	5-50
	pDAB107534	TraP24 v2 - <i>dgt-33</i> v3	1	0	3	62.5	38.8	5-90
クラス I 酵素	pDAB102715	<i>dgt-3</i> v2	4	0	3	42	48	0-100
	pDAB102716	<i>dgt-3</i> v3	2	0	1	14	23	0-40
	pDAB102717	<i>dgt-3</i> v4	3	2	1	28	35	10-100
	pDAB102785	<i>dgt-7</i> v4	0	1	1	45	21	30-60
	pDAB4104	<i>dgt-1</i> (形質転換対照)	0	0	4	80.0	0.0	80
	--	WT (非形質転換対照)	0	0	4	100.0	0.0	100

【0185】

選択マーカーとしての *dgt-28*。グリホサート選択剤のための選択マーカーとしての *dgt-28* の使用は、上記のアラビドプシス属形質転換植物を用いて試験される。約 50 個の T_4 世代アラビドプシス属種子 (*dgt-28* についてホモ接合) は、約 5,000 個の野生型 (グリホサートに感受性である) の種子に混ぜられる。種子は発芽され、苗木はグリホサートの選択用量で噴霧される。グリホサートのいくつかの処理を比較する: 植物のそれぞれのトレイは、以下の処置スキーム: 7 D A P (植え付け後の日数)、11 D A P、または 7 D A P の後 11 D A P の 1 つにおいて、グリホサートの 1 回または 2 回の適用時期のいずれかを受ける。すべての植物はまた、同じ形質転換ベクターにグルホシネート抵抗性遺伝子を含んでいるため、グリホサートを用いて選択された *dgt-28* を含む植物は、グルホシネートを用いて選択された D S M-2 または p a t を含む植物と直接比較することができる。

【0186】

前述のように、グリホサート処置は、D e V i l b i s s (商標) 噴霧チップを用いて適用される。*dgt-28* を含有するトランスジェニック植物は、「抵抗性」または「感受性」17 D A P として同定される。植え付け後 (D A P) 7 日および 11 日に適用された 26.25~1680 g a e / h a グリホサートの処理は、*dgt-28* を含むトランスジェニックアラビドプシス属植物について有効な選択を示す。感受性および抵抗性の植物をカウントし、グリホサート耐性植物の数は、植え付けられる *dgt-28* 導入遺伝子を含むトランスジェニック種子の元の数と相関することが見出される。これらの結果は、*dgt-28* が、形質転換されたアラビドプシス属の集団に対して代替的な選択マーカー

ーとして効果的に使用できることを示す。

【0187】

遺伝可能性。確認されたトランスジェニック T_1 アラビドプシス属事象は、 T_2 種子を生産するために自家受粉された。これらの種子は、100個の無作為な T_2 同胞に、グルホシネート (200 g a e / h a) を含有する I g n i t e (商標) 除草剤を適用することによって後代検定を行われた。それぞれの個々の T_2 植物は、噴霧適用 (187 L / h a 適用率でのトラック噴霧器) 前に7.5 cmの正方形ポットに移植された。 T_1 ファミリー (T_2 植物) は、カイ二乗分析 ($P > 0.05$) によって決定したメンデル遺伝を用いた優性遺伝単一遺伝子座について、予期される3抵抗性: 1感受性モデルに分離した。期待されたメンデル遺伝を用いて分離された T_1 ファミリーの割合は表11に示され、 $dgt-28$ 形質は T_2 世代にメンデル遺伝を介して渡されることを実証する。種子は、5~15個の T_2 個体 (T_3 種子) から回収された。3~4個の無作為に選択された T_2 ファミリーのそれぞれからの25個の T_3 同胞について前述のように後代検定を行った。データは分離を示さず、したがって、 $dgt-28$ および $dgt-3$ は、染色体内に安定に組み込まれ、少なくとも3世代にメンデル様式で遺伝されることを実証した。

【0188】

【表11】

表 11. 100 個の植物の後代検定に関する単一メンデル遺伝として分離する T_1 ファミリー (T_2 植物) の割合

対象とする遺伝子	1 遺伝子座で分離する試験された T_1 ファミリー (%)
<i>dgt-3 v2</i>	64%
<i>dgt-3 v3</i>	60%
<i>dgt-3 v4</i>	80%
<i>dgt-7 v4</i>	63%
TraP5 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP8 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP9 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP12 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	50%
TraP13 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	75%
<i>yfp</i> トランスジェニック 対照植物	100%

【0189】

T_2 アラビドプシス属データ。低コピー数の $dgt-28$ 導入遺伝子を含んだ選択された T_1 アラビドプシス属事象の第2世代植物 (T_2) は、グリホサート耐性についてさらに特徴付けられた。グリホサートを前述のように適用した。植物の応答は、処置から2週間後 (WAT)、視覚的損傷%の観点から提示される。データは、損傷がほとんどないもしくは全くない (< 20%)、中程度の損傷 (20~40%)、または重度の損傷 (> 40%) を提示する個体のヒストグラムとして示される。算術平均および標準偏差は、アラビドプシス属形質転換のために使用されるそれぞれの構築物について提示される。個別の応答における範囲もまた、それぞれの比率および形質転換に関して、最後の列に示されている。野生型、非形質転換アラビドプシス属 (栽培品種コロンビア) は、グリホサート感受性対照として用いた。 T_2 世代において、ヘミ接合およびホモ接合植物は、それぞれの事象についての試験に利用可能であり、したがって、試験されたそれぞれの比率のグリホサートに含まれた。遺伝子座で同じ2つの対立遺伝子を含むホモ接合植物と比較して、ヘミ接合植物は、遺伝子座で2つの異なる対立遺伝子を含む。グリホサートに対する応答の変動性は、ホモ接合植物と比較して、ヘミ接合性についての遺伝子量の差の結果として、 T_2 世代で期待される。グリホサートへの応答の変動性は、標準偏差と応答の範囲に反映

される。

【0190】

T₂世代において、1コピーとマルチコピーのdgt-28事象の両方はグリホサート耐性について特徴付けられた。事象内では、1コピーの植物はグリホサートに対して同レベルの耐性を示した。1コピーT₂事象について特徴的データを表12に示す。Trap5 v2と連結されたdgt-28を含む事象は、他のTrap輸送ペプチドを含有したdgt-28構築物と比較して、グリホサートに対する強固な耐性を提供しなかった。しかしながら、dgt-28 Trap5構築物は、非形質転換コロンビア対照と比較して、低レベルのグリホサート耐性を提供した。2以上のコピーのdgt-28を含有することが示された事象が高比率のグリホサートにより感受性であるという例があった（データ示さず）。グリホサートに対する感受性のこの増加は、高いコピー数のdgt-28導入遺伝子も含有したT₁植物について先に記載されたデータに類似する。アラビドプシス属植物内の高いコピー数の導入遺伝子の存在は、dgt-28導入遺伝子の存在にもかかわらず、導入遺伝子サイレンシングまたはグリホサートに対する感受性をもたらす他のエピジェネティックな効果をもたらす可能性がある。

10

【0191】

これらの事象は、Trap5 v2 (pDAB105530)、Trap12 v2 (pDAB105533) およびTrap13 v2 (pDAB105534) と連結したdgt-28を含んでいた。

【0192】

dgt-28に加えて、dgt-3で形質転換されたT₂アラビドプシス属事象を表13に示す。表12においてdgt-28事象について記載したように、データ表は、それぞれの構築物についてのグリホサートに対する応答に特徴的である代表的な事象を含む。dgt-3の特徴付けのために、AtUbi10プロモーターによって駆動されるdgt-3遺伝子を有する単一PTU（植物形質転換単位）を含む構築物 (pDAB102716、図29とpDAB102715、図28) は、遺伝子の2PTU (pDAB102719、図32；pDAB102718、図33) を含む同遺伝子を有する構築物と比較された。2PTUを含んだ構築物は、該遺伝子の1コピーを駆動するためにAtUbi10プロモーターを使用し、他のコピーを駆動するためにCsVMVプロモーターを使用した。二重PTUの使用は、dgt-3トランスジェニック植物と、2コピーの導入遺伝子を含有したdgt-28トランスジェニック植物を比較するために組み込まれた。データは、単一のPTUのみを有する1コピーのT₂ dgt-3事象が、試験された1コピーのdgt-28事象よりもグリホサートに対して感受性であるが、非形質転換対照より高い耐性であることを実証した。dgt-3遺伝子の2PTUを含むT₁ファミリーは、1PTU構築物と比較して、グリホサートに対して高いレベルの視覚的耐性を提供した。いずれの場合も、T₁ファミリーは、dgt-1および野生型対照と比較された。T₂データは、dgt-28が1コピー事象として強固な耐性を提供することを実証している。

20

30

【0193】

【表 1 2 - 1】

表 12. dgt-1(T₁)ホモ接合抵抗性集団および非形質転換対照と比較した、様々な比率で発芽してから成熟するまでに適用されたグリホサートに対する、dgt-28 を含有する選択された個々の T₂ アラビドプシス属事象の応答。適用から 14 日後の視覚的損傷%。

pDAB105530: TraP5 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
1 コピー	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	0	0	4	75.0	17.8	50-90
840 g ae/ha グリホサート	0	0	4	80.0	20.0	50-90
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4	75.0	10.8	60-85
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	76.3	4.8	70-80
pDAB105531: TraP8 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
1 コピー	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.5	1.0	0-2
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	7.5	5.0	5-15
3360 g ae/ha グリホサート	4	0	0	7.5	6.5	0-15
pDAB105532: TraP9 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
1 コピー	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	2.0	4.0	0-8
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	9.0	2.0	8-12
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	7.3	4.6	2-12
3360 g ae/ha グリホサート	4	0	0	11.0	1.2	10-12
pDAB105533: TraP12 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
1 コピー	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
3360 g ae/ha グリホサート	3	1	0	13.3	7.9	8-25
pDAB105534: TraP13 v2 - dgt-28 v5	損傷%			損傷%		
1 コピー	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	3	1	0	5.0	10.0	0-20
840 g ae/ha グリホサート	3	1	0	5.0	10.0	0-20
1680 g ae/ha グリホサート	2	2	0	10.0	11.5	0-20
3360 g ae/ha グリホサート	2	2	0	15.0	12.2	5-30

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

WT (非形質転換対照)	損傷%				損傷%		
	<20%	20-40%	>40%		Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	0	0	4		100.0	0.0	100
840 g ae/ha グリホサート	0	0	4		100.0	0.0	100
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4		100.0	0.0	100
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4		100.0	0.0	100
pDAB4104: <i>dgt-1</i> (形質転換対照)	損傷%				損傷%		
1 コピー	<20%	20-40%	>40%		Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	0	4	0		37.5	2.9	35-40
840 g ae/ha グリホサート	0	0	4		45.0	0.0	45
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4		47.5	2.9	45-50
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4		50.0	0.0	50

10

20

【 0 1 9 4】

【表 1 3】

表 13. 様々な比率で発芽してから成熟するまでに適用されたグリホサートに対する、dgt-3 で形質転換された選択された T₂ アラビドプシス属事象の応答。適用から 14 日後の視覚的損傷%。

pDAB102716: dgt-3 v3 (1 PTU)	損傷%			損傷%		
1 コピーseg	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha グリホサート	1	1	2	39	25	15-65
840 g ae/ha グリホサート	0	2	2	50	23	30-70
1680 g ae/ha グリホサート	0	1	3	69	19	40-80
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	79	6	70-85

pDAB102719: dgt-3 v3 (2 PTU)	損傷%			損傷%		
1 コピーseg	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha グリホサート	0	4	0	20	0	20
840 g ae/ha グリホサート	0	3	1	38	5	35-45
1680 g ae/ha グリホサート	3	1	0	15	7	10-25
3360 g ae/ha グリホサート	2	2	0	21	8	15-30

pDAB102715: dgt-3 v2 (1 PTU)	損傷%			損傷%		
1 コピーseg	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha グリホサート	2	2	0	26	16	10-40
840 g ae/ha グリホサート	0	2	2	55	17	40-70
1680 g ae/ha グリホサート	0	2	2	56	22	35-75
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	65	17	50-80

pDAB102718: dgt-3 v2 (2 PTU)	損傷%			損傷%		
1 コピーseg	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	5	7	0-15
840 g ae/ha グリホサート	2	2	0	23	10	15-35
1680 g ae/ha グリホサート	3	0	1	20	20	5-50
3360 g ae/ha グリホサート	1	1	2	36	22	15-60

【0 1 9 5】

T₃ アラビドプシス属データ。低コピー数の d g t - 2 8 導入遺伝子を含んだ選択された T₂ アラビドプシス属事象の第 3 世代植物 (T₃) は、グリホサート耐性についてさらに特徴付けられた。これまでに記載されたように、ラインあたり 25 個体の植物をグルホシネートを用いて選択し、試験されたどの構築物から得られたラインも選択マーカー遺伝子を分離しなかった。グリホサートを前述のように適用した。植物の応答は、処置から 2 週間後 (W A T)、視覚的損傷%の観点から提示される。データは、損傷がほとんどないもしくは全くない (< 20%)、中程度の損傷 (20 ~ 40%)、または重度の損傷 (> 40%) を提示する個体のヒストグラムとして示される。算術平均および標準偏差は、アラビドプシス属形質転換のために使用されるそれぞれの構築物について提示される。個別の応答における範囲もまた、それぞれの比率および形質転換に関して、最後の列に示され

ている。野生型、非形質転換アラビドプシス属（栽培品種コロンビア）は、グリホサート感受性対照として用いた。

【0196】

【表14-1】

表 14. dgt-1(T₁)ホモ接合抵抗性集団および非形質転換対照と比較した、様々な比率で発芽してから成熟するまでに適用されたグリホサートに対する、dgt-28 を含有する選択された個々の T₃ アラビドプシス属事象の応答。適用から 14 日後の視覚的損傷%。

dgt-28 (pDAB107602)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	0	0	4	73.8	2.5	70-75
840 g ae/ha グリホサート	0	0	4	71.3	7.5	60-75
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4	77.5	2.9	75-80
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	77.5	2.9	75-80

10

TraP4::dgt-28 (pDAB107527)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	5.0	0.0	5
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	10.0	0.0	10
3360 g ae/ha グリホサート	1	3	0	18.8	2.5	15-20

20

TraP5 v1::dgt-28 (pDAB102792)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	3	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha グリホサート	3	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha グリホサート	3	0	0	6.0	1.7	5-8
3360 g ae/ha グリホサート	2	0	0	6.5	2.1	5-8

30

TraP5 v2::dgt-28 (pDAB105530)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	6.0	1.7	5-8
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	8.0	0.0	8
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	14.3	1.5	12-15
3360 g ae/ha グリホサート	1	3	0	18.7	2.5	15-20

40

TraP8 v2::dgt-28 (pDAB105531)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	2.5	5.0	0-10
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	3.3	3.9	0-8
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	2.5	2.9	0-5
3360 g ae/ha グリホサート	4	0	0	7.3	6.4	2-15

【表 1 4 - 2】

TraP9 v2::dgt-28 (pDAB105532)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	1.3	2.5	0-5
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	1.8	2.4	0-5
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
3360 g ae/ha グリホサート	4	0	0	10.0	4.4	5-15

TraP12 v2::dgt-28 (pDAB105533)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	3.8	7.5	0-15
3360 g ae/ha グリホサート	4	0	0	6.3	4.8	0-10

TraP13 v2::dgt-28 (pDAB105534)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	2	2	0	10.0	11.5	0-20
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	2.8	1.5	2-5
3360 g ae/ha グリホサート	4	0	0	8.0	0.0	8

TraP23::dgt-28 (pDAB107553)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	7.8	2.1	5-10
3360 g ae/ha グリホサート	4	0	0	10.8	3.0	8-15

WT (非形質転換対照)	損傷範囲% (再現数)			損傷分析%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
840 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	100.0	0.0	100

【0197】

形質転換植物の選択。新たに回収したT₁種子[dgt-31、dgt-32、およびdgt-33 v1遺伝子]を室温にて乾燥させ、試験のためにインディアナポリスに搬送した。T₁種子は、26.5×51cmの発芽トレイ(T. O. Plastics Inc.、Clearwater、MN)に播種され、それぞれは、予め40mLの0.1%アガロース溶液に懸濁され、4℃にて2日間保存された、層状にしたT₁種子の200mgアリコート(約10,000個の種子)を受け、休眠要件を完了し、同期種子発芽を確保した。

10

20

30

40

50

【0198】

Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc.、Bellevue、WA) は微細なバーミキュライトで覆われ、湿るまでホーグランド液で地下灌漑され、次に、重力排出を可能にした。層状にした種子のそれぞれ40 mLのアリコートは、ピペットを用いてバーミキュライト上に均一に播種され、4～5日間、湿度ドーム (KORD (商標) Products、Bramalea、Ontario、Canada) で覆われた。ドームは、グルホシネート出芽後噴霧 (同時形質転換された dsm-2 遺伝子を選択する) を使用した最初の形質転換体の選択前に植物が発芽した時点で外された。

【0199】

植え付け後 (DAP) 6日とさらに10 DAPに、T₁ 植物 (それぞれ子葉と2-4-1 f段階) は、適用あたり200 g a e / h a グルホシネートの有効比率を達成するために、DeVilbiss (商標) 圧縮空気噴霧チップを用いて、10 mL / トレイ (703 L / h a) の噴霧体積で、IGNITE (商標) 除草剤 (280 g a i / L グルホシネート、Bayer Crop Sciences、Kansas City、MO) の0.1%溶液で噴霧された。生存者 (活発に成長している植物) は、最終噴霧から4～7日後に特定された。生存植物は、ポットリングメディア (Metro Mix 360 (商標)) を用いて調製された3インチ (7.62 cm) のポットに個別に移植された。植物は、コピー数分析のための組織サンプリングの少なくとも1日前に温室において生育された。

【0200】

T₁ 植物をサンプリングし、dgt-31、dgt-32、およびdgt-33 v1 遺伝子についてのコピー数分析を完了した。次に、コピーの範囲が、それぞれの比率にあるように、T₁ 植物を様々な比率のグリホサートに割り当てた。アラビドプシス属について、26.25 g a e / h a のグリホサートは、感受性の植物と意味のあるレベルの抵抗性を有する植物を区別するのに有効な用量である。高い比率は、相対的レベルの抵抗性 (105、420、1680、または3360 g a e / h a) を決定するために適用された。表15は、dgt-1を引用した比較を示す。

【0201】

すべてのグリホサート除草剤適用は、187 L / h a の噴霧体積でトラック噴霧器によってなされた。使用されたグリホサートは、市販のDurangoジメチルアミン塩製剤 (480 g a e / L、Dow Agrosciences、LLC) であった。グルホシネートまたはグリホサートのいずれかに耐性を示した低コピーのT₁ 植物は、T₂ 世代においてさらに評価された。

【0202】

最初のアラビドプシス属形質転換は、dgt-31、dgt-32、およびdgt-33 v1を用いて行われた。T₁ 形質転換体は、最初に、グルホシネート選択スキームを用いて、非形質転換種子のバックグラウンドから選択された。3フラットまたは30、000個の種子は、各T₁ 構築物について分析された。形質転換頻度を計算し、T₁ のdgt-31、dgt-32、およびdgt-33構築物の結果は表15に列挙する。

【0203】

【表15】

表15. 選択マーカー遺伝子 DSM-2 の選択について、グルホシネートを用いて選択される T1 dgt-31、dgt-32、および dgt-33 アラビドプシス属構築物の形質転換頻度。

構築物	カセット	形質転換頻度(%)
pDAB107532	AtUbi10/TraP14 dgt-32 v1	0.47
pDAB107533	AtUbi10/TraP23 dgt-31 v1	0.36
pDAB107534	AtUbi10/TraP24 dgt-33 v1	0.68

【0204】

その後、上記で選択された T_1 植物は、個別のポットに移植され、様々な比率の市販のグリホサートで噴霧された。表 16 は、アラビドプシス属 T_1 形質転換体にグリホサート抵抗性を付与する $dgt-31$ 、 $dgt-32$ および $dgt-33$ $v1$ ならびに対照遺伝子の応答を比較する。応答は、2WAT で視覚的損傷%の観点から提示される。データは、損傷がほとんどないもしくは全くない ($<20\%$)、中程度の損傷 ($20\sim40\%$)、または重度の損傷 ($>40\%$) を提示する個体のヒストグラムとして示される。算術平均および標準偏差は、それぞれの処理について提示される。個別の応答における範囲もまた、それぞれの比率および形質転換に関して、最後の列に示されている。野生型、非形質転換アラビドプシス属 (栽培品種コロンビア) は、グリホサート感受性対照として用いた。輸送ペプチド $Trap23$ を有する $DGT-31$ ($v1$) 遺伝子は、陰性対照と比較して、わずかな除草剤耐性を個々の T_1 アラビドプシス属植物に付与したが、遺伝子は輸送ペプチド $Trap8$ を有する場合には改善された耐性を示した。 $DGT-32$ と $DGT-33$ はともに、 $Trap8$ およびそれぞれの様々な葉緑体輸送ペプチド (それぞれ $Trap14$ と $Trap24$) を用いて試験された比率でグリホサートに対して強固な耐性を実証した。所与の処理中で、植物応答のレベルは非常に変化した。これは、それぞれの植物が独立した形質転換事象を表すという事実に基づき、したがって、対象とする遺伝子のコピー数は植物ごとに変動する。重要にも注目すべきことに、試験したそれぞれのグリホサート比率で、他よりも耐性である個体があった。比率による全集団の損傷平均は表 16 に示され、 $dgt-31$ 、 $dgt-32$ 、および $dgt-33$ $v1$ 対 $dgt-1$ $v1$ または野生型対照で形質転換された植物間で有意な相違を実証する。

【0205】

10

20

【表 16-1】

表 16. dgt-1(T4)ホモ接合抵抗性集団または非形質転換対照と比較した、発芽してから成熟するまでに適用されたある範囲のグリホサート比率に対する、dgt-31、dgt-32、および dgt-33 v1 で形質転換された T₁ アラビドフシス属の応答。処理から 2 週間後の視覚的損傷%。

TraP23 dgt-31				損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	0	4	81.3	2.5	80-85
420 g ae/ha	0	0	4	97.3	4.9	90-100
1680 g ae/ha	0	0	4	90.0	7.1	85-100
3360 g ae/ha	0	0	4	91.3	6.3	85-100
TraP14 dgt-32				損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	2	0	2	30.0	29.4	0-60
1680 g ae/ha	3	0	1	17.5	21.8	5-50
3360 g ae/ha	0	3	1	35.0	30.0	20-80
TraP24 dgt-33				損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	2	2	0	21.3	14.9	5-40
420 g ae/ha	1	1	2	46.3	30.9	5-70
1680 g ae/ha	1	0	3	62.5	38.8	5-90
3360 g ae/ha	1	0	3	62.0	36.0	8-80
TraP8 dgt-31				損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave.	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0.0
105 g ae/ha グリホサート	0	1	3	0.0	43.8	17.0
420 g ae/ha グリホサート	1	2	1	0.0	43.8	32.5
1680 g ae/ha グリホサート	0	1	3	0.0	71.3	27.8
3360 g ae/ha グリホサート	0	0	4	0.0	81.3	8.5
TraP8 dgt-32				損傷%		
平均	<20%	<20%	<20%	Ave.	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	4	0.0	0.0	0.0
105 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0.0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	7.5	5.0
1680 g ae/ha グリホサート	3	1	0	0.0	10.8	9.6
3360 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	12.8	3.2
TraP8 dgt-33				損傷%		
平均	<20%	<20%	<20%	Ave.	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0.0
105 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0.0
420 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	2.5	3.8
1680 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	6.3	2.5
3360 g ae/ha グリホサート	3	1	0	0.0	20.0	13.5
dgt-1 (形質転換対照)				損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	1	3	42.5	15.0	20-50
420 g ae/ha	0	2	2	38.8	11.1	25-50

10

20

30

40

【表 16-2】

1680 g ae/ha	0	0	4	79.0	19.4	50-90
3360 g ae/ha	0	0	4	50.0	0.0	50
WT (非形質転換対照)	損傷%			損傷%		
平均	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	0	4	85.0	0.0	85
420 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

10

【0206】

トウモロコシ形質転換。標準的なクローニング方法は、上述した通りであり、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) を媒介したトウモロコシの形質転換において使用するためのバイナリーベクターの構築に用いた。表 17 は、トウモロコシ形質転換のために構築されたベクターを列挙する。以下の遺伝子エレメントは *dgt-28* を含んだベクターにおいて使用された；トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーター (*ZmUbi1*；米国特許第 5, 510, 474 号) を用いて、トウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ 3' 非翻訳領域 (*ZmLip 3' UTR*；米国特許第 7179902 号) に並べられた *dgt-28* コード配列を駆動し、選択マーカーカセットは、トウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ 3' 非翻訳領域に並べられた *aad-1* コード配列 (米国特許第 7, 838, 733 号) を駆動するために使用されたトウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーターからなる。*aad-1* コード配列は、例えば、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) およびアリアルオキシフェノキシプロピオネート (AOPP) 除草剤などのフェノキシオキシシン除草剤に対する耐性を付与する。

20

【0207】

dgt-28 構築物は、標準的なバイナリーベクターおよびアグロバクテリウムスーパーバイナリーシステムベクター (*Japan Tobacco, Tokyo, JP*) として構築された。標準的なバイナリーベクターとしては、*pDAB107663*、*pDAB107664*、*pDAB107665*、および *pDAB107665* が挙げられる。アグロバクテリウムスーパーバイナリーシステムベクターには、*pDAB108384*、*pDAB108385*、*pDAB108386*、および *pDAB108387* が含まれる。

30

【0208】

黄色蛍光タンパク質 (*yfp*；米国特許出願公開第 2007/0298412 号) レポーター遺伝子を含有しているさらなる構築物を完成した。*pDAB109812* は、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーターによって駆動され、トウモロコシ (*Zea mays*) *per5 3'* 非翻訳領域 (*Zm per5 3' UTR*；米国特許第 7179902 号) に並べられた *yfp* レポーター遺伝子カセットを含み、選択マーカーカセットは、*aad-1* 発現を駆動するために使用され、トウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ 3' 非翻訳領域に並べられたサトウキビ桿菌状ウイルスプロモーター (*SCBV*；米国特許第 5, 994, 123 号) からなる。*pDAB101556* は、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーターによって駆動され、トウモロコシ (*Zea mays*) *per5 3'* 非翻訳領域に並べられた *yfp* カセットを含み、選択マーカーカセットは、*aad-1* 発現を駆動するために使用され、トウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ 3' 非翻訳領域に並べられたトウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーターからなる。*pDAB107698* は、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーターによって駆動され、トウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ 3' 非翻訳領域に並べられた *dgt-28* カセットを含み、*yfp* カセットは、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーターによって駆動され、トウモロコシ (*Zea mays*) *per5 3'* 非翻訳領域に並べられ、選択マーカーカセットは、*aad-1* 発現を駆動するために使用され、トウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ 3

40

50

、非翻訳領域に並べられたサトウキビ桿菌状ウイルスプロモーターからなる。これらの構築物の3つすべてが標準的なバイナリーベクターである。

【0209】

【表17】

表17. トウモロコシ形質転換ベクター

プラスミド番号	図番号	遺伝子エレメントの説明
pDAB107663	34	ZmUbi1/TraP4 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR バイナリーベクター
pDAB107664	35	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR バイナリーベクター
pDAB107665	36	ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR バイナリーベクター
pDAB107666	37	ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR バイナリーベクター
pDAB109812	38	ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmPer5 3'UTR :: SCBV/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR バイナ リーベクター
pDAB101556	39	ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmPer5 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR バ イナリーベクター
pDAB107698	40	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmLip 3'UTR::SCBV/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB108384	41	ZmUbi1/TraP4 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR:: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR スーパーバイナリーベクター
pDAB108385	42	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR スーパーバイナリー前駆体
pDAB108386	43	ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR スーパーバイナリー前駆体
pDAB108387	44	ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR::ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR スーパーバイナリー前駆体

【0210】

穂の滅菌および胚の単離。トウモロコシ未熟胚を得るために、トウモロコシ (*Zea mays*) の同系交配株 B104 の植物を温室で生育させ、自家受粉または同胞受粉し、穂を生成した。受粉後の約9～12日目に穂を回収した。実験日に、穂は、次亜塩素酸ナトリウム (5%) の20%溶液に浸漬することによって表面を滅菌し、20～30分間振とうし、次に、滅菌水で3回濯いだ。滅菌後、未熟接合胚 (1.5～2.4 mm) は、それぞれの穂から無菌的に切除し、液体感染培地 (LS基礎培地、4.43 g/L; N6ビタミン溶液 [1000×]、1.00 mL/L; L-プロリン、700.0 mg/L; スクロース、68.5 g/L; D (+) グルコース、36.0 g/L; 10 mg/mL の2, 4-D、150 μL/L) を含む微量遠心管に無作為に分配した。所与の実験セットについて、3つの穂からプールされた胚をそれぞれの形質転換に使用した。

【0211】

アグロバクテリウム培養開始:

上記のバイナリー形質転換ベクターを含むアグロバクテリウムのグリセロールストックは、適切な抗生物質を含むAB最小培地プレート上に筋状にし、20℃にて3～4日間で増殖させた。単一のコロニーを採取し、同じ抗生物質を含むYEPプレート上に筋状にし、28℃にて1～2日間インキュベートした。

【0212】

アグロバクテリウム培養および共培養。アグロバクテリウムコロニーをYEPプレート

から採取し、50 mL 使い捨てチューブ中の10 mL 感染培地に懸濁した。細胞密度は、分光光度計を用いてOD_{600 nm}が0.2~0.4になるように調整した。アグロバクテリウム培養物を125 rpm、室温にてロータリーシェーカー上に置き、胚切除を行った。サイズが1.5~2.4 mm間の未熟接合胚は、滅菌トウモロコシ穀粒から単離し、1 mLの感染培地に入れ、同じ培地で1回洗浄した。アグロバクテリウム懸濁液(2 mL)をそれぞれのチューブに加え、チューブを10~15分間振とうプラットフォーム上に置いた。胚を共培養培地(MS塩、4.33 g/L; L-プロリン、700.0 mg/L; ミオ-イノシトール、100.0 mg/L; カゼイン酵素加水分解物 100.0 mg/L; 30 mMジカンバー-KOH、3.3 mg/L; スクロース、30.0 g/L; Gelzan (商標)、3.00 g/L; 改変されたMS-ビタミン[1000×]、1.00 mL/L; 8.5 mg/mLのAgNO₃、15.0 mg/L; DMSO、100 μM)に移し、胚盤を上に向けて配向し、50 μmole m⁻² sec⁻¹光強度の24時間光の下で25℃にて3日間インキュベートした。

【0213】

カルス選択および推定事象の再生。共培養期間後、胚を残りの培地(MS塩、4.33 g/L; L-プロリン、700.0 mg/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-ヘキサヒドロキシシクロヘキサン、100 mg/L; MES[(2-(n-モルホリノ)-エタンスルホン酸)、遊離酸] 0.500 g/L; カゼイン酵素加水分解物 100.0 mg/L; 30 mMジカンバー-KOH、3.3 mg/L; スクロース、30.0 g/L; Gelzan 2.30 g/L; 改変されたMS-ビタミン[1000×]、1.00 mL/L; 8.5 mg/mL AgNO₃、15.0 mg/L; カルベニシリン、250.0 mg/L) (選択剤を含まない)に移し、50 μmole m⁻² sec⁻¹光強度の24時間光の下で25℃にて3日間インキュベートした。

【0214】

増殖阻害用量応答実験により、0.25 mM以上のグリホサート濃度が非形質転換B104トウモロコシ株において細胞増殖を阻害するのに十分であることが示唆された。胚は、0.5 mMグリホサートを含む選択1培地(MS塩、4.33 g/L; L-プロリン、700.0 mg/L; ミオ-イノシトール、100.0 mg/L; MES[(2-(n-モルホリノ)-エタンスルホン酸)、遊離酸] 0.500 g/L; カゼイン酵素加水分解物 100.0 mg/L; 30 mMジカンバー-KOH、3.3 mg/L; スクロース、30.0 g/L; Gelzan (商標) 2.30 g/L; 改変されたMS-ビタミン[1000×]、1.00 mL/L; 8.5 mg/mL AgNO₃、15.0 mg/L; カルベニシリン、250.0 mg/L)に移され、暗所および/または50 μmole m⁻² sec⁻¹光強度の24時間光の下で28℃にて7~14日間インキュベートされた。

【0215】

増殖中の胚発生カルスは、1.0 mMグリホサートを含有する選択2培地(MS塩、4.33 g/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-ヘキサヒドロキシシクロヘキサン、100 mg/L; L-プロリン、700.0 mg/L; MES[(2-(n-モルホリノ)-エタンスルホン酸)、遊離酸] 0.500 g/L; カゼイン酵素加水分解物 100.0 mg/L; 30 mMジカンバー-KOH、3.3 mg/L; スクロース、30.0 g/L; Gelzan (商標) 2.30 g/L; 改変されたMS-ビタミン[1000×]、1.00 mL/L; 8.5 mg/mL AgNO₃、15.0 mg/L; カルベニシリン、250.0 mg/L; R-ハロキシホップ酸0.1810 mg/L)に移し、暗所および/または50 μmole m⁻² sec⁻¹光強度の24時間光の下で28℃にて14日間インキュベートされた。この選択工程は、トランスジェニックカルスをさらに増殖および分化させた。カルス選択期間を3~4週間継続した。

【0216】

増殖中の胚発生カルスは、0.5 mMグリホサート含有PreReg培地(MS塩、4.33 g/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-ヘキサヒドロキシシクロヘキサン、100 mg/L; L-プロリン、350.0 mg/L; MES[(2-(n-モルホリノ)-エタン

10

20

30

40

50

スルホン酸)、遊離酸] 0.250 g/L; カゼイン酵素加水分解物 50.0 mg/L; NAA-NaOH 0.500 mg/L; ABA-EtOH 2.50 mg/L; BA 1.00 mg/L; スクロース、45.0 g/L; Gelzan (商標) 2.50 g/L; 改変されたMS-ビタミン [1000×]、1.00 ml/L; 8.5 mg/ml AgNO₃、1.00 mg/L; カルベニシリン、250.0 mg/L) に移し、50 μmole m⁻² sec⁻¹ 光強度の24時間光の下で28℃にて7日間培養された。

【0217】

シュート様芽を有する胚発生カルスは、0.5 mMグリホサート含有再生培地 (MS塩、4.33 g/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-ヘキサヒドロキシシクロヘキサン、100.0 mg/L; スクロース、60.0 g/L; Gellman Gum G434 (商標) 3.00 g/L; 改変されたMS-ビタミン [1000×]、1.00 ml/L; カルベニシリン、125.0 mg/L) に移し、50 μmole m⁻² sec⁻¹ 光強度の24時間光の下で7日間培養された。

10

【0218】

一次根を有する小さなシュートは、Phytotray中の発根培地 (MS塩、4.33 g/L; 改変されたMS-ビタミン [1000×]、1.00 ml/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-ヘキサヒドロキシシクロヘキサン、100 mg/L; スクロース、60.0 g/L; Gellman Gum G434 (商標) 3.00 g/L; カルベニシリン、250.0 mg/L) に移し、140~190 μmole m⁻² sec⁻¹ 光強度の16/8時間の明/暗で27℃にて7日間インキュベートされた。推定されるトランスジェニック苗木は、上述のプロトコルを用いて、導入遺伝子のコピー数について分析され、土壤に移された。

20

【0219】

トウモロコシ植物内のdgt-28およびaad-1導入遺伝子の存在の分子確認。dgt-28およびaad-1のポリヌクレオチド配列の存在は、加水分解プローブアッセイによって確認された。単離されたT₀トウモロコシ植物は、最初に、aad-1とdgt-28導入遺伝子の存在を確認するために、TAQMAN (商標) に類似した加水分解プローブアッセイを介してスクリーニングされた。これらの研究から生じたデータは、導入遺伝子のコピー数を決定するために使用され、T₁世代へ戻し交配および進行のためのトランスジェニックトウモロコシ事象を選択するために使用された。

30

【0220】

組織試料を96ウェルプレートに回収し、組織浸軟は、Qiagen (商標) RLT緩衝液中でKLECO (商標) 組織粉碎機およびステンレス製ビーズ (Hoover Precision Products, Cumming, GA) を用いて行った。組織浸軟後、製造業者が示唆するプロトコルに従って、ゲノムDNAは、Biosprint 96 (商標) Plantキット (Qiagen, Germantown, MD) を用いて、ハイスループット形式で単離された。ゲノムDNAは、Quant-IT (商標) Pico Green DNAアッセイキット (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) によって定量した。定量されたゲノムDNAは、BIOROBOT 3000 (商標) 自動化液体ハンドラー (Qiagen, Germantown, MD) を用いて、加水分解プローブアッセイのために約2 ng/μLに調整された。TAQMAN (登録商標) アッセイに類似した加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子のコピー数の決定は、LIGHTCYCLER (登録商標) 480システム (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を用いたリアルタイムPCRによって行われた。アッセイは、LIGHTCYCLER (登録商標) Probe Design Software 2.0を用いて、aad-1、dgt-28および内部参照遺伝子インベルターゼ (Genbank受託番号: U16123.1) について設計された。増幅のために、LIGHTCYCLER (登録商標) 480プローブマスターミックス (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) は、aad-1とdgt-28についての0.4 μMの各ブ

40

50

ライマーおよび 0.2 μM の各プローブを含有する 10 μL 体積の多重反応において 1 × 最終濃度にて調製された (表 18)。

【0221】

二段階の増幅反応は、60℃にて40秒間の伸長を用いて行われ、蛍光を得た。すべての試料を行い、平均サイクル閾値 (Ct) をそれぞれの試料の分析に使用した。リアルタイムPCRデータの分析は、相対的な定量モジュールを用いた LightCycler (登録商標) ソフトウェアリリース 1.5 を使用して行われ、ΔΔCt 法に基づいている。対照は、それぞれの実行に含まれた単一コピー校正因子と既知の2つのコピーチェックからのゲノムDNAの試料を含んだ。表 19 は、加水分解プローブアッセイの結果を列挙する。

10

【0222】

【表 18】

表 18. aad-1、dgt-28 および内部参照(インペルターゼ)の加水分解プローブアッセイに使用されたプライマーおよびプローブ配列。

オリゴヌクレオチド名	検出された遺伝子	配列番号	オリゴ配列
GAAD1F	aad-1 フォワードプライマー	58	TGTTTCGGTTCCCTCTACCAA
GAAD1P	aad-1 プローブ	59	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA
GAAD1R	aad-1 リバープライマー	60	CAACATCCATCACCTTGACTGA
IV-プローブ	インペルターゼプローブ	61	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC
IVF-Taq	インペルターゼフォワードプライマー	62	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR-Taq	インペルターゼリバープライマー	63	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
zmDGT28 F	dgt-28 フォワードプライマー	64	TTCAGCACCCGTCAGAAT
zmDGT28 FAM	dgt-28 プローブ	65	TGCCGAGAACTTGAGGAGGT
zmDGT28 R	dgt-28 リバープライマー	66	TGGTCGCCATAGCTTGT

20

30

40

【0223】

【表 19】

表 19. dgt-28 事象に関する T_0 コピー量の結果。低コピー事象は、1～2 の導入遺伝子コピーからなり、単一コピー数は括弧に列挙される。高コピー事象は 3 つ以上の導入遺伝子コピーを含んだ。

形質転換に使用されたプラスミド	低コピー事象(単一コピー)の数	高コピー事象の数
pDAB107663	43 (31)	10
pDAB107664	30 (24)	5
pDAB107665	40 (27)	10
pDAB107666	24 (12)	12
pDAB109812	2 (1)	0
pDAB101556	25 (15)	10
pDAB107698	3 (1)	2

10

【0224】

dgt-28 形質転換されたトウモロコシにおける除草剤耐性。トウモロコシ (*Zea mays*) dgt-28 形質転換事象 (T_0) は、温室で順化させ、植物が、組織培養から温室内生育条件 (すなわち、2～4 の新しく、通常に見える葉が渦巻きから出現していた) に移行するまで成長させた。植物を温室で、27℃にて16時間の光：8時間の暗所の条件下で生育した。次に、植物を2%w/vの硫酸アンモニウムの添加とともに、DURANGO DMA (商標) (除草剤グリホサートを含む) の市販製剤で処理した。除草剤適用は、187L/haの噴霧量、50cmの噴霧高でトラック噴霧器を用いて行われた。 T_0 植物は、非形質転換トウモロコシ株に重大な損傷を与えることができる280～4480 g a e/haのグリホサートの範囲のグリホサートで噴霧された。致死量は、近交系 B104 に対して>95%損傷を引き起こす比率として定義される。

20

【0225】

T_0 dgt-28 トウモロコシ植物の結果は、グリホサートに対する耐性が最大4480 g a e/haまでの比率で達成されたことを実証した。特定の媒体タイプを T_0 世代に使用した。非形質転換対照と比較した、形質転換植物の最小発育阻害および全体の植物成長は、Trap5、Trap8、およびTrap23葉緑体輸送ペプチドに連結されたとき、dgt-28がグリホサートに対する強固な耐性を提供することを実証した。

30

【0226】

選択された T_0 植物は、次世代におけるさらなる特徴付けのために自家受粉され、または戻し交配される。 T_1 植物を含む100個の選ばれたdgt-28株は、140～1120 g a e/haのグリホシネートまたは105～1680 g a e/haのグリホサートで噴霧される。選択マーカーとグリホサート抵抗性遺伝子の両方は、同じプラスミド上に構築される。したがって、1つの除草剤耐性遺伝子が除草剤で噴霧することによって選択される場合、両方の遺伝子が存在すると考えられる。14DATで、抵抗性および感受性植物は、カイ二乗分析によって決定された単一遺伝子座の優性メンデル形質 (3R:1S) として分離された株の割合を決定するためにカウントされる。これらのデータは、dgt-28が、単子葉植物種において強固なグリホサート抵抗性遺伝子として遺伝され得ることを実証する。グリホサート比率の増加は、dgt-28遺伝子によって提供される耐性および保護をさらに特徴付けるために、 T_1 または F_1 生存者に適用される。

40

【0227】

dgt-28で形質転換された T_0 トウモロコシにおける発芽後の除草剤耐性。Trap4、Trap5、Trap8およびTrap23と連結されたdgt-28の T_0 事象は、アグロバクテリウム形質転換によって生成され、2～4枚の新しく、通常に見える葉が渦巻きから出現するまで、制御された成長チャンバー条件下で順化させた。植物は、個

50

々の識別番号が割り当てられ、d g t - 2 8 と a a d - 1 の両方のコピー数分析のためにサンプリングされた。コピー数分析に基づいて、タンパク質発現分析のための植物を選択した。植物を新しい成長培地とともに大きなポットに移植し、温室で27℃にて16時間の光：8時間暗所の条件で生育した。次に、タンパク質発現のためにサンプリングされなかった残りの植物を2% w/vの硫酸アンモニウムの添加とともにD U R A N G O D M A（商標）（グリホサート）の市販製剤で処理した。植物のそれぞれのグループがコピー数を変化させるT₀事象を含むように処置を分配させた。除草剤適用は、187 L/haの噴霧量、50 cmの噴霧高でトラック噴霧器を用いて行われた。T₀植物は、非形質転換トウモロコシ株に重大な損傷を与えることができる280～4480 g a e / h a のグリホサートの範囲のグリホサートで噴霧された。致死量は、近交系B104に対して> 95%損傷を引き起こす比率として定義される。B104は、形質転換体の遺伝的バックグラウンドであった。

10

【0228】

T₀ d g t - 2 8 トウモロコシ植物の結果は、グリホサートに対する耐性が最大4480 g a e / h a まで達成されたことを実証する。表20。非形質転換対照と比較した、形質転換植物の最小発育阻害および全体の植物成長は、T r a P 5、T r a P 8、およびT r a P 2 3に連結されたとき、d g t - 2 8 がグリホサートに対する強固な保護を与えることを実証した。

【0229】

【表20】

20

表20. 処置14日後の280～4480 g ae/haの範囲のグリホサート比率+2.0%w/v 硫酸アンモニウムに対する様々なコピー数のT₀ dgt-28事象の応答。

TraP4 dgt-28				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
280 g ae/ha	5	0	0	1.0	2.2	0-5
560 g ae/ha	6	0	0	2.0	4.0	0-10
1120 g ae/ha	12	0	0	1.3	3.1	0-10
2240 g ae/ha	7	0	0	1.7	4.5	0-12
4480 g ae/ha	7	0	0	1.1	3.0	0-8
TraP8 dgt-28				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	6	0	0	0.0	0.0	0
280 g ae/ha	5	1	0	6.7	8.8	0-20
560 g ae/ha	0	2	0	20.0	0.0	20
1120 g ae/ha	7	0	0	1.4	2.4	0-5
2240 g ae/ha	3	1	0	7.5	15.0	0-30
4480 g ae/ha	6	0	0	1.7	4.1	0-10
TraP23 dgt-28				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	6	0	0	0.8	2.0	0-5
280 g ae/ha	7	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1120 g ae/ha	10	2	0	3.3	7.8	0-20
2240 g ae/ha	6	0	0	1.3	3.3	0-8
4480 g ae/ha	6	1	0	4.3	7.9	0-20
TraP5 dgt-28				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
280 g ae/ha	7	1	0	5.0	14.1	0-40
560 g ae/ha	8	0	0	0.6	1.8	0-5
1120 g ae/ha	7	1	0	5.0	14.1	0-40
2240 g ae/ha	8	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	8	0	0	0.0	0.0	0

30

40

【0230】

標準的なE L I S Aによるタンパク質発現分析は、試験された構築物全体で12.6～

50

22. 5 ng/cm² の DGT-28 タンパク質の平均範囲を実証した。

【0231】

温室条件下での F₁ 世代におけるグリホサート耐性の確認。噴霧されなかった 1 コピーの T₀ 植物は、次世代においてさらなる特徴付けのために、非形質転換のバックグラウンド B104 に戻し交配された。T₁ 世代において、グリホサート耐性は、dgt-28 遺伝子の遺伝を確認するために評価された。T₁ 植物について、除草剤 ASSURE II (商標) (35 g ae/ha のキザロホップメチル) は、AAD-1 タンパク質を選択するための V1 成長段階で適用された。選択マーカーとグリホサート抵抗性遺伝子の両方は、同じプラスミド上に構築される。したがって、1 つの遺伝子が選択される場合、両方の遺伝子が存在すると考えられる。7 DAT 後、抵抗性および感受性植物をカウントし、ヌル植物を集団から除去した。これらのデータは、dgt-28 (v1) は、単子葉植物種において強固なグリホサート抵抗性遺伝子として遺伝することができることを実証する。標準的な ELISA および RNA 転写レベルによる DGT-28 タンパク質の特徴付けのために植物をサンプリングした。抵抗性植物は、前述のように、560~4480 g ae/ha のグリホサートで噴霧された。データは、4480 g ae/ha のグリホサートまで、葉緑体輸送ペプチド TraP4、TraP5、TraP8 および TraP23 と連結された dgt-28 の強固な耐性を実証する。

【0232】

【表 21】

表 21. 処置 14 日後の 560~4480 g ae/ha の範囲のグリホサート比率+2.0%w/v 硫酸アンモニウムに対する F₁ の 1 コピー dgt-28 事象の応答。

B104 / TraP4::dgt-28			損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)		
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0		
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0		
1120 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10		
2240 g ae/ha	4	0	0	2.5	2.9	0-5		
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0		
B104 / TraP8::dgt-28			損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)		
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0		
560 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5		
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0		
2240 g ae/ha	4	0	0	5.0	4.1	0-10		
4480 g ae/ha	4	0	0	6.3	2.5	5-10		
B104 / TraP23::dgt-28			損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)		
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0		
560 g ae/ha	3	1	0	10.0	10.0	5-25		
1120 g ae/ha	2	2	0	18.8	11.8	10-35		
2240 g ae/ha	4	0	0	12.5	2.9	10-15		
4480 g ae/ha	3	1	0	10.0	7.1	5-20		
B104 / TraP5::dgt-28			損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)		
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0		
560 g ae/ha	4	0	0	8.0	0.0	8		
1120 g ae/ha	4	0	0	11.3	3.0	8-15		
2240 g ae/ha	4	0	0	12.5	2.9	10-15		
4480 g ae/ha	4	0	0	10.0	2.5	10-15		
非形質転換 B104			損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)		
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0		
560 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100		
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100		
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100		
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100		

【0233】

タンパク質発現データは、 T_1 世代のタンパク質発現を確立する、 T_1 事象および試験された構築物全体で、 $42.2 \sim 88.2 \text{ ng/cm}^2$ のある範囲の平均 $DGT-28$ タンパク質を実証する。

【0234】

野外条件下の $dgt-28$ トウモロコシの特徴付け。1 コピーの T_1 事象は、さらなる特徴付けのために、ハイブリッドヘミ接合種子と近交系ホモ接合種子の両方を作製するために野外場所に搬送された。ハイブリッド種子は、トウモロコシ形質転換株 B104 における T_1 事象を、事象について 1 : 1 (ヘミ接合 : ヌル) を分離するハイブリッド集団を生成する近交株 4XP811 に交配させることによって作製された。得られた種子は、2 つの別々の場所に搬送された。構築物あたり 5 つの 1 コピー事象の合計は、3 重の無作為化された完全ブロック設計のそれぞれの場所で植え付けられた。野外は、V4 成長段階で生じさせるためのグリホサート適用、および V8 成長段階で適用される植物の別のグループについて設計された。4XP811 / B104 の従来のハイブリッドを陰性対照として使用した。

10

【0235】

実験行は、ヌル分離体を排除するために、 184 g ae/ha の ASSURE II (商標) (106 g ai/L のキザロホップメチル) で処理された。すべての実験エントリーは、ASSURE II (商標) 適用に関して 1 : 1 (感受性 : 抵抗性) ($p = 0.05$) を分離した。選択された抵抗性植物は、標準的な ELISA によって $DGT-28$ タンパク質の定量化のためにそれぞれの事象からサンプリングされた。

20

【0236】

キザロホップメチル抵抗性植物は、V4 または V8 成長段階のいずれかで 2.5 w/v 硫酸アンモニウム の添加とともに、市販の除草剤 DURANGO DMA (商標) (480 g ae/L のグリホサート) で処理された。除草剤適用は、 187 L/ha の体積、 50 cm の噴霧高を送達するように校正されたブーム噴霧器を用いて行われた。植物は、非形質転換トウモロコシ株に対して重大な損傷を与えることができる $1120 \sim 4480 \text{ g ae/ha}$ のグリホサートのある範囲のグリホサートで噴霧された。致死量は、4XP811 近交系に対して $> 95\%$ 損傷を引き起こす比率として定義される。視覚的損傷評価は、7、14 および 21 DAT (処置後の日数) での視覚的な白化の割合、壊死の割合、成長阻害の割合および全視覚的損傷について行われた。評価は、それぞれの株および陰性対照について、未処理チェックと比較された。

30

【0237】

すべての評価時期の視覚的損傷データは、場所と適用時期の両方で、最大 4480 g ae/ha までの DURANGO DMA (商標) に対する強固な耐性を実証した。V4 適用に関する代表的な事象は 1 つの場所から示され、他の事象、適用時期および場所と一致している。表 22。Trap23 (pDAB107665) と連結された $dgt-28$ を含む構築物からの 1 つの事象は、AAD-1 タンパク質について ASSURE II (商標) 選択に対して耐性であったが、適用されたすべての比率のグリホサートに感受性であった。

【0238】

40

【表 2 2】

表 22. V4 成長段階で 1120～4480g ae/ha の範囲のグリホサート+2.5%w/v 硫酸アンモニウムで適用された dgt-28 事象の応答。

4XPB11//B104/TraP4::dgt-28				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP8::dgt-28				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP23::dgt-28				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP5::dgt-28				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
非形質転換 4XPB11//B104				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

【0 2 3 9】

追加の評価は、4 4 8 0 g ae/ha のグリホサート比率について、再生成長段階中に行われた。房、受粉時期および穂の膨らみの視覚的評価は、すべての構築物、適用時期および場所について、それぞれの株の未処理チェックと同様であった。DGT-28 タンパク質の定量結果は、1 8 6 . 4 ～ 3 0 3 . 0 n g / c m ² のある範囲の平均タンパク質発現を実証した。データは、最大 4 4 8 0 g ae/ha のグリホサートまで再生成長段階を通じて、野外条件下で dgt-28 形質転換されたトウモロコシの強固な耐性を実証する。また、データは、噴霧耐性結果に基づいて、DGT-28 タンパク質の検出および機能を実証した。

【0 2 4 0】

ホモ接合状態における dgt-28 トウモロコシの遺伝可能性および耐性の確認。T₁ S₂ から種子は、前述のように、温室条件下で植え付けられた。野外条件下で特徴付けた同じ 5 つの 1 コピー株は均一な状態で特徴付けた。植物は、V3 成長段階まで成長させ、1 1 2 0 ～ 4 4 8 0 g ae/ha のグリホサート (DURANGO DMA (商標)) の範囲の 3 つの比率のグリホサートおよび処理あたり 4 つの複製に分離された。適用は、前述のようにトラック噴霧器で行われ、2 . 0 % w / v の硫酸アンモニウムにおいて製剤化された。硫酸アンモニウムの適用は、それぞれの株に対して未処理のチェックとして用いた。前述のように、視覚的評価は処置から 7 日後および 1 4 日後に行われた。データは、試験されたすべての事象について、最大 4 4 8 0 g ae/ha のグリホサートまで強

固な耐性を実証した。表 2 3。

【0 2 4 1】

【表 2 3】

表 23. 1120~4480g ae/ha のある範囲のグリホサート+2.0%w/v の硫酸アンモニウムで適用されたホモ接合 dgt-28 事象の応答。

TraP4::dgt-28			損傷%			損傷%
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	3.8	2.5	0-5
4480 g ae/ha	4	0	0	14.3	1.5	12-15
TraP8::dgt-28			損傷%			損傷%
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10
4480 g ae/ha	4	0	0	11.3	2.5	10-15
TraP23::dgt-28			損傷%			損傷%
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	4.5	3.3	0-8
2240 g ae/ha	4	0	0	7.5	2.9	5-10
4480 g ae/ha	4	0	0	15.0	0.0	15
TraP5::dgt-28			損傷%			損傷%
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5
2240 g ae/ha	4	0	0	9.0	2.0	8-12
4480 g ae/ha	4	0	0	15.0	2.4	12-18
非形質転換 B104			損傷%			損傷%
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

【0 2 4 2】

野外条件下で耐性でない p D A B 1 0 7 6 6 5 からの株はグリホサートに対して耐性を示さず、したがって、野外観察と一致する（データ示さず）。前述の 1 つの株を除いて、株からグリホサートで処理したすべての複製物は、グリホサートに対して感受性でなかった。したがって、データは、メンデル様式で d g t - 2 8 トウモロコシの均質な集団に対する遺伝可能性を実証する。標準的な E L I S A による D G T - 2 8 タンパク質の発現は、グリホサートに耐性であった 1 コピー事象全体で 2 7 . 5 ~ 6 5 . 8 n g / c m ² のある範囲の平均タンパク質発現を実証した。データは、機能的タンパク質、および世代全体で D G T - 2 8 タンパク質の安定性を実証する。

【0 2 4 3】

選択マーカーとしてのグリホサートの発芽後の除草剤耐性使用。前述したように、T₀ 形質転換植物を組織培養から移動させ、温室内で順化させた。試験された事象は、T r a p 5、T r a P 8、および T r a P 2 3 葉緑体輸送ペプチドに連結された d g t - 2 8 を含有した。これらの T₀ 植物は最大 4 4 8 0 g a e / h a までのグリホサートに強固な耐性を提供し、非形質転換植物は、2 8 0 g a e / h a 程度に低い濃度のグリホサートで制御されたことが実証された。これらのデータは、d g t - 2 8 が、2 8 0 ~ 4 4 8 0 g a e / h a の範囲のグリホサートの濃度を用いる選択マーカーとして利用され得ることを実証する。

【0 2 4 4】

d g t - 2 8 導入遺伝子を含むトウモロコシの固定された株からの多数の種子が、多数

の非形質転換トウモロコシ種子に混ぜられた。種子を植え付け、V1～V3発育段階まで生育させ、その時点で、苗木は、280～4480 g ae/haの範囲でグリホサートの選択用量を用いて噴霧される。7～10日後に、感受性および抵抗性植物をカウントし、グリホサート耐性植物の量は、植え付けられるdgt-28導入遺伝子を含むトランスジェニック種子の元の数と相関する。

【0245】

dgt-28トウモロコシのスタッキング。AAD-1タンパク質は、研究目的のためにdgt-28形質転換されたトウモロコシにおいて選択マーカーとして使用される。また、aad-1遺伝子は、作物における最大V8適用までに強固な2, 4-D耐性を提供するために、トウモロコシにおける除草剤耐性の形質として利用することができる。構築物pDAB107663 (Trap4::dgt-28)、pDAB107664 (Trap8::dgt-28) およびpDAB107666 (Trap5::dgt-28) からの4つの事象は、グリホサートおよび2, 4-Dのタンク混合適用の耐性について特徴付けられた。特徴付け研究は、温室条件下でF₁種子を用いて完了された。適用は、前述されるように、以下の比率：1120～2240 g ae/haのグリホサート (dgt-28遺伝子について選択的である)、1120～2240 g ae/haの2, 4-D (aad-1遺伝子について選択的である)、または記載される比率での2つの除草剤のタンク混合物でトラック噴霧器において行われた。植物は7および14 DATで等級付けされた。2240 g ae/haの除草剤の適用についての噴霧結果を表24に示す。

【0246】

【表24】

表 24. 処置 14 日後、2240g ae/ha の 2,4-D、グリホサートおよび 2 つの除草剤のタンク混合物の組み合わせを用いて噴霧された F₁ aad-1 および dgt-28 トウモロコシの応答。

F ₁ 事象	2240 g ae/ha 2,4-D		2240 g ae/ha グリホサート		2240 g ae/ha 2,4-D + 2240 g ae/ha グリホサート	
	平均損傷%	Std. Dev.	平均損傷%	Std. Dev.	平均損傷%	Std. Dev.
107663[3]-012.AJ001	5.0	4.1	3.8	4.8	8.8	3.0
107663[3]-029.AJ001	2.5	5.0	1.3	2.5	5.0	5.8
107663[3]-027.AJ001	2.5	2.9	11.8	2.9	13.8	2.5
107663[3]-011.AJ001	3.8	2.5	11.5	1.0	12.8	1.5
B104	27.5	17.7	100.0	0.0	100.0	0.0

【0247】

結果は、dgt-28がaad-1と首尾よく積層できることを確認し、したがって、対象とする作物に適用され得るスペクトル除草剤 (dgt-28およびaad-1についてそれぞれグリホサート+フェノキシ酢酸) を増やす。防除が難しい広葉雑草または抵抗性雑草生物型が存在する作物生産において、積層は雑草防除および対象とする作物の保護の手段として使用され得る。追加のインプットまたはアウトプット特性はまた、トウモロコシおよび他の植物におけるdgt-28遺伝子を用いて積層することができる。

【0248】

ダイズ形質転換。安定に組み込まれたdgt-28導入遺伝子を含むトランスジェニックダイズ (Glycine max) は、アグロバクテリウムを媒介したダイズ子葉節外植片の形質転換を介して生成された。機能的dgt-28を含有するバイナリーベクターを担持する安全化されたアグロバクテリウム株は、形質転換を開始するために使用された。

【0249】

アグロバクテリウムを媒介した形質転換は、Zengら (Zeng P., Vadnais D.A., Zhang Z., Polacco J.C., (2004), Plant Cell Rep., 22(7): 478-482) の修正された半子葉節手法を用いて行われた。簡単に説明すると、ダイズ種子 (品種マーベリック) が基本培地で発芽され、子葉節が単離され、アグロバクテリウムで感染させた。シュート開始、シュー

ト伸長、および発根培地には、アグロバクテリウムを除去するためのセフトキシム、チメンチンおよびバンコマイシンが補足される。除草剤を介した選択は、非形質転換シュートの生育を阻害するために使用された。選択されたシュートは、根の発育のために発根培地に移され、次に、苗木の順化のための土壌ミックスに移される。

【0250】

選択された苗木の末端の小葉は、推定の形質転換体をスクリーニングするために、除草剤（葉塗装技術）で局所的に処理された。スクリーニングされた苗木は、温室に移され、順化させ、次に、除草剤で葉を塗装し、耐性を再確認した。これらの推定の形質転換された T_0 植物をサンプリングし、分子分析を用いて、除草剤選択マーカーおよびdgt-28導入遺伝子の存在を確認した。 T_0 植物を温室で自家受粉させ、 T_1 種子を作製した。

10

【0251】

第2のダイズ形質転換法を用いて、追加のトランスジェニックダイズ植物を作製することができる。機能的dgt-28を含むバイナリーベクターを担持する安全化されたアグロバクテリウム株を使用して、形質転換を開始する。

【0252】

アグロバクテリウムを媒介した形質転換は、Paz et al. (Paz M., Martinez J., Kalvig A., Fonger T., and Wang K., (2005) Plant Cell Rep., 25: 206-213) の修正された半種子手法を用いて実施された。簡単に説明すると、成熟ダイズ種子は、塩素ガスで一晩滅菌され、アグロバクテリウムを媒介した植物形質転換の20時間前に滅菌 H_2O を吸収させた。種子は、種子を分離し、種皮を除去するために、ヘそに沿って長手方向の切り込みによって半分に切断される。胚軸は切除され、いずれもの軸方向のシュート／芽は子葉節から除去された。得られた半種子の外植片をアグロバクテリウムで感染させた。シュート開始、シュート伸長、および発根培地には、アグロバクテリウムを除去するためのセフトキシム、チメンチンおよびバンコマイシンが補足された。除草剤選択は、非形質転換シュートの生育を阻害するために使用された。選択されたシュートは、根の発育のために発根培地に移され、次に、苗木の順化のための土壌ミックスに移された。

20

【0253】

推定の形質転換された T_0 植物をサンプリングし、分子分析を用いて、選択マーカーおよびdgt-28導入遺伝子の存在を確認した。いくつかの事象は、導入遺伝子を含むものとして同定された。これらの T_0 植物は、さらなる分析に進められ、温室で自家受粉され、 T_1 種子を生じさせた。

30

【0254】

T_1 世代へのdgt-28の遺伝可能性の確認。 T_1 世代へのDGT-28タンパク質の遺伝可能性は、2つの方法のうちの1つにおいて評価された。第1の方法は、メトロミックス培地に T_1 種子を植え付け、第1の三つ葉成長段階で発芽した植物に411g a e / h a のIGNITE（商標）280SLを適用することを含んだ。第2の方法は、ボールベアリングとジェノグライnderを用いて、全8回の反復について種子を均質化することからなっていた。次に、PATタンパク質を検出するためのELISAストリップ試験は、選択マーカーがdgt-28と同じプラスミド上にあるため、遺伝可能な事象を検出するために使用された。単一の植物がグルホシネートに耐性であった場合、またはPAT ELISAストリップ試験で検出された場合のいずれの方法について、事象は、 T_1 世代への遺伝可能性を実証した。

40

【0255】

全5つの構築物は、前述のように、遺伝可能性についてスクリーニングされた。プラスミドは、Trap4、Trap8およびTrap23と連結されたdgt-28を含んだ。構築物全体の事象は、 T_1 世代へのPAT：：DGT-28タンパク質の遺伝可能性が68%であることを実証した。

【0256】

dgt-28形質転換 T_1 ダイズにおける発芽後の除草剤耐性。前述のスクリーニング法によって、遺伝可能性であることが決定された T_1 事象由来の種子は、温室条件下でメ

50

トロミックス培地に植え付けられた。第1の三つ葉が完全に展開されるまで植物を生育させ、前述のように、pat遺伝子の選択のために411 g a e / h a のIGNITE (商標) 280 SLで処理した。それぞれの事象由来の抵抗性植物は、固有の識別子を与えられ、dgt-28遺伝子の接合性分析のためにサンプリングされた。接合性データは、十分な植物が存在する場合に処理あたり全4つの複製物について可能にする、適用されたそれぞれの比率のグリホサートに、2つのヘミ接合複製物と2つのホモ接合複製物を割り当てるために使用された。これらの植物は、野生型のプチハバナタバコと比較された。すべての植物は、187 L / h a で設定されたトラック噴霧器で噴霧された。植物は、560 ~ 4480 g a e / h a の範囲のDURANGO (商標) ジメチルアミン塩 (DMA) から噴霧された。すべての適用は、2 % w / v の硫酸アンモニウム (AMS) の添加とともに水中で製剤化された。植物は、処理の7日および14日後に評価された。植物は、全体的な視覚的な発育阻害、白化、および壊死に関して損傷評価が割り当てられた。T₁世代は分離されているので、いくつかの変数応答は接合性の違いにより期待される。

10

【0257】

【表 2 5】

表 25. 噴霧結果は、14DAT(処置後の日数)で、特徴付けられた構築物あたり少なくとも 1 つの dgt-28 事象の最大 4480g ae/ha のグリホサートまで強固な耐性を実証する。構築物の代表的な 1 コピーの事象はすべて、マーベリック陰性対照と比較して、最大 4480g ae/ha までの耐性を提供した。

pDAB107543 (TraP4::dgt-28)	損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	4	0	33.8	7.5	25-40
1120 g ae/ha	2	2	0	25.0	11.5	15-35
2240 g ae/ha	2	2	0	17.5	2.9	15-20
4480 g ae/ha	0	2	2	33.8	13.1	20-45
pDAB107545 (TraP8::dgt-28)	損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.5	1.0	0-2
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	5.0	2.4	2-8
4480 g ae/ha	4	0	0	9.5	1.9	8-12
pDAB107548 (TraP4::dgt-28)	損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.8	2.4	0-5
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	3.5	1.7	2-5
4480 g ae/ha	4	0	0	8.8	3.0	5-12
pDAB107553 (TraP23::dgt-28)	損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	5.0	0.0	5
1120 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10
2240 g ae/ha	4	0	0	10.5	1.0	10-12
4480 g ae/ha	4	0	0	16.5	1.7	15-18
マーベリック(陰性対照)	損傷%			損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	82.5	12.6	70-100
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

【0 2 5 8】

T₂ 世代における高いグリホサート率に対する d g t - 2 8 保護。4 5 個の植物の後代検定は、構築物あたり d g t - 2 8 の 2 ~ 5 個の T₂ 株に対して行われた。ホモ接合体株は、前の世代に完成した接合性分析に基づいて選択された。前述のように種子を植え付けた。次に、植物は、前述のような p a t 選択マーカーの選択のために、4 1 1 g a e / h a の I G N I T E 2 8 0 S L で噴霧された。3 D A T 後、抵抗性および感受性植物をカウントした。

【0 2 5 9】

d g t - 2 8 と連結された T r a P 4 を含む構築物 (p D A B 1 0 7 5 4 3 および p D A B 1 0 7 5 4 8) について、試験された 1 2 個の株のうち 9 個は分離せず、それによ

て、 T_2 世代において均一な株を確認した。 $dgt-28$ と連結された $TraP8$ を含む株 ($pDAB107545$) は、4つの株のうち2つは分離がないことを実証し、ダイズにおける $dgt-28$ の少なくとも2つの世代を介したメンデル遺伝を実証した。組織試料は、抵抗性植物から採取され、 $DGT-28$ タンパク質は、標準的な $ELISA$ 法によって定量された。データは、試験された非分離の T_2 株について、 $32.8 \sim 107.5 \text{ ng/cm}^2$ のある範囲の平均 $DGT-28$ タンパク質を実証した。構築物 $pDAB107553$ ($TraP23::dgt-28$) 由来の株は、グルホシネートで以前に選択されなかった。グリホサートの用量反応は、均質性と高い比率のグリホサートに対する耐性を試験するために利用された。構築物 $pDAB107553$ 由来の株からの複製物は、 $560 \sim 4480 \text{ g ae/ha}$ のグリホサートの範囲の比率に耐性であり、したがって、少なくとも2つの世代で均質な集団であり、遺伝可能性であることが確認された。

【0260】

$560 \sim 4480 \text{ g ae/ha}$ のグリホサートの範囲の $DURANGO$ DMA の比率は、前述のように2～3個の三つ葉のダイズに適用された。 $14DAT$ の視覚的損傷データは、 T_1 世代において実証された耐性結果を確認した。

【0261】

【表26】

表 26. データは、非形質転換対照と比較した、2つの世代を通じて、最大 3360 g ae/ha のグリホサートまで $dgt-28$ タバコの強固な耐性を実証する。

pDAB107543 (TraP4::dgt-28)	損傷%			損傷%		
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
適用比率						
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	8.0	0.0	8
1120 g ae/ha	4	0	0	14.3	1.5	12-15
2240 g ae/ha	4	0	0	18.0	0.0	18
4480 g ae/ha	0	4	0	24.5	3.3	20-28
pDAB107545 (TraP8::dgt-28)	損傷%			損傷%		
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
適用比率						
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	5.0	0.0	5
4480 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
pDAB107548 (TraP4::dgt-28)	損傷%			損傷%		
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
適用比率						
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
pDAB107553 (TraP23::dgt-28)	損傷%			損傷%		
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
適用比率						
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	-	0.0	0.0
560 g ae/ha	4	0	0	-	10.0	0.0
1120 g ae/ha	4	0	0	-	10.0	-4.4
2240 g ae/ha	4	0	0	-	13.0	-2.4
4480 g ae/ha	3	1	0	-	15.5	4.1
マーベリック(陰性対照)	損傷%			損傷%		
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
適用比率						
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	77.5	15.0	70-100
1120 g ae/ha	0	0	4	97.5	2.9	95-100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

【0262】

dgt-28を用いたイネの形質転換。安定に組み込まれたdgt-28導入遺伝子を含むトランスジェニックイネ（コメ（*Oryza sativa*））は、滅菌したイネ種子のアグロバクテリウムを媒介した形質転換を介して生成される。機能的dgt-28を含むバイナリーベクターを担持する安全化されたアグロバクテリウム株は、形質転換を開始するために使用される。

【0263】

培養培地は、1MのKOHでpH5.8に調整され、2.5g/lのPhytigel（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）で固化される。胚発生カルスは、30mlの半固形培地を含む100×20mmのペトリ皿中で培養される。イネ苗木は、MAGENTAボックス中の50mlの培地上で生育される。細胞懸濁液は、35mLの液体培地を含む125mlのコニカルフラスコ中で維持され、125rpmで回転させる。胚発生培養の誘導および維持は、25～26℃にて暗所で発生させ、植物再生および全植物体培養は、16時間の光周期（Zhangら、1996）を用いて照明の部屋で発生させる。

【0264】

胚発生カルスの誘導および維持は、前述されるような改変されたNB基礎培地（Liら、1993）上で行われ、ここで、培地は、500mg/Lのグルタミンを含むように適合される。懸濁培養物は、マルトースの代わりに30g/Lのスクロースを含む、SZ液体培地（Zhangら、1998）中で開始され、維持される。浸透培地（NBO）は、それぞれ0.256Mのマニトールとソルビトールの添加を伴うNB培地からなる。除草剤抵抗性カルスは、3～4週間、適切な除草剤選択剤が補足されたNB培地上で選択される。プレ再生は、1週間、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）、1mg/lの α -ナフタレン酢酸（NAA）、5mg/lのアブシジン酸（ABA）と選択的除草剤を含むNB培地からなる培地（PRH50）上で行われる。苗木の再生は、推定上、トランスジェニックシュートが再生されるまで、2,4-D、0.5mg/lのNAAおよび選択的除草剤を含有するNB培地を含む再生培地（RNH50）上での培養に続く。シュートは、1%スクロースと選択的除草剤が補足された、半強度のMurashigeおよびSkog基本塩とGamborgのB5ビタミンを含む発根培地に移される。

【0265】

コメ（*Oryza sativa*）L. ジャポニカ品種Taipai309の成熟乾燥種子は、Zhangら、1996に記載されるように滅菌される。胚発生組織は、暗所においてNB培地上で滅菌成熟イネ種子を培養することによって誘導される。約1mm径の一次カルスは、胚盤から取り出され、SZ液体培地中で細胞懸濁を開始するために使用される。次に、懸濁液は、Zhang、1996に記載されるように維持される。懸濁誘導された胚発生組織は、先の継代培養から3～5日後、液体培地から取り出され、NBO浸透培地上に配置され、ペトリ皿全体において約2.5cmの円を形成し、照射前4時間、培養される。照射の16～20時間後、組織をNBO培地からNBH50選択培地に移し、照射表面が上を向いていることを確認し、暗所にて14～17日間インキュベートされる。次に、新たに形成されたカルスは、元の照射された外植片から分離され、同じ培地上で、近くに配置される。さらに8～12日後、比較的コンパクトであり、不透明なカルスは、視覚的に識別され、暗所での7日間、PRH50プレ再生培地に移される。次に、よりコンパクトで不透明になる成長中のカルスは、16時間の光周期の下で14～21日間、RNH50再生培地上で継代培養される。再生中のシュートは、1/2のMSH50培地を含むMAGENTAボックスに移される。単一の外植片から再生された複数の植物は、同胞種であると考えられ、1つの独立した植物株として処理される。植物は、厚く、白い根を生成し、1/2のMSH50培地上で積極的に成長している場合、dgt-28遺伝子について陽性として採点される。苗木がMAGENTAボックスの最上部に達すると、100%湿度で1週間、6cmポット中の土壌に移され、次に、30℃にて14時間の光周期の成長チャンバーに移動させ、温室において13cmポットに移植される前に、21℃にて2～3週間

10

20

30

40

50

、暗所に配置される。種子を回収し、4℃で保存する前に1週間、37℃で乾燥させる。

【0266】

dgt-28 イネのT₀ 分析。アグロバクテリウム形質転換方法を介して得られた植え付けられたイネ形質転換体を培地に移植し、温室条件に順化させた。すべての植物は、dgt-28のPCR検出のためにサンプリングされ、結果は、pDAB110827 (Trap8::dgt-28) について22個のPCR陽性事象と、pDAB110828 (Trap23::dgt-28) について16個のPCR陽性事象の最小を実証する。PCR陽性事象のdgt-28についてのサザン分析は、両方の構築物について単一(1~2コピー) 事象を実証した。選択されたT₀ 事象のタンパク質発現は、DGT-28タンパク質の発現が、検出レベル未満から130ng/cm²の範囲であることを実証した。構築物pDAB110828からの選択されたT₀ 事象は、前述されるように2240g/haのDURANGO DMA (商標) で処理され、処置の7および14日後に評価された。データは、適用されたグリホサートの比率に強固な耐性を実証した。すべてのPCR陽性植物は、さらなる特徴付けのためにT₁ 種子を生成させた。

10

【0267】

イネにおけるdgt-28 遺伝可能性。100個の植物後代検定は、葉緑体輸送ペプチドTrap8を含む構築物pDAB110827からのdgt-28の4つのT₁ 株において行われた。種子は、培地で満たされたポットに植えられた。次に、すべての植物は、前述されるように、dgt-28 遺伝子の選択について、560g/haのDURANGO DMA (商標) で噴霧された。7DAT後、抵抗性および感受性の植物をカウントした。それぞれの構築物について試験された4つの株のうちの2つは、カイ二乗分析によって決定されるように、単一の遺伝子座の優性メンデル形質(3R:1S) として分離された。dgt-28は、複数種における遺伝可能なグリホサート抵抗性遺伝子である。

20

【0268】

dgt-28 形質転換されたT₁ イネにおける発芽後の除草剤耐性。後代検定において使用されるそれぞれの事象からのT₁ 抵抗性植物は、固有の識別子が与えられ、dgt-28 遺伝子の接合性分析のためにサンプリングされた。接合性データは、処理あたり全4つの複製物について可能にする、適用されたそれぞれの比率のグリホサートに、2つのヘミ接合複製物と2つのホモ接合複製物を割り当てるために使用された。これらの植物は、野生型のキタアケイネと比較された。すべての植物は、187L/haで設定されたトラック噴霧器で噴霧された。植物は、560~2240g/haの範囲のDURANGO DMA (商標) から噴霧された。すべての適用は、2%w/vの硫酸アンモニウム(AMS) の添加とともに水中で製剤化された。植物は、処理の7日および14日後に評価された。植物は、全体的な視覚的な発育阻害、白化、および壊死に関して損傷評価が割り当てられた。T₁ 世代は分離されているので、いくつかの変数応答は接合性の違いにより期待される。

30

【0269】

噴霧結果は、7DAT (処置後の日数) で、高い比率のグリホサートに対する最小植物損傷が検出されたことを実証する (データ示さず)。

40

【0270】

【表 27】

表 27. 14DAT での視覚的損傷データは、最大 2240g ae/ha のグリホサートまでの 15%未満の平均視覚的損傷を実証する。

TraP8::dgt-28 事象 1				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
TraP8::dgt-28 事象 2				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3.8	4.8	0-10
1120 g ae/ha	4	0	0	12.0	3.6	8-15
2240 g ae/ha	4	0	0	15.0	6.0	8-20
非形質転換対照				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	81.3	2.5	80-85
1120 g ae/ha	0	0	4	95.0	5.8	90-100
2240 g ae/ha	0	0	4	96.3	4.8	90-100

10

【0271】

DGT-28 のタンパク質検出は、pDAB110827 から試験された 4 つすべての T₁ 株からの複製物について評価された。データは、DGT-28 平均タンパク質が、ヘミ接合複製物とホモ接合複製物について、それぞれ 20~82 ng/cm² と 21~209 ng/cm² の範囲であることを実証した。これらの結果は、T₁ 世代に対する安定なタンパク質発現と、選択のために使用された 560 g ae/ha のグリホサート適用後の最大 2240 g ae/ha のグリホサートまでの dgt-28 イネの耐性を実証した。

20

【0272】

dgt-28 を用いたタバコの形質転換。タバコ (cv. Petit Havana) の葉片は、dgt-28 導入遺伝子を含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) を用いて形質転換された。dgt-28 導入遺伝子を含むプラスミドを含有する単一コロニーは、スペクチノマイシン (50 µg/mL) とストレプトマイシン (125 µg/mL) を含有する 4 mL の YEP 培地に植菌され、190 rpm の振とう機上で一晩 28℃ にてインキュベートされた。その後、4 mL の種子培養物を用いて、125 mL のバッフルされた三角フラスコ中で同じ培地の 25 mL の培養物を植菌した。この培養物は、OD₆₀₀ が約 1.2 に達するまで 190 rpm で振とうしながら 28℃ にてインキュベートされた。次に、10 mL のアグロバクテリウム懸濁液は、滅菌した 60×20 mm のペトリ (商標) 皿に配置された。

30

【0273】

Phytatrays (商標) (Sigma, St. Louis, MO) における 30 g/L のスクロースを含む MS 培地 (Phyto technology Labs, Shawnee Mission, KS) 上で無菌で成長させた植物の新鮮なカットされた葉片 (0.5 cm²) は、アグロバクテリウムの 10 mL の一晩培養物に数分間浸漬させ、滅菌ろ紙上にブロット乾燥させ、次に、1 mg/L インドール酢酸および 1 mg/L の 6-ベンジルアミノプリンの添加を伴う同じ培地上に配置された。3 日後、dgt-28 導入遺伝子を保有するアグロバクテリウムと共培養された葉片は、5 mg/L の Basta (商標) および 250 mg/L のセフォタキシムを含む同じ培地に移された。

40

【0274】

3 週間後、個々の T₀ 苗木は、土壌に移植され、温室に移される前にさらに 3 週間、10 mg/L の Basta (商標) および 250 mg/L のセフォタキシムを含む MS 培地に移された。選択された T₀ 植物 (上述の分子分析プロトコールを用いて同定される) は

50

、自家受粉され、完全に乾燥したとき、種子をカプセルから回収した。T₁ 実生は、接合性およびレポーター遺伝子発現（後述）についてスクリーニングされ、d g t - 2 8 導入遺伝子を含む選択された植物を同定した。

【0275】

植物は、根から寒天を洗浄し、13.75cmの正方形ポット中の土壌に移植し、ポットをZiploc（登録商標）バッグ（SC Johnson & Son, Inc.）に置き、バッグの底に水道水を入れ、間接光中の30℃の温室に1週間置くことによって温室に移動された。3～7日後、バッグを開封した；植物を受精し、植物が温室で順化されるまで開封したバッグで成長させた。その時点でバッグを除去した。植物は、通常の暖かい温室条件（日中27℃、夜間24℃、日中16時間、最小の自然光+補足光=1200 μE/m² s⁻¹）下で成長させた。

10

【0276】

繁殖前に、T₀ 植物をDNA分析のためにサンプリングし、リアルタイムPCRによってインサートd g t - 2 8のコピー数を決定した。新鮮な組織をチューブに入れ、4℃にて2日間凍結乾燥した。組織が完全に乾燥した後、タングステンビーズ（Valenite）をチューブ中に配置し、試料をKelcoビーズミルを用いた1分間の乾式粉碎に供した。次に、標準のDNeasy（商標）DNA単離手法を続けた（Qiagen, DNeasy 69019）。抽出したDNAのアリコートでピコグリーン（Molecular Probes P7589）で染色し、既知の標準とともに蛍光光度計（BioTek（商標））において読み出し、濃度（ng/μl）を得た。総DNAの全100ngを鋳型として使用した。PCR反応は、9700 Gene amp（商標）サーモサイクラー（Applied Biosystems）において実施され、試料を94℃で3分間と、94℃で30秒間、64℃にて30秒間および72℃で1分45秒の35サイクル、ならびに72℃で10分間に供した。PCR産物をEtBrで染色した1%アガロースゲル上の電気泳動によって分析し、サザンブロットによって確認した。

20

【0277】

異なる葉緑体輸送ペプチド配列を含む3つの構築物（Trap4、Trap8とTrap23）からのd g t - 2 8 遺伝子の1～3コピーを有する5～9個のPCR陽性事象を再生し、温室に移した。

【0278】

30

すべてのPCR陽性植物は、標準的なELISAによってDGT-28タンパク質の定量的ためにサンプリングされた。DGT-28タンパク質は、すべてのPCR陽性植物において検出され、タンパク質濃度が増加する傾向は、d g t - 2 8 のコピー数の増加とともに注目された。

【0279】

タバコにおけるaad-12（v1）遺伝可能性。100個の植物の後代検定は、構築物あたりd g t - 2 8 の5つのT₁ 株について行われた。構築物は、以下の葉緑体輸送ペプチド配列：Trap4、Trap8またはTrap23の1つを含んだ。種子は、大部分、上記で例示されたアラビドプシス属手法のように、層状にし、播種され、植え付けられたが、ヌル植物は、植え付け前に初期の選択によって除かれなかったことを除く。次に、すべての植物は、前述されるように、pat選択マーカーの選択のために、280 gae/haのIGNITE 280 SLで噴霧された。3DAT後、抵抗性および感受性植物をカウントした。

40

【0280】

それぞれの構築物について試験された5つの株のうちの4つは、カイ二乗分析によって決定されるように、単一の遺伝子座の優性メンデル形質（3R：1S）として分離された。d g t - 2 8 は、複数種における遺伝可能なグリホサート抵抗性遺伝子である。

【0281】

d g t - 2 8 形質転換されたT₁ タバコにおける発芽後の除草剤耐性。後代検定において使用されるそれぞれの事象からのT₁ 抵抗性植物は、固有の識別子が与えられ、d g t

50

ー 28 遺伝子の接合性分析のためにサンプリングされた。接合性データは、処理あたり全 4 つの複製物について可能にする、適用されたそれぞれの比率のグリホサートに、2 つのヘミ接合複製物と 2 つのホモ接合複製物を割り当てるために使用された。これらの植物は、野生型のプチハバナ (Petite havana) タバコと比較された。すべての植物は、187 L/ha で設定されたトラック噴霧器で噴霧された。植物は、560~4480 g ae/ha の範囲の DURANGO DMA (商標) から噴霧された。すべての適用は、2% w/v の硫酸アンモニウム (AMS) の添加とともに水中で製剤化された。植物は、処理の 7 日および 14 日後に評価された。植物は、全体的な視覚的な発育阻害、白化、および壊死に関して損傷評価が割り当てられた。T₁ 世代は分離されているので、いくつかの変数応答は接合性の違いにより期待される。

10

【0282】

噴霧結果は、7 DAT (処置後の日数) で、高い比率のグリホサートに対する最小植物損傷が検出されたことを実証する (データ示さず)。14 DAT 後、視覚的損傷データは、構築物 TraP8 と TraP23 からの単一コピーの事象と比較して、TraP4 を含む構築物の単一コピー事象を用いて損傷の増加を実証する。表 28。

【0283】

【表 28】

表 28. 2240g ae/ha のグリホサートの比率で、37.5% の平均損傷は TraP4 を含む事象を用いて実証された。この場合、TraP8 と TraP23 を含む事象は、それぞれ 9.3% と 9.5% の平均損傷を実証した。

20

TraP4::dgt-28 (pDAB107543)				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	2	2	0	18.0	8.1	10-25
1120 g ae/ha	1	3	0	24.5	4.9	18-30
2240 g ae/ha	0	3	1	37.5	6.5	30-45
4480 g ae/ha	0	2	2	42.5	2.9	40-45
TraP8::dgt-28 (pDAB107545)				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3.3	3.9	0-8
1120 g ae/ha	4	0	0	6.5	1.7	5-8
2240 g ae/ha	4	0	0	9.3	3.0	5-12
4480 g ae/ha	2	2	0	17.5	6.5	10-25
TraP23::dgt-28 (pDAB107553)				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	10.0	1.6	8-12
1120 g ae/ha	4	0	0	8.8	3.0	5-12
2240 g ae/ha	4	0	0	9.5	4.2	5-15
4480 g ae/ha	4	0	0	15.8	1.5	15-18
プチハバナ				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	85.0	4.1	80-90
1120 g ae/ha	0	0	4	91.3	2.5	90-95
2240 g ae/ha	0	0	4	94.5	3.3	90-98
4480 g ae/ha	0	0	4	98.3	2.4	95-100

30

40

【0284】

これらの結果は、最大 4480 g ae/ha のグリホサートまでの dgt-28 の耐性、ならびに dgt-28 遺伝子に連結された葉緑体輸送ペプチド配列によって与えられる耐性における相違を実証した。

【0285】

50

T₂世代における高いグリホサート比率に対するdgt-28保護。25個の植物の後代検定は、構築物あたりdgt-28の2～3個のT₂株について行われた。ホモ接合体株は、前の世代において完成された接合性分析に基づいて選択された。前述のように、種子を層状にし、播種し、および移植した。次に、すべての植物は、前述のように、pat選択マーカーの選択のために、280g ae/haのIgnite 280SLで噴霧された。3DAT後、抵抗性と感受性の植物をカウントした。それぞれの構築物について試験されたすべての株は分離せず、それによって、T₂世代において均一な株を確認し、タバコにおけるdgt-28の少なくとも2つの世代を介したメンデル遺伝を実証した。

【0286】

420～3360g ae/haのグリホサートの範囲のDURANGO DMA（商標）の比率は、前述したように、2～3枚の葉タバコに適用された。視覚的損傷データ14DATは、T₁世代において実証された耐性の結果を確認した。TraP4を含む構築物由来の2コピー株からの葉面結果が単一コピーのTraP8とTraP23株と同様の耐性を示した（データは示さず）。

【0287】

【表29】

表 29. dgt-28 を含む TraP4 を含有する構築物由来の単一コピー株は、dgt-28 を含む TraP8 と TraP23 を含有する構築物由来の株と比較して高い損傷を実証した。

TraP4::dgt-28 (pDAB107543)				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	0	4	0	23.8	4.8	20-30
840 g ae/ha	0	4	0	30.0	4.1	25-35
1680 g ae/ha	0	4	0	35.0	5.8	30-40
3360 g ae/ha	0	4	0	31.3	2.5	30-35
TraP8::dgt-28 (pDAB107545)				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha	4	0	0	2.5	2.9	0-5
1680 g ae/ha	4	0	0	9.3	3.4	5-12
3360 g ae/ha	4	0	0	10.5	1.0	10-12
TraP23::dgt-28 (pDAB107553)				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha	4	0	0	6.3	2.5	5-10
1680 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
3360 g ae/ha	3	1	0	13.8	4.8	10-20
プチハバナ				損傷%		
適用比率	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
0 g ae/ha グリホサート	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	0	0	4	95.0	0.0	95
840 g ae/ha	0	0	4	98.8	1.0	98-100
1680 g ae/ha	0	0	4	99.5	1.0	98-100
3360 g ae/ha	0	0	4	100	0.0	100

【0288】

データは、非形質転換対照と比較して、2つの世代を通じて最大3360g ae/haのグリホサートまでdgt-28タバコの強固な耐性を実証する。

【0289】

それぞれの事象から選択された植物は、標準的なDGT-28 ELISAによって、DGT-28タンパク質の分析のために、グリホサート適用前にサンプリングされた。データは、72.8～114.5ng/cm²の範囲の構築物全体で単一（1～2コピー）

株のDGT-28平均タンパク質発現を実証した。データは、形質転換されたタバコのT₂世代において、dgt-28がタンパク質を発現していることを実証し、耐性データは、機能的なDGT-28タンパク質を確認する。

【0290】

タバコ (cv. Petit Havana) 中の除草スペクトルを増加させるためのdgt-28のスタッキング。ホモ接合dgt-28 (pDAB107543とpDAB107545) およびaad-12 v1 (pDAB3278) 植物 (後者についてPCT/US2006/042133参照) はともに相互交雑され、F₁ 種子を回収した。それぞれの遺伝子の2つの相互交雑からのF₁ 種子は層状にされ、それぞれの交雑の処理された6個の代表は、1120 g ae/haのグリホサート (dgt-28 遺伝子について選択的である) 、1120 g ae/haの2, 4-D (aad-12 遺伝子について選択的である) 、または記載される比率での2つの除草剤のタンク混合物で処理された。植物は、14DATで等級付けされた。噴霧結果を表30に示す。

【0291】

【表30】

表 30. F₁ aad-12 と dgt-28 の応答。

	aad-12 x TraP4::dgt-28	aad-12 x TraP8::dgt-28	プチハバナ
適用比率	耐性		
1120 g ae/ha 2,4-D	++++	++++	-
1120 g ae/ha グリホサート	++	++	-
1120 g ae/ha 2,4-D + 1120 g ae/ha グリホサート	++	++	-

【0292】

結果は、dgt-28がaad-12 (v1) と首尾よく積層され得ることを確認し、したがって、対象とする作物に適用され得るスペクトル除草剤 (dgt-28 および aad-12 についてそれぞれグリホサート+フェノキシ酢酸) を増やす。防除が難しい広葉雑草または抵抗性雑草生物型が存在する作物生産において、積層は雑草防除および対象とする作物の保護の手段として使用され得る。追加のインプットまたはアウトプット特性はまた、dgt-28 遺伝子を用いて積層することができる。

【0293】

コムギにおけるグリホサートに対する抵抗性。DGT-28をコードするバイナリーベクターの製造。DGT-28発現およびPAT選択カセットを含むバイナリーベクターを設計し、当該技術分野において一般的に知られている技法および技術を用いて組み立てた。それぞれのDGT-28発現カセットは、プロモーター、トウモロコシ (Zea mays) 由来のユビキチン (Ubi) 遺伝子からの5' 非翻訳領域とイントロン (Toki et al., Plant Physiology 1992, 100 1503-07) 、続く5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ遺伝子 (DGT-28) の合成バージョンの5' 端に融合された4つの輸送ペプチドのうちの1つ (TraP4、TraP8、TraP23またはTraP5) からなるコード配列を含み、植物における発現にコドン最適化されている。DGT-28発現カセットは、トウモロコシ (Z. mays) 由来のリパーゼ遺伝子 (Vp1) の転写ターミネーターとポリアデニル化部位を含む3' 非翻訳領域 (UTR) (Paek et al., Mol. Cells 1998 30;8(3) 336-42) を用いて終了させた。PAT選択カセットは、プロモーター、コメ (Oryza sativa) 由来のアクチン (Act1) 遺伝子からの5' 非翻訳領域とイントロン (McElroy et al., The Plant Cell 1990 2(2) 163-171) 、続くストレプトマイセス・ビリドロモゲネス (Streptomyces viridochromogenes) から単離されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) 遺伝子の合成バージョンから構成され、植物における発現にコドン最適化されている。PAT遺伝子は、ホスフィノトリシン、グルホシネート、およびビアラホスを含むグルタミン合成酵素の阻害剤に対する抵抗性を付与するタンパク質をコードする (Wohllleben et al., Gene 1988, 70(1), 25-37) 。選択カセットは、転写ターミネーターとカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35s遺伝

子 (Chenault et al., Plant Physiology 1993 101 (4), 1395-1396) からのポリアデニル化部位を含む 3' UTR で終了された。

【0294】

選択カセットは、市販の遺伝子合成販売会社 (Gene Art、Life Technologies) によって合成され、およびゲートウェイ対応のバイナリーベクターにクローニングされた。DGT-28 発現カセットを pDONR221 にサブクローニングした。得られたエントリークローンは、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) 発現カセットをコードするゲートウェイ対応のバイナリーベクターを用いて、LR クロナーゼ II (Invitrogen、Life Technologies) 反応に使用された。すべての組み立てられたプラスミドのコロニーは、最初に、New England Biolabs (NEB; Ipswich, MA) と Promega (Promega Corporation, WI) から得られた制限エンドヌクレアーゼを用いて、精製された DNA の制限消化によってスクリーニングされた。プラスミド DNA 調製物は、供給業者の指示に従って、QIAprep Spin Miniprep キット (Qiagen、Hilden) または Pure Yield Plasmid Maxiprep システム (Promega Corporation, WI) を用いて実施された。選択されたクローンのプラスミド DNA は、ABI Sanger Sequencing と Big Dye Terminator v3.1 サイクル配列決定プロトコール (Applied Biosystems、Life Technologies) を用いて配列決定された。配列データを集め、SEQUENCHER (商標) ソフトウェア (Gene Codes Corporation、Ann Arbor, MI) を用いて分析した。

【0295】

得られた 4 つのバイナリー発現クローン: pDAS000122 (Trap4-DGT28)、pDAS000123 (Trap8-DGT28)、pDAS000124 (Trap23-DGT28) および pDAS000125 (Trap5-DGT28) はそれぞれ、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) 株 EH A105 に形質転換された。

【0296】

dgt-28 発現構築物を用いたトランスジェニックコムギ事象の生成。4 つの DGT-28 発現構築物のうちの 1 つを発現するトランスジェニックコムギ植物は、Wu ら、Transgenic Research 2008、17:425-436 に類似したプロトコールに従って、ドナーコムギ株 Bobwhite MPB26RH を使用して、アグロバクテリウムを媒介した形質転換によって生成された。推定される T0 トランスジェニック事象は、ホスフィノトリシン (PPT) 耐性について選択され、表現型は PAT 選択マーカーによって付与され、土壌に移された。T0 植物を温室の閉じ込められた条件下で成長させ、T1 種子を作製した。全体として、約 45 個の独立した T0 事象が、それぞれの DGT-28 発現構築物について生成された。

【0297】

T0 コムギ dgt-28 コムギ事象におけるグリホサート抵抗性。T0 事象を温室で順化させ、2~4 枚の新しく、通常に見える葉が渦巻きから出現するまで成長させた (すなわち、植物は、組織培養から温室生育条件に移行された)。植物は、成熟するまで温室で 12 時間の補足照明下で、25℃ にて成長させた。グリホサート耐性と Taqman 分析の初期スクリーニングは、前述したように、同じ条件下で成長させた T1 植物について完了された。データは、さらに特徴付けられる遺伝可能な T1 事象の決定を可能にした。6 つの低コピー (1~2 コピー) と 2 つのマルチコピー T1 事象は、温室条件下で植え替えられ、3 葉期まで成長させた。T1 植物は、非形質転換のコムギ株に重大な損傷を与えることができる 420~3360 g ae/ha の範囲のグリホサートの市販製剤 (Durango DMA (商標)) で噴霧された。2% w/v の硫酸アンモニウムの添加は適用に含まれた。致死量は、Bob White MPB26RH 非形質転換対照に対して >

75%損傷を引き起こす比率として定義される。除草剤を適用した。

【0298】

この実施例では、グリホサート適用は、 T_1 世代におけるdgt-28遺伝子の分離を決定すること、ならびにグリホサートの増加レベルに対する耐性を実証することについて利用された。植物の応答は、処理から21日後(DAT)の視覚的損傷の規模に関して提示される。データは、25%未満の視覚損傷(4)、25%~50%の視覚損傷(3)、50%~75%の視覚損傷(2)、および75%を超える損傷(1)を提示する個体のヒストグラムとして示される。算術平均および標準偏差は、コムギ形質転換のために使用される各構築物について提示されている。個別の応答におけるスコア範囲もまた、それぞれの比率および形質転換に関して、最後の列に示される。野生型、非形質転換コムギ(栽培品種Bob White MPB26RH)は、グリホサート感受性対照として用いた。 T_1 世代において、ヘミ接合およびホモ接合植物は、それぞれの事象についての試験に利用可能であり、したがって、試験されたグリホサートのそれぞれの比率について含まれた。ヘミ接合植物は、ホモ接合植物としての遺伝子の用量の半分を含み、したがって、グリホサートに対する応答の変動性は、 T_1 世代で予想され得る。

10

【0299】

T_1 のdgt-28コムギ植物の結果は、グリホサートに対する耐性が、葉緑体輸送ペプチドTrap4、Trap5、Trap8およびTrap23を用いて、最大3360 gae/haの比率で達成されることを実証した。表31。データは、低コピーの T_1 事象のものであるが、それぞれの構築物について、集団の代表的なものである。

20

【0300】

【表 3 1】

表 31. 処置から 21 日後のグリホサートに対する低コピーの T_1 の *dgt-28* コムギ事象の応答。

TraP4::<i>dgt-28</i>		損傷%				損傷%		
適用比率		<25%	25-50%	50-75%	>75%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
420 g ae/ha		5	0	0	0	4.00	0.00	4
840 g ae/ha		6	2	0	0	3.75	0.46	3-4
1680 g ae/ha		4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
3360 g ae/ha		4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
TraP8::<i>dgt-28</i>		損傷%				損傷%		
適用比率		<25%	25-50%	50-75%	>75%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
420 g ae/ha		5	3	0	0	3.63	0.52	3-4
840 g ae/ha		3	5	0	0	3.38	0.52	3-4
1680 g ae/ha		4	3	0	0	3.57	0.53	3-4
3360 g ae/ha		5	5	0	0	3.50	0.53	3-4
TraP23::<i>dgt-28</i>		損傷%				損傷%		
適用比率		<25%	25-50%	50-75%	>75%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
420 g ae/ha		9	2	0	0	3.82	0.40	3-4
840 g ae/ha		8	1	0	0	3.89	0.33	3-4
1680 g ae/ha		7	5	0	0	3.58	0.0	3-4
3360 g ae/ha		8	2	0	0	3.80	4.8	3-4
TraP5::<i>dgt-28</i>		損傷%				損傷%		
適用比率		<25%	25-50%	50-75%	>75%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
420 g ae/ha		5	2	0	0	3.71	0.49	3-4
840 g ae/ha		4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
1680 g ae/ha		7	3	0	0	3.70	0.48	3-4
3360 g ae/ha		6	0	0	0	4.00	0.00	3-4
Bobwhite MPB26RH		損傷%				損傷%		
適用比率		<25%	25-50%	50-75%	>75%	Ave	Std. Dev.	範囲(%)
420 g ae/ha		0	1	1	10	1.25	0.62	1-3
840 g ae/ha		0	0	0	10	1.00	0.00	1
1680 g ae/ha		0	0	0	12	1.17	0.58	1-3
3360 g ae/ha		0	0	0	10	1.00	0.00	1

【0301】

21 DATで、抵抗性および感受性植物をカウントし、カイ二乗分析によって決定されるように、単一の遺伝子座の優性メンデル形質（3 R : 1 S）として分離された株の割合を決定する。表 3 2。これらのデータは、*dgt-28* が単子葉植物種において強固なグリホサート抵抗性遺伝子として遺伝可能であることを実証する。

【0302】

【表 3 2】

表 32. 420～3360g ae/ha の範囲の比率でのグリホサート選択に基づくメンデル様式における遺伝可能性を実証した構築物による T_1 の *dgt-28* 事象の割合。

構築物 ID	CTP:GOI	単一遺伝子座で分離された試験された T_1 事象%	2つの遺伝子座で分離された試験された T_1 事象%	試験された T_1 事象数
pDAS000122	TraP4:: <i>dgt-28</i>	62.5%	37.5%	8
pDAS000123	TraP8:: <i>dgt-28</i>	87.5%	12.5%	8
pDAS000124	TraP23:: <i>dgt-28</i>	12.5%	87.5%	8
pDAS000125	TraP5:: <i>dgt-28</i>	62.5%	0.0%	8

【実施例 4】

【0303】

トウモロコシにおける農学的に重要な導入遺伝子を発現させるためのキメラ葉緑体輸送ペプチド (T r a P) 配列

C r y 2 A a :

バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) 由来の C r y 2 A a タンパク質は、アメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) (C E W) およびヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) (E C B) に対して活性を実証した。c r y 2 A a 遺伝子 (配列番号 10) の単一バージョンは、トウモロコシのための偏ったコドンであり、トウモロコシにおいて試験された。この実験では、C r y 2 A a は、単独で、およびトウモロコシにおける T r a P 8 キメラ葉緑体輸送ペプチドと組み合わせて評価され、昆虫耐性活性を決定し、T r a P 8 v 2 キメラ葉緑体輸送ペプチド配列がトウモロコシにおける C r y 2 A a タンパク質の発現に及ぼす効果を評価した。

10

【0304】

T r a P 8 v 2 キメラ葉緑体輸送ペプチド配列 (配列番号 8) を含む p D A B 1 0 9 8 0 7 構築物および G C A コドンリンカーは、c r y 2 A a 遺伝子の上流にクローニングされ、トウモロコシ植物における昆虫耐性試験のために構築物 p D A B 1 0 9 8 0 7 に組み込まれた (図 11)。得られた構築物は 2 つの植物転写単位 (P T U) を含有した。第 1 の P T U は、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン 1 プロモーター (Z m U b i 1 プロモーター; Christensen, A., Sharrock R., and Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, Plant Molecular Biology, 18:675-689)、T r a P 8 - c r y 2 A a 融合遺伝子 (T r a P 8 C r y 2 A a)、およびトウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ 3' 非翻訳領域 (Z m L i p 3' U T R; 米国特許第 7, 179, 902 号) を含んでいた。制限酵素消化および配列決定によって、構築物を確認した。第 2 の P T U は、サトウキビ桿菌状ウイルスプロモーター (S C B V プロモーター; 米国特許第 6, 489, 462 号)、M S V リーダーとアルコールデヒドロゲナーゼ 1 イントロン 6 を含有する a a d - 1 除草剤耐性遺伝子 (A A D - 1; 米国特許第 7, 838, 733 号、および M S V リーダー配列; G e n b a n k 受託番号 F J 882146. 1、およびアルコールデヒドロゲナーゼイントロン; G e n b a n k 受託番号 E F 539368. 1)、およびトウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ 3' 非翻訳領域 (Z m L i p 3' U T R) を含んでいた。c r y 2 A a 遺伝子の上流に葉緑体輸送ペプチド配列を含まない対照プラスミドである p D A B 1 0 7 6 8 7 を構築し、研究に含めた (図 12)。プラスミドは、植物形質転換用のアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) に導入された。

20

30

【0305】

トウモロコシ (*Zea mays*) の栽培品種 B 1 0 4 由来の穂を受粉から 10 ~ 12 日後に回収した。回収された穂は脱穀され、市販の漂白剤 (U l t r a C l o r o x (登録商標) 殺菌漂白剤、6. 15 % 次亜塩素酸) と T w e e n 20 の 2 滴の 20 % 溶液中で 20 分間浸漬させることによって表面殺菌し、層流フード内で滅菌した脱イオン水中で 3 回濯いた。未熟接合胚 (1. 8 ~ 2. 2 mm の長さ) は、それぞれの穂から無菌的に切り出され、2 μ l の 10 % B r e a k - T h r u (登録商標) S 2 3 3 界面活性剤を添加した 2. 0 m l のアグロバクテリウム懸濁液を含む 1 つまたは複数の微量遠心管に分配された。

40

【0306】

胚単離活動が完了すると、胚のチューブを閉じ、5 分間ロッカープラットフォーム上に置いた。チューブの内容物は、共培養培地のプレートに注ぎ出し、液体アグロバクテリウム懸濁液は、無菌の使い捨てトランスファーピペットを用いて取り出された。胚を含む共培養プレートは、30 分間、蓋を少し開けた層流フードの背面に配置させた; その時間後、胚は、顕微鏡を用いて、胚盤が上を向くように配向させた。次に、胚との共培養プレートは、さらに 15 分間、蓋を少し開けた層流フードの背面に戻された。その後、プレート

50

を閉じ、3 Mマイクロポアテープで密封し、約 $60 \mu\text{mol}$ の $m-2s-1$ の光強度で 24 時間／日の光を用いて、 25°C にてインキュベーターに置かれた。

【0307】

共培養期間後、胚を休息培地に移した。36 個以下の胚をそれぞれのプレートに移した。プレートを 3 Mマイクロポアテープでラップし、7～10 日間、約 $50 \mu\text{mol}$ の $m-2s-1$ の光強度で 24 時間／日の光を用いて、 27°C にてインキュベートした。次に、カルス胚を選択 I 培地に移した。18 個以下のカルス胚を選択 I のそれぞれのプレートに移した。プレートを 3 Mマイクロポアテープでラップし、7 日間、約 $50 \mu\text{mol}$ の $m-2s-1$ の光強度で 24 時間／日の光を用いて、 27°C にてインキュベートした。次に、カルス胚を選択 I I 培地に移した。12 個以下のカルス胚を選択 I I のそれぞれのプレートに移した。プレートを 3 Mマイクロポアテープでラップし、14 日間、約 $50 \mu\text{mol}$ の $m-2s-1$ の光強度で 24 時間／日の光を用いて、 27°C にてインキュベートした。

10

【0308】

この段階で、抵抗性カルスをプレ再生培地に移した。9 個以下のカルスをプレ再生のそれぞれのプレートに移した。プレートを 3 Mマイクロポアテープでラップし、7 日間、約 $50 \mu\text{mol}$ の $m-2s-1$ の光強度で 24 時間／日の光を用いて、 27°C にてインキュベートした。次に、再生中のカルスを Phytatray (商標) 中の再生培地に移し、7～14 日間またはシュートが発生するまで、約 $150 \mu\text{mol}$ の $m-2s-1$ の光強度で、1 日あたり 16 時間光／8 時間暗所で 28°C にてインキュベートした。5 個以下のカルスをそれぞれの Phytatray (商標) に置いた。次に、一次根を有する小さなシュートを単離し、シュート／根培地に移した。約 6 cm 以上の高さの根ざした苗木を土壌に移植し、ハードニングのために成長チャンバーに移動させた。

20

【0309】

トランスジェニック植物は、全体で固有の識別子が割り当てられ、温室に定期的に移された。植物は、成長培地 (Premier Tech Horticulture、ProMix BX、0581P) で充填された小さなポット (T. O. Plastics、3.5 インチ (8.89 cm) SVD、700022C) に、Phytatray (商標) から移植され、加湿ドームで覆われ、植物を順化させた。植物は、V3～V4 段階に達するまで、Conviron (商標) 成長チャンバー ($28^\circ\text{C}/24^\circ\text{C}$ 、16 時間の光周期、50～70% RH、 $200 \mu\text{mol}$ の光強度) 内に配置された。これは、土壌および厳しい温度に植物を順化させることに役立った。次に、植物を温室 (光曝露タイプ：光または同化；光の上限：1200 PAR；16 時間の日の長さ；日中 27°C ／夜間 24°C) に移動させ、小さなポットから 5.5 インチ (13.97 cm) ポットに移植した。大きなポットに移植してから約 1～2 週間後、植物をバイオアッセイのためにサンプリングした。事象あたり 1 つの植物をバイオアッセイした。

30

【0310】

選択事象は、遺伝子のコピー数に基づく次世代への進行、ウエスタンブロットによるタンパク質検出、およびバイオアッセイ昆虫に対する活性について同定された。スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む事象が注目されたが、必ずしも進行から省略されなかった。進行のために選択された事象は、5 ガロン (19 L) のポットに移植された。観察は、いずれかの異常な表現型を追跡するために定期的に行われた。浮遊花粉による交雑汚染を防止するために、シュート袋を毛 (silk) の出現前にシュート上に置いた。覆いの前に毛を生成しているいずれものシュートを注目し、シュートを除去した。次に、第 2 のシュートを覆い、受粉のために使用した。異常シュートを生成した植物またはシュートが全くない植物をデータベースに記録した。受粉の前日に毛を刈り込み、花粉を受け入れるように均一なブラシを与え、植物を自家受粉させた。

40

【0311】

T_1 選択のための植物は、播種の 7 日後に噴霧された。それらは、フラットあたり 15 ポットで、Metro 360 の鉢植え用土の 4 インチ (10.16 cm) ポットにおいて成長させた。実生の成長段階は、V1～V1.5 であった。発芽が乏しいまたは非常に

50

小さな植物（渦巻きがまだ閉じている）を含むポットに印を付け、それらを選択評価に含めなかった。次に、植物の全フラットは、トラック噴霧器適用用の二次キャリアトレイに入れられた。トレイは、Mandelトラック噴霧器において一度に2つ配置され、8002Eフラットファンノズル（TeetJet）を使用して標的領域に体積187L/haを送達するように校正された。35g ae/haのAssure II（キザロホップ）+1%COC（穀物油濃縮物）の溶液は適用のために製剤化された。15ml/噴霧の体積を用いて、必要とされる総噴霧溶液を算出した。計算； $(35 \text{ g ae/ha}) \times (1 \text{ ha/187 L}) \times (1 \text{ L/97.7 g ae Assure II}) = 0.192\%$ 溶液または28.74 $\mu\text{l}/15 \text{ ml H}_2\text{O} + 1\% \text{ v/v}$ 。次に、適用後、植物を温室に戻す前に、噴霧室で1時間乾燥させた。大きなポットに移植してから約1～2週間後、植物をバイオアッセイのためにサンプリングした。事象あたり1つの植物はバイオアッセイした。

10

【0312】

分子解析スクリーニングを通過したT₀事象のすべては、Cry2Aaタンパク質発現レベルについて分析された。Trapを含まないCry2Aaを含む対照構築物であるpDAB107687からの事象は、Trap8を含むpDAB109807（5.0 ng/cm²）からの事象と比較して、Cry2Aaの有意に高い平均発現レベル（15.0 ng/cm²）を有していた。pDAB109807事象の発現レベルの低下にもかかわらず、これらの事象はなおもCry2Aaタンパク質を発現した。

20

【0313】

また、T1事象はCry2Aaタンパク質発現レベルについて分析された。Trapを含まないCry2Aaを含む対照構築物であるpDAB107687からの事象は、Trap8を含むpDAB109807（約20～40 ng/cm²）からの事象と比較して、Cry2Aaの有意に高い平均発現レベル（55および60 ng/cm²）を有した。pDAB109807事象の発現レベルの低下にもかかわらず、これらの事象はなおもCry2Aaタンパク質を発現した。

【0314】

単一のBt遺伝子を含むトランスジェニック植物は、該トランスジェニック植物からの葉の上に新生児鱗翅類の幼虫を用いて行われたバイオアッセイにおける殺虫活性について試験された。アッセイされた鱗翅目種は、ヨーロッパコンボレー、ヨーロッパアワノメイガ（Ostrinia nubilalis）（Hubner）（ECB）、およびトウモロコシヤークワーム、アメリカタバコガ（Helicoverpa zea）（CEW）であった。

30

【0315】

32ウェルトレイ（C-D International、Pitman、NJ）は、2%寒天溶液で部分的に満たされ、寒天を固化させた。約1 in²の葉のセクションは、それぞれの植物から採取され、32ウェルトレイのウェルに単独で入れられた。1枚の葉片をそれぞれのウェルに入れ、2つの葉片を植物あたりおよび昆虫あたり試験した。昆虫は、ペイントブラシを用いて大量に群棲させ、それぞれのウェルに10匹の新生児幼虫を入れた。トレイは、試験中に換気を可能にする有孔粘着性の蓋で密封された。トレイは、28℃にて、40%RH、16時間光：8時間暗所で3日間置かれた。試験期間後、単純な損傷割合スコアをそれぞれの葉片について得た。それぞれの試験についての損傷スコアを平均し、相関分析を行うために、タンパク質発現解析と一緒に使用した。

40

【0316】

T₀とT₁のバイオアッセイの結果は、Trap8キメラ葉緑体輸送ペプチド配列が機能的であり、pDAB109807事象が試験された昆虫に対して保護を与えたことを示した。T1事象では、Trapを含まないCry2Aaタンパク質（pDAB107687）を発現する植物は、試験されたすべての昆虫種全体でTrap8を有するCry2Aaタンパク質（pDAB109807）を発現する植物と有意に異なる平均の葉損傷を有した。Trap（pDAB107687）を有さないCry2Aaタンパク質を発現する植物が、Trap8（pDAB109807）を有するCry2Aaタンパク質を

50

発現する植物と比較して、より高いレベルのタンパク質を発現したということを考えると、これらの結果は驚くべきものであった。

【0317】

VIP3Ab1:

バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) 由来の Vip3Ab1 タンパク質は、アメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) (CEW) およびツマジロクサヨトウ (FAW) および抵抗性ツマジロクサヨトウ (rFAW) に対する活性を実証した。vip3Ab1 v6 (配列番号11) および vip3Ab1 v7 (配列番号12) 遺伝子が発現させ、トウモロコシにおける昆虫耐性について試験した。この実験では、vip3Ab1 v6 と vip3Ab1 v7 は、単独で、およびトウモロコシにおける Trap8 キメラ葉緑体輸送ペプチドと組み合わせて評価され、昆虫耐性活性を決定し、Trap8 v2 キメラ葉緑体輸送ペプチド配列がトウモロコシにおける Vip3Ab1 v6 と Vip3Ab1 v7 タンパク質の発現に及ぼす影響を評価した。

【0318】

Trap8 v2 キメラ葉緑体輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列 (配列番号8) および GCA コドンリンカーを含む pDAB111481 (図13) 構築物は、トウモロコシ植物における昆虫耐性のために vip3Ab1 v6 遺伝子の上流にクローニングされ試験された。得られた構築物は2つの植物転写単位 (PTU) を含有した。第1のPTUは、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン1プロモーター (*ZmUbi1* プロモーター; Christensen, A., Sharrock R., and Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, *Plant Molecular Biology*, 18:675-689)、Trap8-vip3Ab1 v6 融合遺伝子 (Trap8-vip3Ab1 v6)、およびトウモロコシ (*Zea mays*) ペルオキシダーゼ5' 3' 非翻訳領域 (*ZmPer5* 3' UTR) を含んでいた。構築物は、制限酵素消化と配列決定を介して確認された。第2のPTUは、サトウキビ桿菌状ウイルスプロモーター (SCBV プロモーター; 米国特許第6, 489, 462号)、MSV リーダーとアルコールデヒドロゲナーゼ1イントロン6を含有する aad-1 除草剤耐性遺伝子 (AAD-1; 米国特許第7, 838, 733号、およびMSV リーダー配列; Genbank 受託番号 FJ882146.1、およびアルコールデヒドロゲナーゼイントロン; Genbank 受託番号 EF539368.1)、およびトウモロコシ (*Zea mays*) リパーゼ3' 非翻訳領域 (*ZmLip* 3' UTR) を含んでいた。vip3Ab1 v6 遺伝子の上流に葉緑体輸送ペプチド配列を含まない対照プラスミドである pDAB111479 を構築し、研究に含めた (図14)。プラスミドは、植物形質転換用のアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) に導入された。

【0319】

Trap8 v2 キメラ葉緑体輸送ペプチド配列 (配列番号8) および GCA コドンリンカーを含む pDAB111338 (図15) 構築物は、トウモロコシ植物における昆虫耐性試験のために vip3Ab1 v7 遺伝子の上流にクローニングされ、試験された。得られた構築物は2つの植物転写単位 (PTU) を含有した。第1のPTUは、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン1プロモーター (*ZmUbi1* プロモーター; Christensen, A., Sharrock R., and Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, *Plant Molecular Biology*, 18:675-689)、Trap8-vip3Ab1 v7 融合遺伝子 (Trap8-vip3Ab1 v7)、およびトウモロコシ (*Zea mays*) ペルオキシダーゼ5' 3' 非翻訳領域 (*ZmPer5* 3' UTR) で構成された。構築物は、制限酵素消化と配列決定を介して確認された。第2のPTUは、サトウキビ桿菌状ウイルスプロモーター (SCBV プロモーター; 米国特許第6, 489, 462号)、MSV リーダーとアルコールデヒドロゲナーゼ1イントロン6を含有する aad-1 除草剤耐性遺伝子 (AAD-1; 米国特許第7, 838

、733号、およびMSVリーダー配列；Genbank受託番号FJ882146.1、およびアルコールデヒドロゲナーゼイントロン；Genbank受託番号EF539368.1）、およびトウモロコシ（Zea mays）リパーゼ3'非翻訳領域（ZmLip3'UTR）で構成された。Vip3Ab1v7遺伝子の上流に葉緑体輸送ペプチド配列を含まない対照プラスミドであるpDAB112710を構築し、研究に含めた（図16）。プラスミドは、植物形質転換用のアグロバクテリウム・ツメファシエンズ（Agrobacterium tumefaciens）にクローニングされた。

【0320】

トウモロコシ形質転換、タンパク質発現および昆虫バイオアッセイは、前述されるプロトコールに従って完了し、結果を表33に示す。昆虫バイオアッセイの結果は、TraP8キメラ葉緑体輸送ペプチド配列が機能的であり、pDAB111338とpDAB111481事象が、バイオアッセイにおいて試験された昆虫に対して保護を与えたことを示した。試験された事象では、TraPを含まないVip3Ab1タンパク質を発現する植物（pDAB112710およびpDAB111479）は、CEWとFAW昆虫種の両方について、TraP8を含むVip3Ab1タンパク質を発現する植物（pDAB111338およびpDAB111481）と有意に異なる平均の葉損傷レベルを有した。結論として、ウエスタンブロットおよびバイオアッセイは、試験された事象のすべてがVip3Ab1タンパク質を発現したことを示した。

【0321】

【表33】

表33. 葉緑体輸送ペプチド配列を有さないVip3Ab1v6とVip3Ab1v7コード配列と比較した、TraP8に融合したVip3Ab1v6とVip3Ab1v7コード配列についての生化学的アッセイの結果およびバイオアッセイの結果。

プラスミド	説明	生化学的アッセイの結果			バイオアッセイの結果						
		平均発現	分析法 ELISA (ng/cm ₂) LC/MS/MS (fmole/cm ₂)	ウエスタン陽性事象	試験された事象	全 CEW 損傷	CEW による葉損傷の平均%	全 FAW 損傷	FAW による葉損傷の平均%	全 rFAW 損傷	rFAW による葉損傷の平均%
pDAB111479	Vip3Ab1 v6 TraP なし	59	ELISA	14/17	19	205.0	10.8	368.0	19.4	325.0	17.1
pDAB111481	Vip3Ab1 v6 TraP8 v2	239	ELISA	4/4	17	124.0	7.3	110.0	6.5	77.0	4.5
pDAB112710	Vip3Ab1 v7 TraP なし	143	ELISA	18/20	20	79.0	4.0	107.0	5.4	117.0	5.9
pDAB111338	Vip3Ab1 v7 TraP8 v2	180	ELISA	5/6	9	63.0	7.0	99.0	11.0	111.0	12.3

【実施例5】

【0322】

キメラ葉緑体輸送ペプチド（TraP）配列の植物体内切断

TraP8とTraP9キメラ葉緑体輸送ペプチドの切断部位は、MALDI分析法およびN末端エドマン分解配列決定により決定された。植物材料は、TraP8-dgt14、TraP8-dgt28、TraP9-dgt14、およびTraP9-dgt28融合遺伝子を含むトランスジェニック植物から得られ、葉緑体内の転位中に生じたキメラ葉緑体輸送ペプチドの切断位置を決定するためにアッセイされた。

【0323】

MALDI結果：

植物試料からの半精製タンパク質をSDS-PAGEにより分離した。YFPの分子量

に相当するサイズのタンパク質バンドをゲルから切り出し、脱染色し、乾燥させた。次に、乾燥させたタンパク質バンドは、25 mM重炭酸アンモニウム中のトリプシン (Promega; Madison, WI) で、一晚、37 °Cにてゲル内消化された。ペプチドは、C18 ZipTip (商標) (Millipore, Bedford, MA) によって精製され、50 %アセトニトリル/0.1 %TFAを用いて溶出された。試料は、マトリックス α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸と1:1の比率で混合され、混合物は、MALDI試料プレートに示され、空気乾燥された。

【0324】

ペプチドのマススペクトルは、Voyager DE-PRO MALDI-TOF質量分析器 (商標) (Applied Biosystems; Framingham, MA) を用いて生じさせた。外部較正は、Calibration Mixture 2 (商標) (Applied Biosystems) を用いることによって行われた。内部較正は、 m/z 842.508、1045.564および2211.108でトリプシン自己分解ピークを用いて行われた。すべてのマススペクトルは陽イオン反射モデルに回収された。ペプチドのマスフィンガープリント (PMF) 分析は、試料が標的タンパク質であるかどうかを検証するために、試料のPMFを標的タンパク質の理論上のPMFと照合することによって、Proteomics LLCからのPAWS (商標) (タンパク質分析ワークシート) フリーウェアを用いて行われた。タンパク質同定は、NCBI NRタンパク質データベースに対するMASCOT (Matrix Science, London, UK) を用いたデータベース検索によって行われた。

【0325】

エドマン化学分解を介したN末端配列決定:

N末端配列決定は、Applied Biosystems (Foster City, CA) からのProcise Protein Sequencer (モデル494) で実施された。タンパク質試料は、最初にSDS-PAGEによって分離され、次にPVDF膜上でプロットされた。タンパク質バンドを膜から切り出し、Procise Sequencerに装填した。8サイクルのエドマン化学分解は、N末端で5個のAA残基を得るために、それぞれの試料について実施された。20個のPTH-アミノ酸の標準混合物 (Applied Biosystems) は、それぞれの試料を用いて行われた。それぞれのエドマン分解からのアミノ酸残基は、標準に対するC18カラムからのそれらの保持時間に基づいて決定された。

【0326】

MALDI配列決定の結果は、DGT-28およびDGT14タンパク質が発現し、TraPキメラ葉緑体輸送ペプチド配列がプロセシングされたことを示した。表34は、N末端エドマン分解およびMALDI配列決定を用いることによって得られたプロセシングされた配列を列挙する。

【0327】

【表 3 4】

表 34. dgt-14 または dgt-28 コード配列と融合させた TraP8 と TraP9 の切断部位。グレーのボックスはスプライス部位を示す。

構築物	配列	スプライシングを有する配列数
TraP8-DG T14v2	S V I R P V K A A S T G G	66/67
TraP8-DG T28v1	S V I R P V K A A R G M P	66/67
TraP9-DG T14v2	K V T A S V S A S V S A A S T G G	62/63
TraP9-DG T28v1	K V T A S V S A S V S A A R G M P	—

10

本発明は、以下の態様を含む。

[1]

第 1 のアブラナ属葉緑体輸送ペプチドの連続するアミノ酸配列を含み、第 2 の葉緑体輸送ペプチドの連続するアミノ酸配列をさらに含むペプチドをコードする合成アブラナ属由来ヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

20

[2]

合成アブラナ属由来ヌクレオチド配列に作動可能に連結している、対象とするヌクレオチド配列をさらに含む、[1] に記載の単離された核酸分子。

[3]

第 1 のアブラナ属葉緑体輸送ペプチドが、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) またはブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*) 由来である、[1] に記載の単離された核酸分子。

[4]

第 2 の葉緑体輸送ペプチドが、第 1 のアブラナ属葉緑体輸送ペプチド以外のアブラナ属種に由来する、[3] に記載の単離された核酸分子。

30

[5]

第 1 のアブラナ属葉緑体輸送ペプチドが、3-エノールピルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ遺伝子に由来する、[1] に記載の単離された核酸分子。

[6]

第 2 の葉緑体輸送ペプチドが、3-エノールピルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ遺伝子に由来する、[1] に記載の単離された核酸分子。

[7]

ペプチドが、配列番号 3 および 4 からなる群から選択される葉緑体輸送ペプチドに対して少なくとも 80% 同一である、[1] に記載の単離された核酸分子。

40

[8]

ペプチドが、配列番号 3 および 4 からなる群から選択される葉緑体輸送ペプチドに対して少なくとも 85% 同一である、[7] に記載の単離された核酸分子。

[9]

ペプチドが、配列番号 3 および 4 からなる群から選択される葉緑体輸送ペプチドに対して少なくとも 90% 同一である、[8] に記載の単離された核酸分子。

[10]

ペプチドが、配列番号 3 および 4 からなる群から選択される葉緑体輸送ペプチドに対して少なくとも 95% 同一である、[9] に記載の単離された核酸分子。

[11]

50

ペプチドが、配列番号 3 および 4 からなる群から選択される葉緑体輸送ペプチドに対して少なくとも 98% 同一である、[10] に記載の単離された核酸分子。

[12]

ペプチドが、配列番号 3 および 4 からなる群から選択される、[11] に記載の単離された核酸分子。

[13]

対象とするヌクレオチドコード配列が、配列番号 1 または配列番号 2 のペプチドをコードしない、[1] に記載の単離された核酸分子。

[14]

ペプチドをコードするヌクレオチド配列が、配列番号 5、6、8 および 9 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズ可能である、[1] に記載の単離された核酸分子。

[15]

各々、葉緑体輸送ペプチドをコードする、少なくとも 1 種のさらなるヌクレオチド配列をさらに含み、さらなるヌクレオチド配列が、対象とするヌクレオチド配列に作動可能に連結している、[2] に記載の単離された核酸分子。

[16]

少なくとも 1 種のさらなるヌクレオチド配列が、原核生物、下等光合成真核生物および緑藻植物からなる群から選択される生物に由来する、[15] に記載の単離された核酸分子。

[17]

合成アブラナ属由来ヌクレオチド配列および対象とするヌクレオチド配列が、1 種または複数の調節配列に作動可能に連結している、[2] に記載の単離された核酸分子。

[18]

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドおよび合成アブラナ属由来ヌクレオチド配列によってコードされるペプチドを含むキメラポリペプチドをコードする、[2] に記載の単離された核酸分子。

[19]

[18] に記載の核酸分子によってコードされるキメラポリペプチド。

[20]

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドが、プラスチド含有細胞中のプラスチドにターゲッティングされる、[19] に記載のキメラポリペプチド。

[21]

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドが、プラスチドにターゲッティングされると除去される葉緑体輸送ペプチドを含む、[20] に記載のキメラポリペプチド。

[22]

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドが、生物学的に活性なペプチドである、[19] に記載のキメラポリペプチド。

[23]

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドが、蛍光ペプチドである、[19] に記載のキメラポリペプチド。

[24]

生物学的に活性なペプチドが、酵素である、[22] に記載のキメラポリペプチド。

[25]

生物学的に活性なペプチドが、細胞のプラスチドにおいて正常に発現され、ペプチドが天然に発現される、[22] に記載のキメラポリペプチド。

[26]

生物学的に活性なペプチドが、除草剤抵抗性、ウイルス抵抗性、細菌病原体抵抗性、昆虫抵抗性、線虫抵抗性、真菌抵抗性、草勢、植物の収量、温度耐性、土壌条件耐性、低光

10

20

30

40

50

量レベル耐性、低水分レベル耐性、高水分レベル耐性、化学的環境耐性、種子色、デンプン変性、アミノ酸合成、光合成、脂肪酸の合成、油の合成、アロテノイド (arotenoid) の合成、テルペノイドの合成、デンプンの合成および除草剤抵抗性からなる群から選択されるプロセスに参与している、[22]に記載のキメラポリペプチド。

[27]

生物学的に活性なペプチドが、ゼアキサンチンエポキシダーゼ、コリンモノオキシゲナーゼ、フェロケラターゼ、オメガ3脂肪酸不飽和化酵素、グルタミンシンセターゼ、プロビタミンA、ホルモン、Bt毒素タンパク質および対象とする形質を含む植物の同定において有用なマーカーからなる群から選択される、[22]に記載のキメラポリペプチド。

[28]

生物学的に活性なペプチドが、除草剤抵抗性に参与している、[26]に記載のキメラポリペプチド。

[29]

生物学的に活性なペプチドが、アセトラクターゼシンターゼ (ALS)、突然変異ALS、ALSの前駆体、3-エノールピルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ (EPSPS)、CP4 EPSPS、クラスII EPSPS、およびクラスIV EPSPSからなる群から選択される、[24]に記載のキメラポリペプチド。

[30]

[2]に記載の核酸分子を含む植物発現ベクター。

[31]

[2]に記載の核酸分子を含む植物材料。

[32]

植物細胞、植物組織、植物組織培養物、カルス培養物、植物の一部および全植物体からなる群から選択される、[31]に記載の植物材料。

[33]

ペプチドを含むポリペプチドをさらに含む、[31]に記載の植物材料。

[34]

対象とするヌクレオチド配列が、植物材料の細胞中のプラスチドにターゲッティングされるポリペプチドの一部をコードする、[33]に記載の植物材料。

[35]

核酸分子が、植物材料から得た細胞のゲノムに安定に組み込まれる、[31]に記載の植物材料。

[36]

全植物体である、[31]に記載の植物材料。

[37]

植物体を生成するよう再生できない植物細胞である、[31]に記載の植物材料。

[38]

アラビドプシス属、アルファルファ、アブラナ属、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、ワタ、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウマメ、コショウ、ピーナッツ、ジャガイモ、カボチャ (pumpkin)、ダイコン、ナタネ、ホウレンソウ、ダイズ、カボチャ (squash)、サトウダイコン、ヒマワリ、タバコ、トマト、スイカ、トウモロコシ、タマネギ、コメ、ソルガム、コムギ、ライムギ、アワ、サトウキビ、カラスムギ、ライコムギ、スイッチグラスおよびシバクサからなる群から選択される植物に由来する、[31]に記載の植物材料。

[39]

トランスジェニック植物材料を製造する方法であって、

[2]に記載の単離された核酸分子を得ることと、

植物材料を、核酸分子を用いて形質転換することとを含む、方法。

[40]

10

20

30

40

50

植物材料が、植物細胞、植物組織、植物組織培養物、カルス培養物、植物の一部および全植物体からなる群から選択される、〔３９〕に記載の方法。

〔４１〕

植物材料が、全植物体ではない、〔３９〕に記載の方法。

〔４２〕

〔３９〕に記載の方法によって製造されるトランスジェニック植物材料。

〔４３〕

植物体を生成するよう再生できない植物細胞である、〔４２〕に記載のトランスジェニック植物材料。

〔４４〕

〔４２〕に記載のトランスジェニック植物材料から再生されたトランスジェニック植物。

〔４５〕

〔４２〕に記載の植物材料から製造されたトランスジェニック植物商品生産物。

〔４６〕

対象とするヌクレオチド配列が、生物学的に活性なペプチドをコードする、〔４２〕に記載のトランスジェニック植物材料。

〔４７〕

生物学的に活性なペプチドが、除草剤抵抗性、ウイルス抵抗性、細菌病原体抵抗性、昆虫抵抗性、線虫抵抗性、真菌抵抗性、植物の勢い、植物の収量、温度耐性、土壌条件耐性、低光量レベル耐性、低水分レベル耐性、高水分レベル耐性、化学的環境耐性、種子の色、デンプン変性、アミノ酸合成、光合成、脂肪酸の合成、油の合成、アロテノイド (arotenoid) の合成、テルペノイドの合成、デンプンの合成および除草剤抵抗性からなる群から選択されるプロセスに関与している、〔４６〕に記載のトランスジェニック植物材料。

〔４８〕

生物学的に活性なペプチドが、ゼアキサンチンエポキシダーゼ、コリンモノオキシゲナーゼ、フェロケラターゼ、オメガ３脂肪酸不飽和化酵素、グルタミンシンセターゼ、プロビタミンＡ、ホルモン、Ｂｔ毒素タンパク質および対象とする形質を含む植物の同定において有用なマーカーからなる群から選択される、〔４６〕に記載のトランスジェニック植物材料。

〔４９〕

生物学的に活性なペプチドが、除草剤抵抗性に関与している、〔４７〕に記載のトランスジェニック植物材料。

〔５０〕

生物学的に活性なペプチドが、アセトラクターゼシンターゼ (ALS)、突然変異 ALS、ALSの前駆体、３-エノールピルビルシキミ酸-５-リン酸シンセターゼ (EPSPS)、CP4 EPSPSおよびクラス I I I EPSPSからなる群から選択される、〔４６〕に記載のトランスジェニック植物材料。

〔５１〕

同種の野生型植物材料と比較した場合に、増大した除草剤抵抗性または除草剤耐性を示す、〔４９〕に記載のトランスジェニック植物材料。

〔５２〕

ポリペプチドを葉緑体にターゲッティングするためのアブラナ属由来の手段を含む単離された核酸分子。

〔５３〕

ポリペプチドを葉緑体にターゲッティングするためのアブラナ属由来の手段に作動可能に連結している対象とするヌクレオチド配列をさらに含む、〔５２〕に記載の単離された核酸分子。

〔５４〕

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドを含むキメラポリペプチド

10

20

30

40

50

をコードする、[53]に記載の単離された核酸分子。

[55]

[54]に記載の核酸分子によってコードされるキメラポリペプチド。

[56]

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドが、プラスチドを含有する細胞中のプラスチドにターゲティングされる、[55]に記載のキメラポリペプチド。

[57]

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドが、プラスチドにターゲティングされると除去される葉緑体輸送ペプチドを含む、[56]に記載のキメラポリペプチド。

[58]

対象とするヌクレオチド配列によってコードされるペプチドが、生物学的に活性なペプチドである、[55]に記載のキメラポリペプチド。

[59]

生物学的に活性なペプチドが、除草剤抵抗性、ウイルス抵抗性、細菌病原体抵抗性、昆虫抵抗性、線虫抵抗性、真菌抵抗性、草勢、植物の収量、温度耐性、土壌条件耐性、低光量レベル耐性、低水分レベル耐性、高水分レベル耐性、化学的環境耐性、種子色、デンプン変性、アミノ酸合成、光合成、脂肪酸の合成、油の合成、アロテノイド (arotenoid) の合成、テルペノイドの合成、デンプンの合成および除草剤抵抗性からなる群から選択されるプロセスに関与している、[58]に記載のポリペプチド。

[60]

生物学的に活性なペプチドが、ゼアキサンチンエポキシダーゼ、コリンモノオキシゲナーゼ、フェロクレターゼ、オメガ3脂肪酸不飽和化酵素、グルタミンシンセターゼ、プロビタミンA、ホルモン、Bt毒素タンパク質および対象とする形質を含む植物の同定において有用なマーカーからなる群から選択される、[58]に記載のポリペプチド。

[61]

生物学的に活性なペプチドが、アセトラクターゼシンターゼ (ALS)、突然変異ALS、ALSの前駆体、3-エノールピルビルシキミ酸-5-リン酸シンセターゼ (EPSPS)、CP4 EPSPSおよびクラスII EPSPSからなる群から選択される、[58]に記載のポリペプチド。

[62]

[53]に記載の核酸分子を含む植物発現ベクター。

[63]

[53]に記載の核酸分子を含む植物材料。

[64]

核酸分子が、植物材料から得た細胞のゲノムに安定に組み込まれる、[63]に記載の植物材料。

[65]

全植物体である、[63]に記載の植物材料。

[66]

植物体を生成するよう再生できない植物細胞である、[63]に記載の植物材料。

[67]

アラビドプシス属、アルファルファ、アブラナ属、マメ、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、ワタ、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウマメ、コショウ、ピーナッツ、ジャガイモ、カボチャ (pumpkin)、ダイコン、ナタネ、ホウレンソウ、ダイズ、カボチャ (squash)、サトウダイコン、ヒマワリ、タバコ、トマト、スイカ、トウモロコシ、タマネギ、コメ、ソルガム、コムギ、ライムギ、アワ、サトウキビ、カラスミギ、ライコムギ、スイッチグラスおよびシバクサからなる群から選択される植物に由来する、[63]に記載の植物材料。

[68]

10

20

30

40

50

トランスジェニック植物材料を製造する方法であって、
 [5 3] に記載の単離された核酸分子を得ることと、
 植物材料を、核酸分子を用いて形質転換することと
 を含む、方法。

[6 9]

植物材料が、植物細胞、植物組織、植物組織培養物、カルス培養物、植物の一部および
 全植物体からなる群から選択される、[6 8] に記載の方法。

[7 0]

植物材料が、全植物体ではない、[6 8] に記載の方法。

[7 1]

[6 8] に記載の方法によって製造されるトランスジェニック植物材料。

[7 2]

[6 8] に記載のトランスジェニック植物材料から再生されたトランスジェニック植物

。

[7 3]

トランスジェニック植物材料が、全植物体である、[7 1] に記載の植物材料。

[7 4]

トランスジェニック植物材料が、植物体を生成するよう再生できない植物細胞である、
 [7 1] に記載の植物材料。

[7 5]

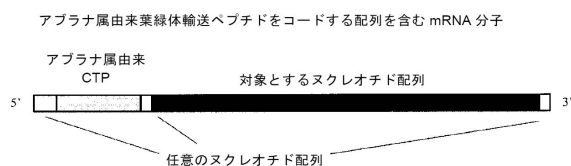
[7 1] に記載のトランスジェニック植物材料から製造されたトランスジェニック植物
 商品生産物。

[7 6]

対象とするヌクレオチド配列が、生物学的に活性なペプチドをコードする、[7 1] に
 記載のトランスジェニック植物材料。

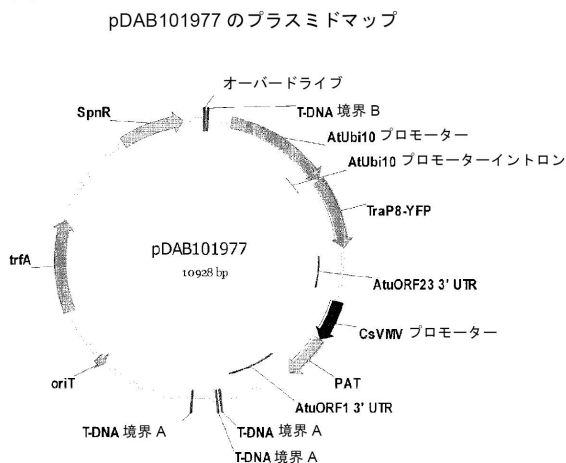
【図 1】

図 1



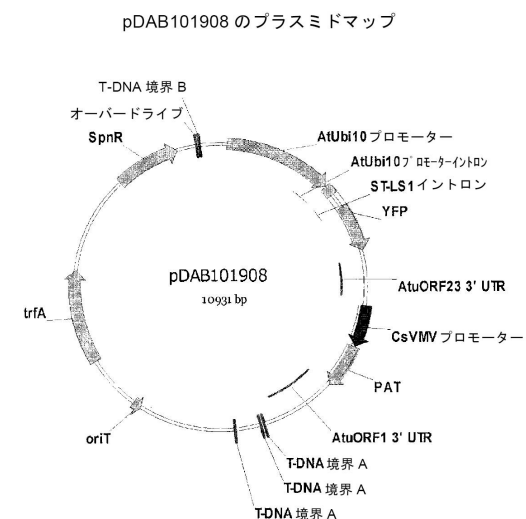
【図 2】

図 2



【図 3】

図 3



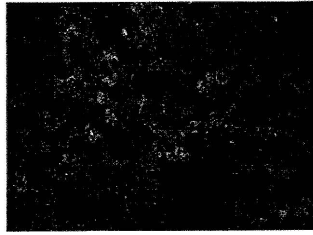
10

20

【図 4】

図 4

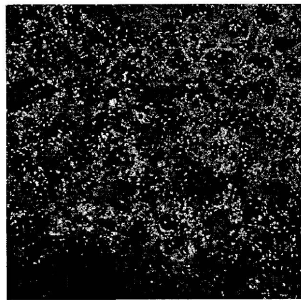
タバコ葉組織中に浸潤した TraP8-YFP は、タバコ葉組織の葉緑体に転位置した。



【図 5】

図 5

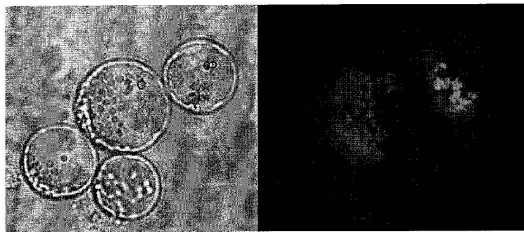
タバコ葉組織中に浸潤した TraP9-YFP は、タバコ葉組織の葉緑体に転位置した。



【図 8】

図 8

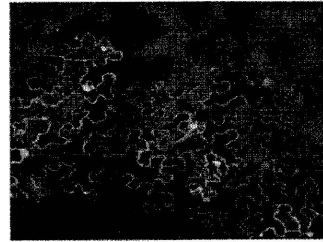
トウモロコシプロトプラスト中に形質転換された TraP8-YFP は、トウモロコシプロトプラストの葉緑体に転位置した。



【図 6】

図 6

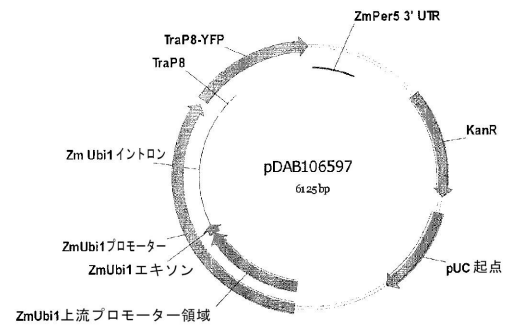
タバコ葉組織に浸透させた非標的化 YFP 対照はタバコ葉組織の葉緑体に取り込まれなかった



【図 7】

図 7

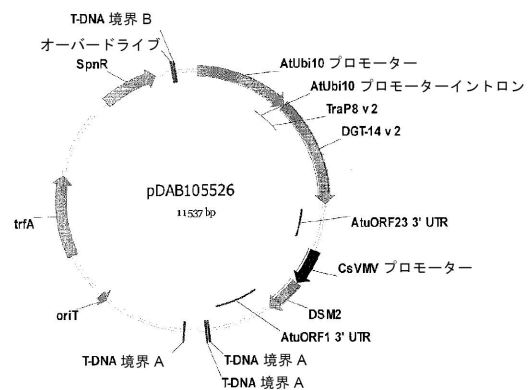
pDAB106597 のプラスミドマップ



【図 9】

図 9

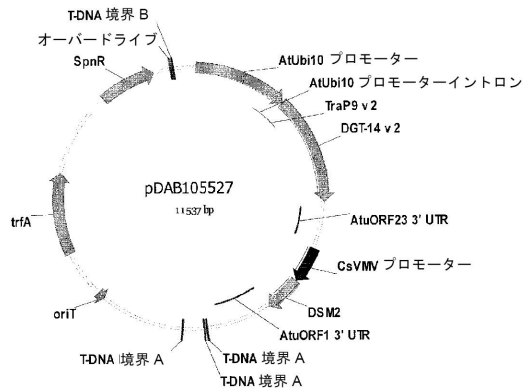
pDAB105526 のプラスミドマップ



【図 10】

図 10

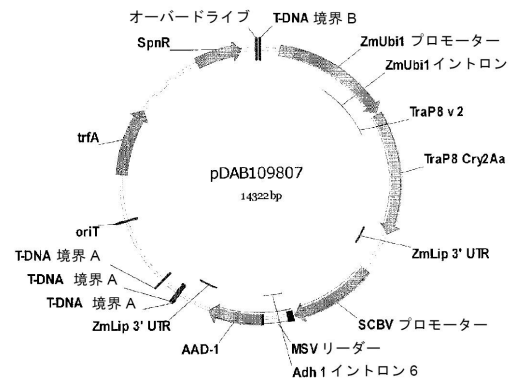
pDAB105527 のプラスミドマップ



【図 11】

図 11

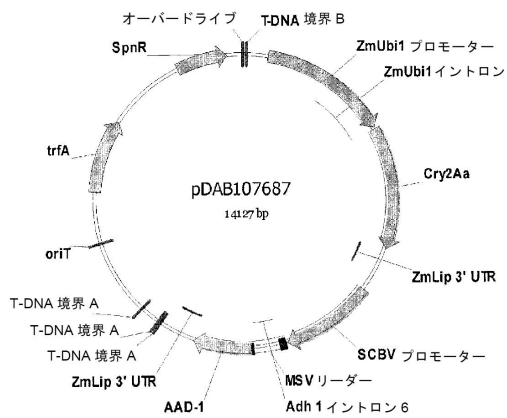
pDAB109807 のプラスミドマップ



【図 12】

図 12

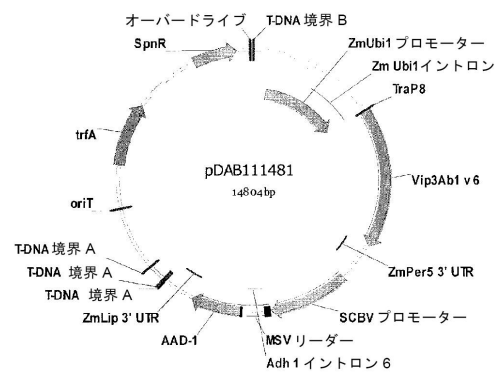
プラスミドマップ pDAB107687



【図 13】

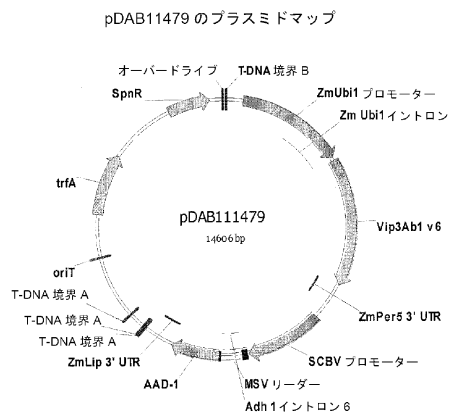
図 13

pDAB111481 のプラスミドマップ



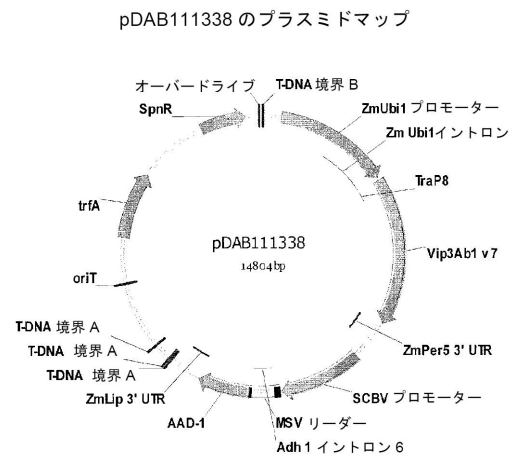
【図 14】

図 14



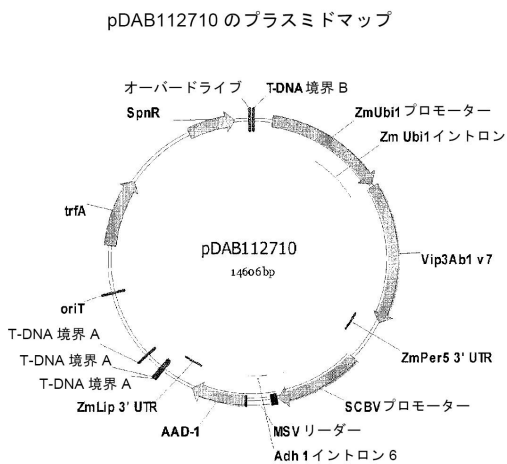
【図 15】

図 15



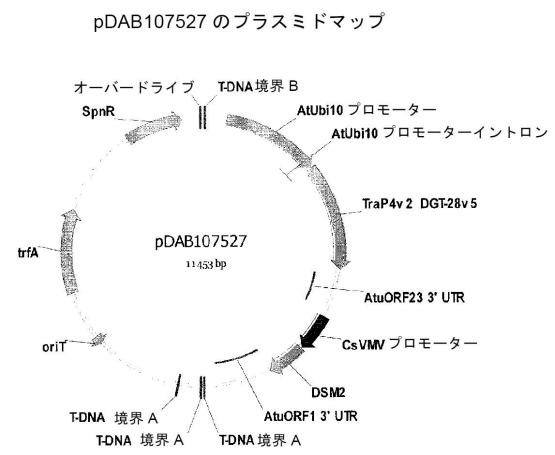
【図 16】

図 16



【図 18】

図 18



【図 17】

図 17

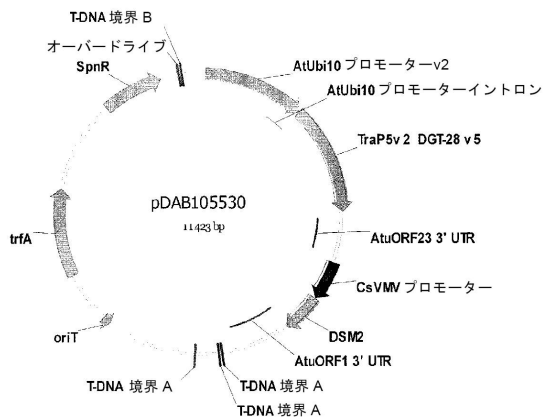
セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)(配列番号 1)およびブラシカ・ラバ(*Brassica rapa*)(配列番号 2)由来の EPSPS タンパク質について予測される葉緑体輸送ペプチドのアラインメント。アスタリスクは、配列が切断され、再結合されて、TraP8 と TraP9 を形成した場所を示す。

セイヨウアブラナ(<i>Brassica napus</i>)(配列番号 1)	(1) MACSRICHGVQNECVIISNISKNQNKSPFSVSL-KTIGP	1	40
ブラシカ・ラバ(<i>Brassica rapa</i>)(配列番号 2)	(1) MACSRICQ---NPGVIG-NLEKNHPRKSPFSVSL-KTHQQ	41	74
セイヨウアブラナ(<i>Brassica napus</i>)(配列番号 1)	(41) R----ASSWGLKKSCTMLNGSVIRPVRKVTASVS	41	74
ブラシカ・ラバ(<i>Brassica rapa</i>)(配列番号 2)	(37) QRPAVQISSWGLKKS--N-NGSVIRPVRKVTASVS	41	74

【図 19】

図 19

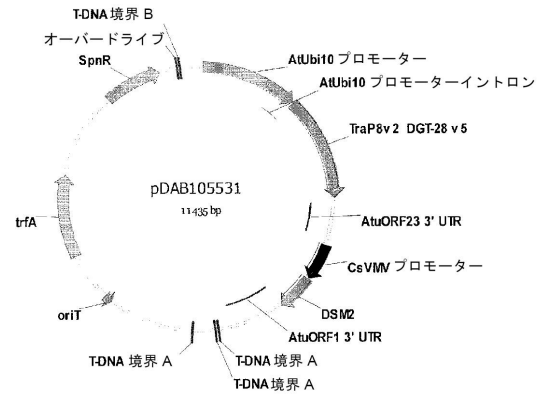
pDAB105530 のプラスミドマップ



【図 20】

図 20

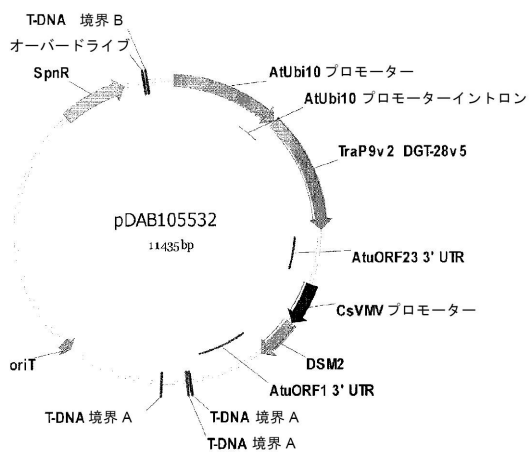
pDAB105531 のプラスミドマップ



【図 21】

図 21

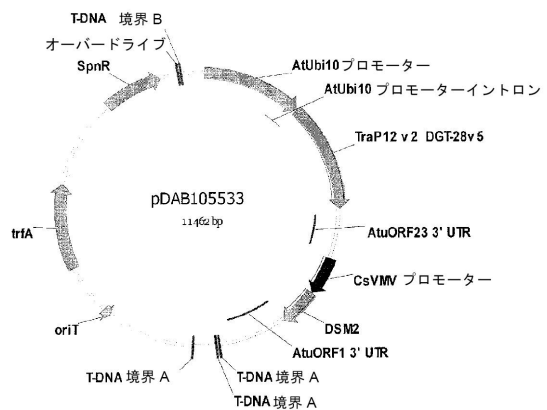
pDAB105532 のプラスミドマップ



【図 22】

図 22

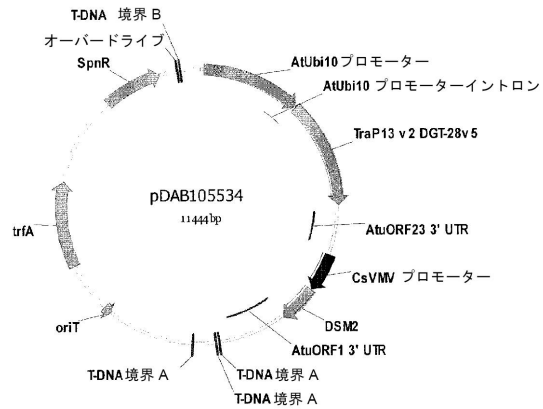
pDAB105533 のプラスミドマップ



【図 2 3】

図 2 3

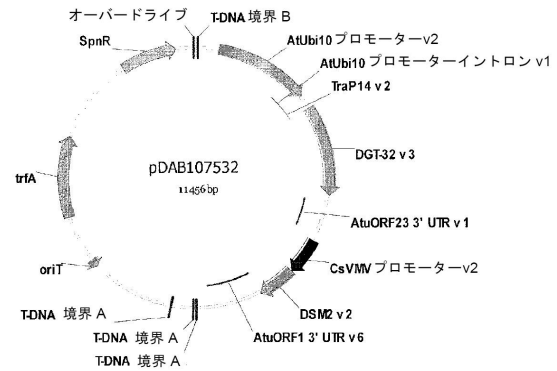
DAB105534 のプラスミドマップ



【図 2 4】

図 2 4

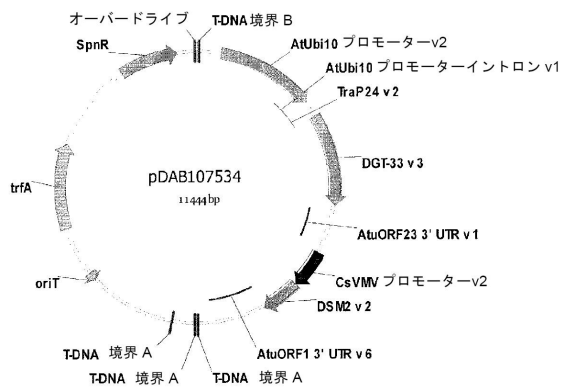
pDAB107532のプラスミドマップ



【図 2 5】

図 2 5

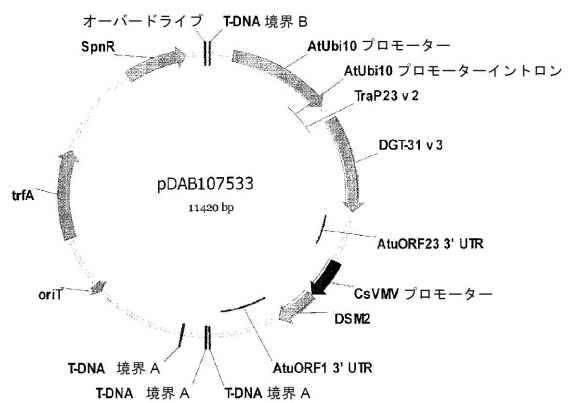
pDAB107534のプラスミドマップ



【図 2 6】

図 2 6

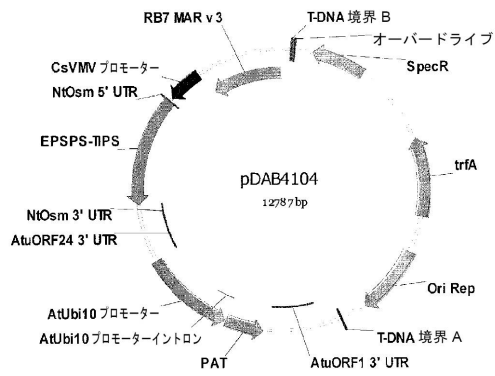
pDAB107533のプラスミドマップ



【図 27】

図 27

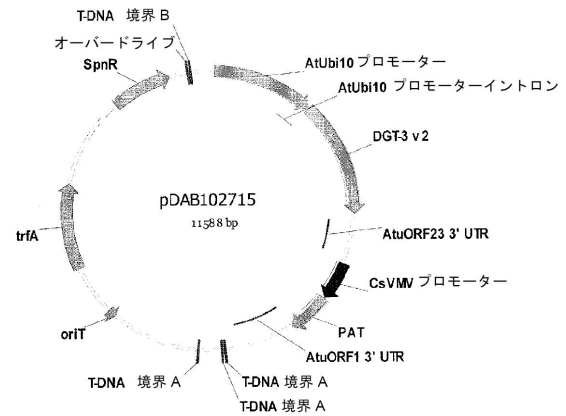
pDAB4104のプラスミドマップ



【図 28】

図 28

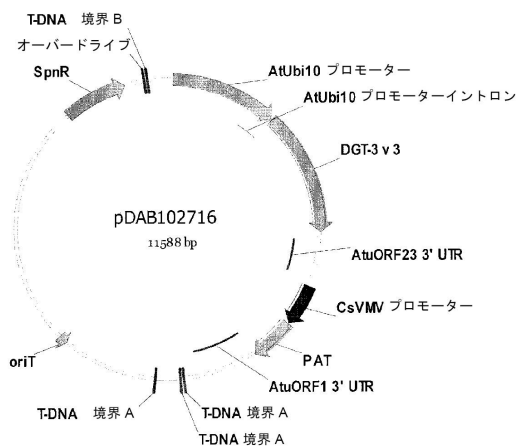
pDAB102715のプラスミドマップ



【図 29】

図 29

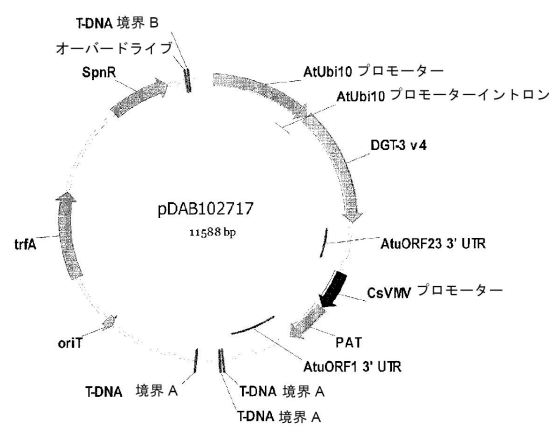
pDAB102716のプラスミドマップ



【図 30】

図 30

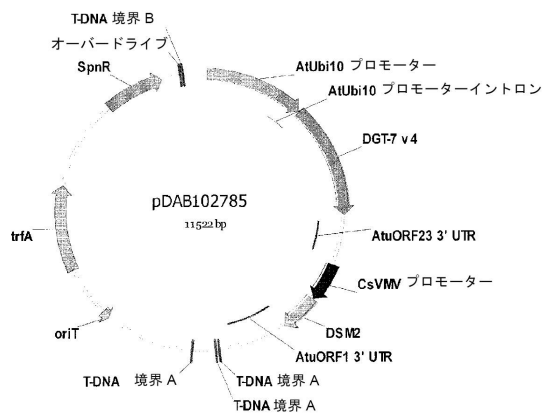
pDAB102717のプラスミドマップ



【図 3 1】

図 3 1

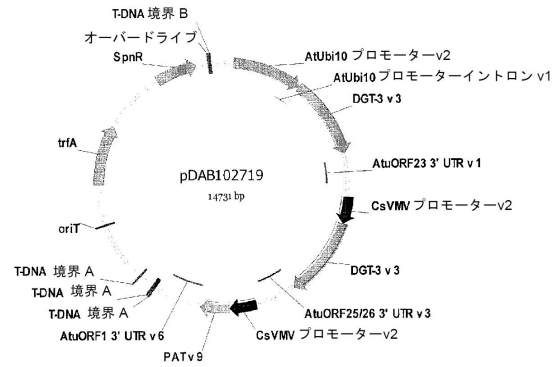
pDAB102785のプラスミドマップ



【図 3 2】

図 3 2

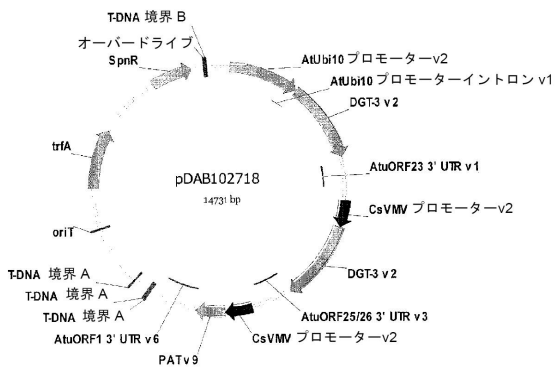
pDAB102719のプラスミドマップ



【図 3 3】

図 3 3

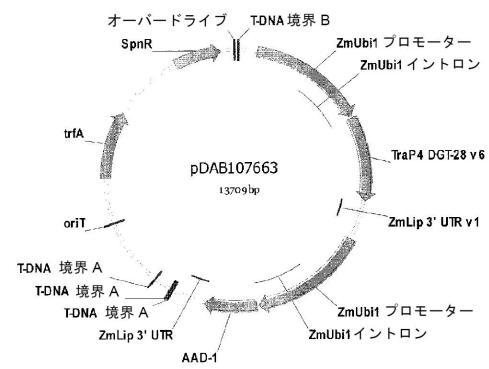
pDAB102718のプラスミドマップ



【図 3 4】

図 3 4

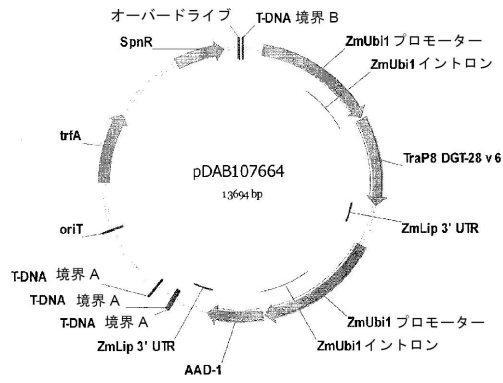
pDAB107663のプラスミドマップ



【図 3 5】

図 3 5

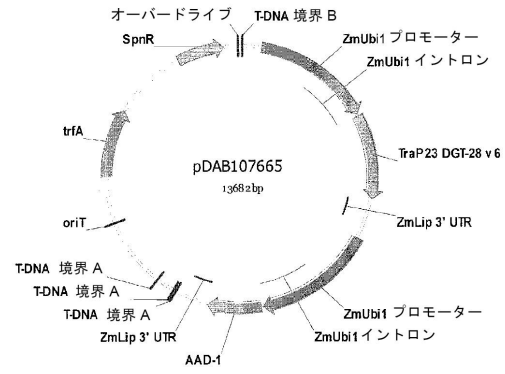
pDAB107664のプラスミドマップ



【図 3 6】

図 3 6

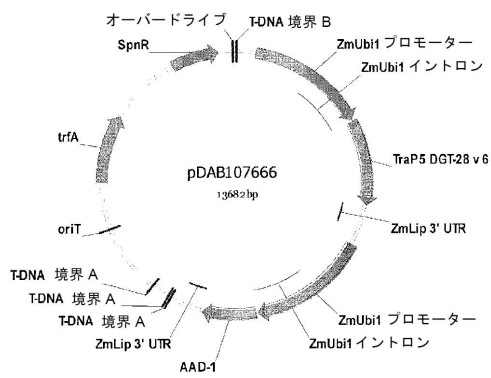
pDAB107665のプラスミドマップ



【図 3 7】

図 3 7

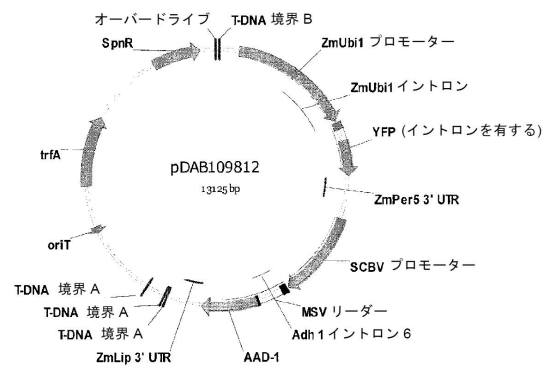
pDAB107666のプラスミドマップ



【図 3 8】

図 3 8

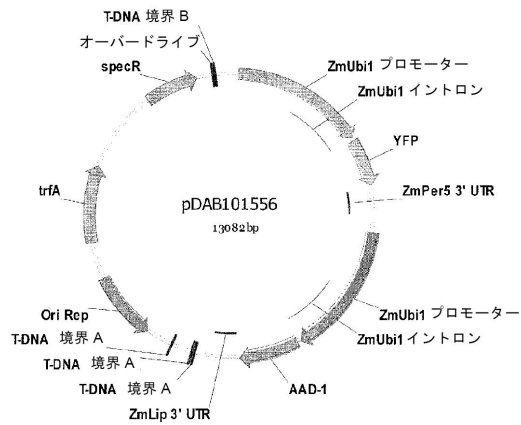
pDAB109812のプラスミドマップ



【図 39】

図 39

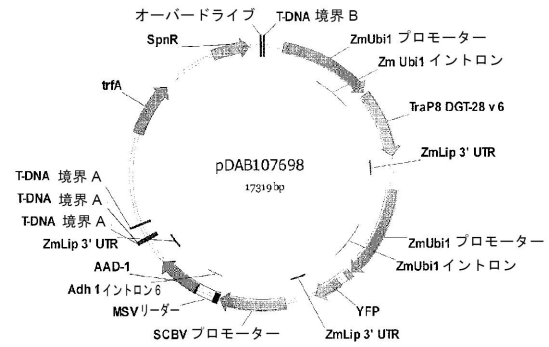
pDAB101556のプラスミドマップ



【図 40】

図 40

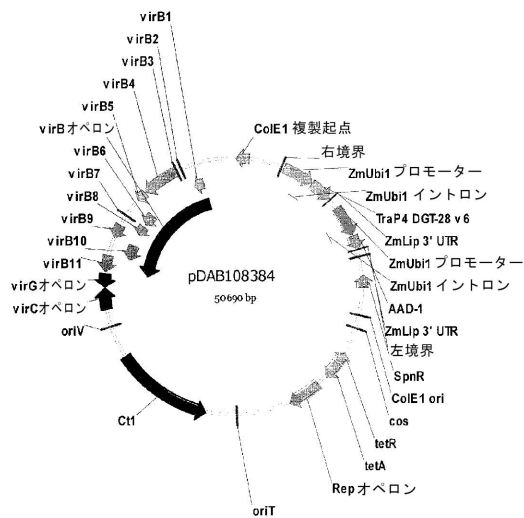
pDAB107698のプラスミドマップ



【図 41】

図 41

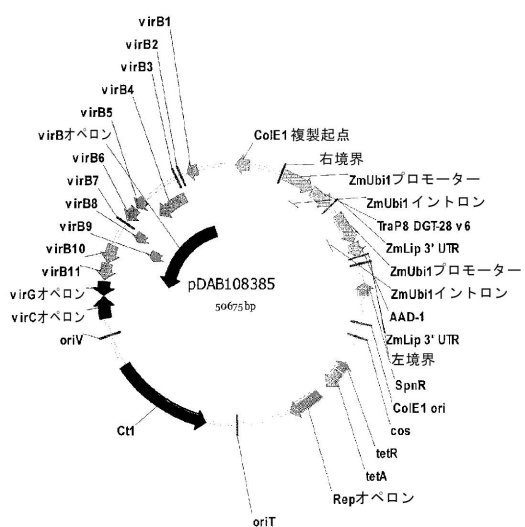
pDAB108384のプラスミドマップ



【図 42】

図 42

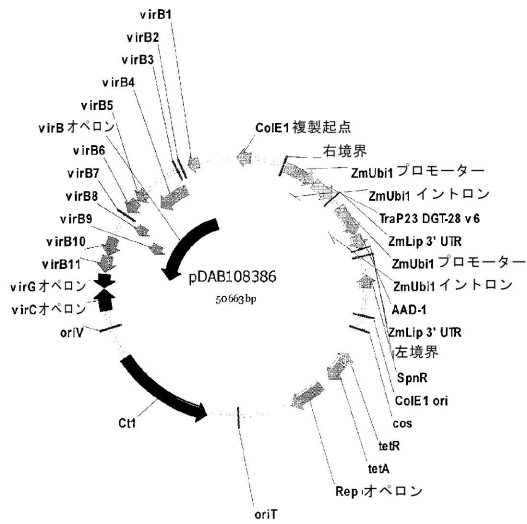
pDAB108385のプラスミドマップ



【図 4 3】

図 4 3

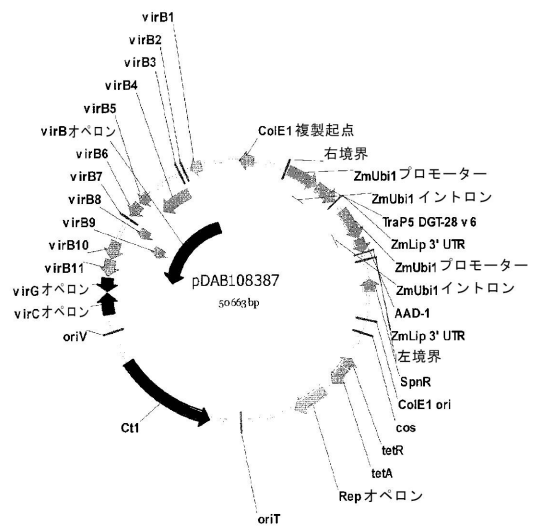
pDAB108386のプラスミドマップ



【図 4 4】

図 4 4

pDAB108387のプラスミドマップ



【配列表】

0006652383000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/29 (2006.01) C 1 2 N 15/29
- (74)代理人 100176094
弁理士 箱田 満
- (74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
- (72)発明者 リラ, ジャスティン, エム.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7, ジオンスビル, ウィンドポイント パス 8 9 7
4
- (72)発明者 チッチロ, ロバート エム.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 4, ウェストフィールド, スタッフォード ドライブ
5 5 3
- (72)発明者 ヤークス, カーラ
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 7 9 3 3, クロフォーズビル, 4 7 サウス ステイト ロ
ード 4 5 7 1
- (72)発明者 ロビンソン, アンドリュー イー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 1 1 2, ブラウンズバーグ, ヒッコリー ロード 7 6 2
3

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 高堀 栄二

審判官 常見 優

- (56)参考文献 特表2009-523418 (JP, A)
特表2004-528808 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/62
A01H1/00-5/00
CA/BIOSIS/WPIDS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq