

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-193546

(P2017-193546A)

(43) 公開日 平成29年10月26日(2017.10.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	ZNA 2B030
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A 4B064
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02	C 4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045
C12N 5/14 (2006.01)	C12N 5/14	

審査請求 有 請求項の数 44 O L 外国語出願 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-88179 (P2017-88179)	(71) 出願人	501035309
(22) 出願日	平成29年4月27日 (2017.4.27)		ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ
(62) 分割の表示	特願2014-555784 (P2014-555784)		ー
原出願日	平成25年2月1日 (2013.2.1)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462
(31) 優先権主張番号	61/594,245		68, インディアナポリス, ジオンス
(32) 優先日	平成24年2月2日 (2012.2.2)	(74) 代理人	100092783
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100126354
			弁理士 藤田 尚
		(74) 代理人	100176094
			弁理士 箱田 満

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物トランス活性化相互作用モチーフおよびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】対象となるポリヌクレオチドの発現を増加させるための組成物及び方法の提供。
【解決手段】ポリヌクレオチドに特異的に結合するDNA結合ポリペプチド、及び、特定の配列を有する群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む合成転写活性化因子融合タンパク質であって、前記ポリヌクレオチドが作動可能に第二のポリヌクレオチドに連結した際に、対象のポリペプチドをコードする前記第二のポリヌクレオチドの発現を増加させる、合成転写活性化因子融合タンパク質。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

DNA 結合ポリペプチド、および

配列番号 10 ~ 58 からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチド

を含む合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 2】

DNA 結合ポリペプチドが、ジンクフィンガー DNA 結合ドメイン、AVRBS3 誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

10

【請求項 3】

少なくとも 1 つの追加の DNA 結合ポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 4】

配列番号 2 ~ 8 および配列番号 100 ~ 120 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 5】

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 10 ~ 16、配列番号 22、配列番号 28、配列番号 34、配列番号 40、配列番号 46、配列番号 52、および配列番号 58 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

20

【請求項 6】

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 17、配列番号 23、配列番号 29、配列番号 35、配列番号 41、配列番号 47、および配列番号 53 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 7】

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 18、配列番号 24、配列番号 30、配列番号 36、配列番号 42、配列番号 48、および配列番号 54 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

30

【請求項 8】

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 19、配列番号 25、配列番号 31、配列番号 37、配列番号 43、配列番号 49、および配列番号 55 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 9】

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 20、配列番号 26、配列番号 32、配列番号 38、配列番号 44、配列番号 50、および配列番号 56 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 10】

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 21、配列番号 27、配列番号 33、配列番号 39、配列番号 45、配列番号 51、および配列番号 57 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

40

【請求項 11】

少なくとも 1 つの追加のトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 12】

対象のヌクレオチド配列が第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結している場合、対象のヌクレオチド配列の発現を増加させる合成転写活性化因子融合タンパク質であって、第二のヌクレオチド配列に特異的に結合する DNA 結合ポリペプチド、および配列番号 10 ~ 16、配列番号 22、配列番号 28、配列番号 34、配列番号 40、配列

50

番号 46、配列番号 52、および配列番号 58 からなる群から選択されるタンパク質トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 13】

DNA 結合ポリペプチド、および

配列番号 10 ~ 16、配列番号 22、配列番号 28、配列番号 34、配列番号 40、配列番号 46、配列番号 52、および配列番号 58 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 80% の配列同一性を有するトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチド

を含む合成転写活性化因子融合タンパク質。

10

【請求項 14】

トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号 10 ~ 16、配列番号 22、配列番号 28、配列番号 34、配列番号 40、配列番号 46、配列番号 52、および配列番号 58 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 85% の配列同一性を有する、請求項 13 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 15】

トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号 10 ~ 16、配列番号 22、配列番号 28、配列番号 34、配列番号 40、配列番号 46、配列番号 52、および配列番号 58 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 13 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

20

【請求項 16】

トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号 10 ~ 16、配列番号 22、配列番号 28、配列番号 34、配列番号 40、配列番号 46、配列番号 52、および配列番号 58 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 95% の配列同一性を有する、請求項 13 に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 17】

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、

DNA 結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および

配列番号 10 ~ 58 からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチド配列

を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。

30

【請求項 18】

DNA 結合ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの追加のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 19】

配列番号 10 ~ 58 からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの追加のポリヌクレオチド配列を含む、請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 20】

第一および第二のポリヌクレオチド配列が遺伝子調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項 17 に記載の核酸。

40

【請求項 21】

第一および第二のポリヌクレオチド配列が第三のポリヌクレオチド配列により分離されている、請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 22】

宿主細胞のゲノムに組み込まれている、請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 23】

宿主細胞が植物細胞である、請求項 22 に記載の核酸。

【請求項 24】

50

DNA結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、AVRBS3誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項17に記載の核酸。

【請求項25】

DNA結合ポリペプチドが、配列番号67、配列番号68、および配列番号99からなる群から選択される配列に特異的に結合する、請求項24に記載の核酸。

【請求項26】

請求項17に記載の核酸を含むベクター。

【請求項27】

選択可能マーカーまたはスクリーニング可能マーカーを含む、請求項26に記載のベクター。

【請求項28】

植物発現ベクターである、請求項26に記載のベクター。

【請求項29】

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、DNA結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および配列番号2～8、配列番号10～16、配列番号22、配列番号28、配列番号34、配列番号40、配列番号46、配列番号52、配列番号58、および配列番号100～120からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%の配列同一性を有するトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。

【請求項30】

配列番号80～93からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項29に記載の核酸。

【請求項31】

配列番号80～93からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項29に記載の核酸。

【請求項32】

配列番号80～93からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項29に記載の核酸。

【請求項33】

配列番号80～93からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項29に記載の核酸。

【請求項34】

配列番号80～93からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも97%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項29に記載の核酸。

【請求項35】

配列番号80～93からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも98%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項29に記載の核酸。

【請求項36】

配列番号80～93からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項29に記載の核酸。

【請求項37】

DNA結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、AVRBS3誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項29に記載の核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 38】

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、
配列番号 80 ~ 93、
配列番号 80 ~ 93 のうちの 1 つと実質的に同一であるヌクレオチド配列、
配列番号 80 ~ 93 のうちの少なくとも 1 つに特異的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドの相補体、および
配列番号 80 ~ 93 のうちの少なくとも 1 つに特異的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドの逆相補体
からなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項 39】

請求項 17 に記載の核酸を含む細胞。

【請求項 40】

植物細胞または酵母細胞である、請求項 39 に記載の細胞。

【請求項 41】

請求項 29 に記載の核酸を含む細胞。

【請求項 42】

植物細胞または酵母細胞である、請求項 41 に記載の細胞。

【請求項 43】

請求項 39 に記載の細胞を含む植物組織、植物部分、植物商品生産物、または植物体全体。

【請求項 44】

請求項 41 に記載の細胞を含む植物組織、植物部分、植物商品生産物、または植物体全体。

【請求項 45】

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA 結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、請求項 17 に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

【請求項 46】

前記核酸を宿主細胞に導入することが、前記核酸を含むベクターを宿主細胞に導入することを含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記核酸が宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

対象のヌクレオチド配列が外来性ヌクレオチド配列である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 49】

対象のヌクレオチド配列が内在性ヌクレオチド配列である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 50】

前記核酸を宿主細胞に導入することが、前記核酸を含む植物を、宿主細胞を含む植物と交雑させることを含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 51】

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA 結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を、請求項 17 に記載の核酸を含む宿主細胞に導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

【請求項 52】

対象のヌクレオチド配列を宿主細胞に導入することが、対象のヌクレオチド配列を含むベクターを宿主細胞に導入することを含む、請求項 51 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 3】

前記核酸が宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列が、宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

対象のヌクレオチド配列を宿主細胞に導入することが、対象のヌクレオチド配列を含む植物を、宿主細胞を含む植物と交雑させることを含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 6】

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA 結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、請求項 1 7 に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

10

【請求項 5 7】

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、DNA 結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および植物遺伝子発現のトランス活性化のための手段をコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。

20

【請求項 5 8】

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA 結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、請求項 5 7 に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

【請求項 5 9】

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA 結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を、請求項 5 7 に記載の核酸を含む宿主細胞に導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

30

【請求項 6 0】

配列番号 1 2 1 ~ 1 2 7 からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフ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。

【請求項 6 1】

請求項 6 0 に記載の核酸に特異的にハイブリダイズ可能である核酸の相補体。

【請求項 6 2】

請求項 6 0 に記載の核酸に特異的にハイブリダイズ可能である核酸の逆相補体。

【請求項 6 3】

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが、配列番号 2 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 0、配列番号 4 6、配列番号 5 2、および配列番号 5 8 からなる群から選択される、請求項 6 0 に記載の核酸。

40

【請求項 6 4】

配列番号 1 2 1 ~ 1 2 7 からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含むポリペプチド。

【請求項 6 5】

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが、配列番号 2 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 0、配列番号 4 6、配列番号 5 2、および配列番号 5 8 からなる群から選択される、請求項 6 4 に記載のポリペプチド。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2012年2月2日に提出され、題名が「植物トランス活性化相互作用モチーフおよびその使用」である米国特許仮出願第61/594,245号の利益を主張する。

【0002】

本開示は植物バイオテクノロジーに関する。実施形態は、植物トランス活性化因子由来の新規のまたは合成の転写因子相互作用モチーフを含むポリペプチド（例えば、融合タンパク質）に関する。いくつかの実施形態は、対象の核酸を発現するまたは対象の核酸の発現を増加させるそのようなタンパク質の使用に関する。いくつかの実施形態は、植物トランス活性化因子由来の新規のまたは合成転写因子相互作用モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。特定の例は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む宿主細胞、組織、および/または生物に関する。

【背景技術】

【0003】

クローニングされ単離された遺伝子の植物細胞への導入（遺伝子形質転換）およびそれに続くトランスジェニック植物の再生は、植物および植物材料の遺伝的改変を行うのに広く使用されている。望ましい形質（例えば、改良された栄養価、増加した収量、有害生物または疾患抵抗性、ストレス耐性、および除草剤抵抗性）を導入するための植物の遺伝子形質転換は現在では一般的に使用されて、望ましい形質を発現する新たな改良されたトランスジェニック植物を生産している。DNAは典型的には、真核植物細胞の核または色素体DNA中に無作為に導入され、次に細胞のDNAに組み込まれた前記DNAを含有する細胞は単離され、これを使用して安定的に形質転換された植物細胞を生産する。多くの場合、単一の植物種を遺伝的に操作して、複数のコード配列を導入することにより複数の導入された形質を発現させるのが望ましく、この配列には類似する（または同一の）調節エレメントが含まれる。

【0004】

導入遺伝子（ならびに内在性遺伝子）の発現は、複数のタンパク質-DNAおよびタンパク質-タンパク質相互作用を含む機構を通じて制御される。そのような相互作用を通じて、核酸調節エレメント（例えば、プロモーターおよびエンハンサー）は、構成的または特異的な発現パターンをコード配列に与えることができる。例えば、プロモーターは、特定の組織において、特定の発現期間中、または環境刺激に応答して、コード配列の増加した転写をもたらす。残念ながら、導入遺伝子発現に対する従来のプロモーターの固有の属性により、宿主細胞においてそのプロモーターを使用して行使することができる発現制御の範囲は制限される。従来のプロモーターの1つの実際的な制約は、プロモーター強度の限界のために、および特に強いプロモーターまたは同じプロモーターの多くのコピーの同一細胞内での同時使用による導入遺伝子発現のサイレンシングのために、導入された遺伝子の発現レベルを微調整するのが難しいことである。内在性または天然の遺伝子の発現を開始または増加させることが望ましいこともある。

【0005】

トランス活性化因子は、タンパク質-タンパク質相互作用を通じてDNA転写に関与するいくつかの異なるタンパク質（例えば、ヌクレオソーム再構築複合体、メディアーター複合体、ならびにTFIIIB、TBP、およびTFIIHなどの一般的転写因子）を動員して、ヌクレオソームアセンブリ/ディスアセンブリ、プレ開始複合体形成、プロモータークリアランス、および/または伸長速度に影響を与えることにより転写を開始するまたは転写速度を増強することによって機能するタンパク質である。トランス活性化因子とその結合パートナーのタンパク質-タンパク質相互作用は、「トランス活性化ドメイン(TAD)」として知られるトランス活性化因子内の別々の内部構造エレメントを含む。TADは、一次配列相同性をほとんど共有しておらず標的に結合した場合のみ明確な構造をと

10

20

30

40

50

ると考えられている (Sigler (1988) Nature 333:210-2)。TAD内の酸性および疎水性残基は重要であると考えられている (例えば、Cress and Triezenberg (1991) Science 251(4989):87-90を参照されたい) が、活性への個々の残基の寄与は小さいと考えられている (Hall and Struhl (2002) J. Biol. Chem. 277:46043-50)。

【0006】

単純ヘルペス (Herpes Simplex) ビリオンタンパク質16 (VP16) は、HSV感染細胞においてウイルス前初期遺伝子の転写を刺激するように機能するトランス活性化因子である。他のトランス活性化因子の場合と同じように、VP16は、高度に酸性であるそのTADを含む一連のタンパク質-タンパク質相互作用を通じて転写を活性化する。VP16の酸性TADは、インピトロでもインピボでもいくつかのパートナータンパク質と相互作用することが明らかにされている。例えば、VP16のTADは、TFIIHのTfb1サブユニットと直接相互作用する相互作用モチーフを含有しており (Langlois et al. (2008) J. Am. Chem. Soc. 130:10596-604)、この相互作用は、ウイルス前初期遺伝子の転写の開始と伸長期の両方を活性化するVP16の能力と相関関係にある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

植物トランス活性化因子タンパク質から単離された新規のTADタンパク質-タンパク質相互作用モチーフおよびそれをコードする核酸が本明細書では記載されている。これらの新規の相互作用モチーフは合成TADにおいて利用されて、TADを含むポリペプチドに遺伝子調節特性を与えうる。例えば、いくつかの実施形態には、DNA結合ドメインポリペプチドおよびそのようなTADポリペプチドを含む転写活性化因子融合タンパク質が含まれる。転写活性化因子融合タンパク質においてTADに融合されている特定のDNA結合ドメインに応じて、トランス活性化を使用して対象の遺伝子の発現を増加させうる。例えば、DNA結合ドメインが結合する異種ポリヌクレオチドを対象の遺伝子に作動可能に連結させ、それによって、その結合が対象の遺伝子の発現を増加させる融合タンパク質 (およびその機能的TAD) を標的化しうる。代わりに、DNA結合ドメインを、対象の遺伝子に作動可能に連結されている、または近位にある内在性ポリヌクレオチドに結合するように操作しうる。転写活性化因子融合タンパク質が標的DNA結合部位に結合すると、標的DNA結合部位に作動可能に連結されている遺伝子の転写が刺激されうる。

【0008】

合成バリエーションTADタンパク質-タンパク質相互作用モチーフおよびそれをコードする核酸も本明細書に記載されている。いくつかの例では、合成バリエーションTADタンパク質-タンパク質相互作用モチーフは、1つまたは複数の変異 (例えば、保存的変異、または相互作用モチーフのオルソログにおいて同定された変異) をトランス活性化因子 (例えば、植物トランス活性化因子) のTAD中に導入することにより操作される。驚くべきことに、このようにして作製され、バリエーション相互作用モチーフを含む合成バリエーションTADは、転写活性化因子融合タンパク質におけるDNA結合ドメインに結合されると、非改変TADとは異なる遺伝子調節特性を与えうる。例えば、バリエーション相互作用モチーフを含む特定の合成バリエーションTADは、DNA結合ドメインを含む融合タンパク質において同じ位置で発現される場合、天然に存在するTAD相互作用モチーフにより与えられる転写活性化のレベルを増強しうる。

【0009】

いくつかの実施形態には、合成転写活性化因子融合タンパク質が含まれる。特定の形態では、融合タンパク質は対象の遺伝子の転写を増加させることができ、融合タンパク質は、TAD相互作用モチーフを含む第二のポリペプチドに作動可能に連結されたDNA結合ドメインを含む第一のポリペプチドを含む。いくつかの例では、TAD相互作用モチーフは、配列番号10~16からなるTAD相互作用モチーフの群から選択しうる。例えば、限定せずに、TAD相互作用モチーフは、配列番号2~8および配列番号100~106からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むTAD内に含まれうる。いくつかの例

では、TAD相互作用モチーフは、例えば、限定せずに、配列番号17~58からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するバリエーションTAD相互作用モチーフであってもよい。例えば、限定せずに、そのようなバリエーションTAD相互作用モチーフは、配列番号107~120からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むTAD内に含まれる。

【0010】

いくつかの実施形態には、TAD相互作用モチーフを含む第二のポリペプチドに作動可能に連結されたDNA結合ドメインを含む第一のポリペプチドを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。DNA結合ドメインポリペプチドは、特定の標的DNA結合部位に特異的に結合するいかなるDNA結合ドメインであってもよい。例えば、限定せずに、DNA結合ドメインポリペプチドは、ジンクフィンガー-DNA結合ドメイン、UPA DNA結合ドメイン、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択されるポリペプチドであってもよい。特定の例では、DNA結合ドメインコード配列は、配列番号67、配列番号68、および配列番号99からなる群から選択される。特定の例では、ポリヌクレオチドは、配列番号67、配列番号68、および配列番号99からなる群から選択される配列に少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または100%同一であるDNA結合タンパク質コード配列を含みうる。

10

【0011】

いくつかの例では、ポリヌクレオチドは、例えば、配列番号10~58から選択される配列を有するTAD相互作用モチーフまたはバリエーションTAD相互作用モチーフをコードするTAD相互作用モチーフコード配列を含みうる。特定の実施形態には、少なくとも1つのTAD相互作用モチーフを含む転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。特定の実施形態には、少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。

20

【0012】

本発明のいくつかの実施形態に従った合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの例には、DNA結合ドメインをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列およびTAD相互作用モチーフ（またはそのバリエーション）をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが含まれ、このポリヌクレオチドは、例えば、限定せずに、配列番号79~93、配列番号79~93のうちの1つと実質的に同一であるヌクレオチド配列、配列番号79~93のうちの1つに少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、配列番号79~93のうちの1つに少なくとも85%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、配列番号79~93のうちの1つに少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、配列番号79~93のうちの1つに少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、配列番号79~93のうちの1つに少なくとも97%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、配列番号79~93のうちの1つに少なくとも98%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、配列番号79~93のうちの1つに少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、配列番号79~93のうちの少なくとも1つに特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドの相補体、および配列番号79~93のうちの少なくとも1つに特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドの逆相補体からなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む。

30

40

【0013】

いくつかの実施形態では、転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、宿主細胞においてタンパク質を発現させる組換えベクターに組み込むことができる。したがって、いくつかの例には、本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むベクター、および/またはそのようなベクターが導入されている宿主細胞が含まれる。

【0014】

植物遺伝子発現のトランス活性化のための手段も本明細書に記載されている。本明細書

50

で使用される場合、「植物遺伝子発現のトランス活性化のための手段」には、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 22、配列番号 28、配列番号 46、および配列番号 52 からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、植物遺伝子発現のトランス活性化のための少なくとも 1 つの手段を含む合成タンパク質を使用して、植物細胞における対象の遺伝子の発現を調節することができる。

【0015】

さらに、遺伝子発現を増加させるための、ERF2 に由来する手段が本明細書に記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ERF2 に由来する手段」には、配列番号 17 ~ 22 および配列番号 121 からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、PTI4 に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、PTI4 に由来する手段」には、配列番号 23 ~ 28 および配列番号 122 からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、ATERF1 に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ATERF1 に由来する手段」には、配列番号 29 ~ 34 および配列番号 123 からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、ORCA2 に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ORCA2 に由来する手段」には、配列番号 35 ~ 40 および配列番号 124 からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、DREB1A に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、DREB1A に由来する手段」には、配列番号 41 ~ 46 および配列番号 125 からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、CBF1 に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、CBF1 に由来する手段」には、配列番号 47 ~ 52 および配列番号 126 からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、DOF1 に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、DOF1 に由来する手段」には、配列番号 53 ~ 58 および配列番号 127 からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。

【0016】

合成転写活性化因子融合タンパク質を利用して遺伝子発現を増加させるための手段も本明細書に記載されている。例では、合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、融合タンパク質の標的 DNA 結合部位に作動可能に連結されている対象の遺伝子を含む宿主細胞（例えば、植物細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、および不死化細胞）内に導入しうる。宿主細胞において融合タンパク質が発現し、それに続いて融合タンパク質が作動可能に連結された標的 DNA 結合部位に結合すると、対象の遺伝子の転写が開始されるまたは転写が増加しうる。特定の例では、標的 DNA 結合部位は、対象の遺伝子に作動可能に連結されるように宿主細胞内に導入することができる。追加の例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、対象の遺伝子に作動可能に連結されている標的 DNA 結合部位に結合するように操作されている DNA 結合ドメインポリペプチドを含みうる。

【0017】

いくつかの実施形態では、合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターは、このポリヌクレオチドが続いて（例えば、相同組換えを介して）宿主細胞のゲノム DNA 内に組み込まれるように宿主細胞内に導入することができる。したがって、合成転写活性化因子融合タンパク質、およびさらにそれをコードする核酸はトランスジェニック生物（例えば、トランスジェニック植物）内に含まれうる。したがって、そのようなトランスジェニック生物も本明細書に記載されている。例では、合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸は、トランスジェニック生物において細胞の

ゲノムに無作為に組み込まれても、または所定の位置で組み込まれてもよい。

【0018】

合成転写活性化因子融合タンパク質および/またはそれをコードする核酸を利用して対象の遺伝子を発現するための方法がさらに記載されている。いくつかの実施形態では、合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターは、融合タンパク質のための標的DNA結合部位に作動可能に連結されている対象の遺伝子を含む宿主細胞に導入することができる。いくつかの例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、植物遺伝子発現のトランス活性化のための手段を含む。ベクターが宿主細胞内に導入された後、対象の遺伝子の発現が開始または増加され、それによって、例えば、融合タンパク質の調節制御に従った量で、宿主細胞において対象の遺伝子の発現産物を産生することができる。そのような発現産物は、当技術分野で公知の任意の方法に従って宿主細胞から単離および/または精製することができる。

10

【0019】

前述のおよび他の特長は、添付の図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さらに明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】VP16トランス活性化ドメイン(TAD)、サブドメインII(配列番号9)の同定された相互作用モチーフである。アスタリスクは、VP16トランス活性化ドメイン、サブドメインIIのアミノ酸を示しており、Langlois et al. (2008) J. Am. Chem. Soc. 130:10596-604により提唱されているように、TFIIHのTfb1サブユニットに直接接触すると提唱されている。

20

【図2】VP16トランス活性化サブドメインIIと同定された植物TADのアライメントである。収載された植物TADは相互作用モチーフを含有する。アライメントされた相互作用モチーフは反転表示されている。VP16由来のサブドメインIIの相互作用モチーフの残基で、転写因子に接触すると提唱されてきた残基はアスタリスク(*)印で示されている。

【図3】ERF2のTAD相互作用モチーフに導入されてバリエーションERF2相互作用モチーフを生じることができる改変を示すアライメントである。天然のERF2およびVP16相互作用モチーフの配列は比較のために収載されている。直接接触は反転表示されている。

30

【図4】PTI4のTAD相互作用モチーフに導入されてバリエーションPTI4相互作用モチーフを生じることができる改変を示すアライメントである。天然のPTI4およびVP16相互作用モチーフの配列は比較のために収載されている。直接接触は反転表示されている。

【図5】AtERF1のTAD相互作用モチーフに導入されてバリエーションAtERF1相互作用モチーフを生じることができる改変を示すアライメントである。天然のAtERF1およびVP16相互作用モチーフの配列は比較のために収載されている。直接接触は反転表示されている。

【図6】ORCA2のTAD相互作用モチーフに導入されてバリエーションORCA2相互作用モチーフを生じることができる改変を示すアライメントである。天然のORCA2およびVP16相互作用モチーフの配列は比較のために収載されている。直接接触は反転表示されている。

40

【図7】DREB1AのTAD相互作用モチーフに導入されてバリエーションDREB1A相互作用モチーフを生じることができる改変を示すアライメントである。天然のDREB1AおよびVP16相互作用モチーフの配列は比較のために収載されている。直接接触は反転表示されている。

【図8】CBF1のTAD相互作用モチーフに導入されてバリエーションCBF1相互作用モチーフを生じることができる改変を示すアライメントである。天然のCBF1およびVP16相互作用モチーフの配列は比較のために収載されている。直接接触は反転表示されて

50

いる。

【図9】DOF1のTAD相互作用モチーフに導入されてバリエーションDOF1相互作用モチーフを生じることができる改変を示すアライメントである。天然のDOF1およびVP16相互作用モチーフの配列は比較のために収載されている。直接接触は反転表示されている。

【図10】酵母組込み型ベクター、pHO-zBG-MEL1のマップであり、MEL1レポーター遺伝子上流にHAS(高親和性部位; High Affinity Site)ZFP結合部位を含有する。ベクターは出芽酵母(*S. cerevisiae*)HO遺伝子座に対して標的化され、酵母と細菌の両方において選択のためにKanMX耐性遺伝子を含有していた。

【図11】酵母において様々な植物トランス活性化相互作用モチーフによる活性化から生じたMel1レポーター遺伝子の発現レベルのグラフ図である。

【図12】プラスミドpDAB9897のマップであり、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)アクチン2-プロモーターは、植物トランス活性化相互作用モチーフジンクフィンガー融合タンパク質を試験するために使用されるgusレポーター遺伝子を推進する8直列型ジンクフィンガー(Z6)結合部位548~749塩基対を転写開始部位の上流に含有する。バイナリーベクターは、標的レポーター植物イベント生産のためのpat選択可能マーカーを推進するシロイヌナズナ(*A. thaliana*)ユビキチン-10プロモーターも含有する。

【図13】プラスミドpDAB107881のマップである。

【図14】プラスミドpDAB107882のマップである。

【図15】プラスミドpDAB107883のマップである。

【図16】プラスミドpDAB107884のマップである。

【図17】プラスミドpDAB107885のマップである。

【図18】プラスミドpDAB107886のマップである。

【図19】プラスミドpDAB107887のマップである。

【図20】プラスミドpDAB106272のマップである。

【図21】プラスミドpDAB106238のマップである。

【図22】プラスミドpDAB106273のマップである。

【図23】プラスミドpDAB106274のマップである。

【図24】プラスミドpDAB106275のマップである。

【図25】プラスミドpDAB106276のマップである。

【図26】プラスミドpDAB106277のマップである。

【図27】プラスミドpDAB106278のマップである。

【図28】プラスミドpDAB106279のマップである。

【図29】様々な植物トランス活性化相互作用モチーフ処理について内在性遺伝子発現レベルにより正規化されたgus転写物レベルの平均および標準偏差(ダイヤモンド)ならびに四分位値(直線と箱)のグラフ図である。様々な植物トランス活性化相互作用モチーフからのgusレポーター遺伝子の活性化は、空ベクター対照およびVP16タンパク質のドメインIIサブユニットの活性化と比較された。

【図30】プラスミドpGalGUSのマップであり、gusレポーター遺伝子を推進するシロイヌナズナ(*A. thaliana*)アクチン-2プロモーターに融合されている6直列型Gal4結合部位は、Gal4結合タンパク質に融合されている植物トランス活性化相互作用モチーフを試験するために使用される。バイナリーベクターは、標的レポーター植物イベント生産のためのpat選択可能マーカーを推進するシロイヌナズナ(*A. thaliana*)ユビキチン-10プロモーターも含有する。

【図31】プラスミドpTALGUSのマップであり、gusレポーター遺伝子を推進するシロイヌナズナ(*A. thaliana*)アクチン-2プロモーターに融合されている8直列型UPA-Boxコンセンサス結合部位は、TAL結合タンパク質に融合されている植物トランス活性化相互作用モチーフを試験するために使用される。バイナリーベクターは、標

10

20

30

40

50

的レポーター植物イベント生産のための p a t 選択可能マーカーを推進するシロイヌナズナ (*A. thaliana*) ユビキチン - 1 0 プロモーターも含有する。

【発明を実施するための形態】

【0021】

配列表

添付の配列表に記載されている核酸配列は、37C.F.R. § 1.822に定義される通りに、ヌクレオチド塩基を表す標準文字省略形を使用して示されている。それぞれの核酸配列の1つの鎖のみが示されているが、その相補鎖は表示されている鎖への任意の参照により含まれると理解されている。添付の配列表では：

【0022】

配列番号1は、相互作用モチーフ（下線部）を含有するVP16植物トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDDFEFEQMFTDALGIDDFGG

【0023】

配列番号2は、相互作用モチーフ（下線部）を含有するERF2植物トランス活性化ドメインを示している：NDSEDMLVYGLLKDAFHFDTSSSDLSCLDFPA

【0024】

配列番号3は、相互作用モチーフ（下線部）を含有するPTI4植物トランス活性化ドメインを示している：CLTETWGDLPLKVDDSEDMVIYGLLKDALSVGWSPFSFTAG

【0025】

配列番号4は、相互作用モチーフ（下線部）を含有するAtERF1植物トランス活性化ドメインを示している：CFTESWGDLPLKENDSEDMLVYGI LNDAFHGG

【0026】

配列番号5は、相互作用モチーフ（下線部）を含有するORCA2植物トランス活性化ドメインを示している：FNENCEEII SPNYASEDLSDIILTDIFKDQDNYEDE

【0027】

配列番号6は、相互作用モチーフ（下線部）を含有するDREB1A植物トランス活性化ドメインを示している：GFDMEETLVEA IYTAEQSENAFYMHDEAMFEMPSLLANMAEGM

【0028】

配列番号7は、相互作用モチーフ（下線部）を含有するCBF1植物トランス活性化ドメインを示している：EQSEGAFYMDEETMFGMPTLLDNMAEG

【0029】

配列番号8は、相互作用モチーフ（下線部）を含有するDOF1植物トランス活性化ドメインを示している：SAGKAVLDDEDSFVWPAASFDMGACWAGAGFAD

【0030】

配列番号9は、配列番号1内の相互作用モチーフであるVP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIを示している：DDFEFEQMFTD

【0031】

配列番号10は、ERF2植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示している：DAFHFDTSSSD

【0032】

配列番号11は、PTI4植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示している：DSEDMV IYGLLKD

【0033】

配列番号12は、AtERF1植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示している：ENDSEDMLV

【0034】

配列番号13は、ORCA2植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示している：EDLSDI ILTD

【0035】

配列番号14は、DREB1A植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示して

10

20

30

40

50

いる : ENAFYMHDEAMFEMP

【 0 0 3 6 】

配列番号 1 5 は、 C B F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示している
: DEETMFGMP

【 0 0 3 7 】

配列番号 1 6 は、 D O F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示している
: EDSFVWPAASFD

【 0 0 3 8 】

配列番号 1 7 ~ 2 2 は、バリエント E R F 2 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している。

10

【 0 0 3 9 】

配列番号 2 3 ~ 2 8 は、バリエント P T I 4 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している。

【 0 0 4 0 】

配列番号 2 9 ~ 3 4 は、バリエント A t E R F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【 0 0 4 1 】

配列番号 3 5 ~ 4 0 は、バリエント O R C A 2 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【 0 0 4 2 】

配列番号 4 1 ~ 4 6 は、バリエント D R E B 1 A 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

20

【 0 0 4 3 】

配列番号 4 7 ~ 5 2 は、バリエント C B F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【 0 0 4 4 】

配列番号 5 3 ~ 5 8 は、バリエント D O F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【 0 0 4 5 】

配列番号 5 9 ~ 6 6 は、プラスミド p H O - z B G - M E L 1 の構築のために使用されるプライマーを示している。

30

【 0 0 4 6 】

配列番号 6 7 は、 Z 6 D N A 結合ドメインポリヌクレオチド配列を示している : TGTTGTTGGGAGAGGAGGGTGG

【 0 0 4 7 】

配列番号 6 8 は、 Z 6 D N A 結合ドメインの 8 x 直列型反復配列を示している : GGTGTTGGTGGGAGAGGAGGGTGGGAGTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCTCTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGAGATGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGTCTTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGGGATGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCCCTTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGAGGTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCTTAAGCCGC

40

【 0 0 4 8 】

配列番号 6 9 ~ 7 4 は、 p a t および p a l H P アッセイにおいて使用されるプライマーおよびプローブを示している。

【 0 0 4 9 】

配列番号 7 5 ~ 7 8 は、タバコにおける P T U の P C R 分析のために使用されるプライマーを示している。

【 0 0 5 0 】

配列番号 7 9 は、 Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された V P 1 6 由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列を示している : GGCATGACCCATGATCCTGTGTCTTATGGAGCCTTGGATGTTGATGACTTTGAGTTTGAGCAGATGTT CACAGATGCACTGGGCATCGATGACTTTGGTGGGA

50

【 0 0 5 1 】

配列番号 8 0 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された E R F 2 由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 3) を示している : AATGACTCTGAGGACATGCTGGTGTATGGTTTGCTCAAGGATGCCTTTTCACTTTGACACC
TCCAGCTCAGACCTCCTGCCTCTTTGACTTCCCAGCC

【 0 0 5 2 】

配列番号 8 1 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された P T I 4 由来の天然の植物トランス活性化相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 3) を示している : TGCCTGACAGAAACTTGGGGAGACTTGCCCTCTCAAGGTTGATGACTCTGAGGACATGGTGTATCTATGG
TCTGTTGAAGGATGCACTCTCAGTGGGGTGGTCCCCATTCTCTTTACGGCTGGT

10

【 0 0 5 3 】

配列番号 8 2 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された A t E R F 1 由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 3) を示している : TGCTTACCGAATCCTGGGGAGACCTTCTTTGAAGGAGAATGACTCTGAGGACAT
GTTGGTGTACGGAATCCTCAATGATGCTTTTTCATGGTGGC

【 0 0 5 4 】

配列番号 8 3 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された O R C A 2 由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 3) を示している : TTCAATGAGAATTGTGAAGAAATCATCTCTCCAAACTACGCATCAGAGGACTTGTCTG
ACATCATCTTGACGGACATCTTCAAGGACCAAGACAACCTATGAGGATGAG

20

【 0 0 5 5 】

配列番号 8 4 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された D R E B 1 A 由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 3) を示している : GGCTTTGACATGGAAGAAACATTGGTGGAGGCCATCTACACTGCTGAACAGAGCGA
GAATGCCCTTCTACATGCATGATGAGGCAATGTTTGAGATGCCATCTCTTCTGGCCAACATGGCTGAGGGAATG

【 0 0 5 6 】

配列番号 8 5 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された C B F 1 由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 3) を示している : GAACAGTCAGAAGGTGCTTTCTACATGGATGAAGAGACCATGTTTGGGATGCCAACCCCTT
CTGGATAACATGGCAGAGGGA

30

【 0 0 5 7 】

配列番号 8 6 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された D O F 1 由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 3) を示している : TCAGCTGGGAAGGCAGTCTTGGATGATGAGGACAGCTTTGTTTGGCCTGCTGCATCCTTT
GACATGGGTGCCTGCTGGGCTGGAGCTGGCTTTGCTGAC

【 0 0 5 8 】

配列番号 8 7 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された E R F 2 由来の例示的なバリエーション植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 2) を示している : AATGACTCTGAGGACATGCTGGTGTATGGTTTGCTCAAGGATGATTTT
CACTTTGAGACAATGTTCTCAGACCTGTCCTGCCTCTTTGACTTCCCAGCC

40

【 0 0 5 9 】

配列番号 8 8 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された P T I 4 由来の例示的なバリエーション植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 2) を示している : TGCCTGACAGAAACTTGGGGAGACTTGCCCTCTCAAGGTTGATGACTTT
GAGTTTGAGATGATGTTTACAGATGCACTCTCAGTGGGGTGGTCCCCATTCTCTTTACGGCTGGT

【 0 0 6 0 】

配列番号 8 9 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された A t E R F 1 由来の例示的なバリエーション植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 2) を示している : TGCTTACCGAATCCTGGGGAGACCTTCTTTGAAGGAGAATGA
CTTTGAGTTTAAAATGTTTACAGATTACGGAATCCTCAATGATGCTTTTTCATGGTGGC

50

【 0 0 6 1 】

配列番号 9 0 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された O R C A 2 由来の例示的なバリエーション植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 2) を示している : TTCAATGAGAATTGTGAAGAAATCATCTCTCCAAACTACGCATCAGAGGACTTTGATCTTGAGATGTTGACGGACATCTTCAAGGACCAAGACAACACTATGAGGATGAG

【 0 0 6 2 】

配列番号 9 1 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された D R E B 1 A 由来の例示的なバリエーション植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 2) を示している : GGCTTTGACATGGAAGAAACATTGGTGGAGGCCATCTACACTGCTGAACAGAGCGAGGACTTTGAGTTTGAAGCAATGTTTCATGGATTCTTCTTGGCCAACATGGCTGAGGGAATG

10

【 0 0 6 3 】

配列番号 9 2 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された C B F 1 由来の例示的なバリエーション植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 2) を示している : GAACAGTCAGAAGGTGCTTTCTACATGGATGACTTTGAGTTTCGAGACAATGTTTCATGGACACCCTTCTGGATAACATGGCAGAGGGA

【 0 0 6 4 】

配列番号 9 3 は、Z 6 ジンクフィンガー結合タンパク質に融合された D O F 1 由来の例示的なバリエーション植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列 (v 2) を示している : TCAGCTGGGAAGGCAGTCTTTGGATGATGAGGACTTTGAGTTTGAAGCCATGTTTCACGGACATGGGTGCTGCTGGGCTGGAGCTGGCTTTGCTGAC

20

【 0 0 6 5 】

配列番号 9 4 ~ 9 8 は、g u s および B Y E E F H P アッセイにおいて使用されるプライマーおよびプローブを示している。

【 0 0 6 6 】

配列番号 9 9 は、A V R B S 3 誘導性遺伝子のコンセンサス結合配列から取られ、U P A D N A 結合ドメインと名付けられた直列型反復配列を示している : TATATAAACCTNNCCCTCT

【 0 0 6 7 】

配列番号 1 0 0 は、E R F 2 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している : GMTHDPVSYGALDVDDAFHFDTSSSDALGIDDFGG

30

【 0 0 6 8 】

配列番号 1 0 1 は、P T I 4 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している : GMTHDPVSYGALDVDDSEDMVIYGLLKDALGIDDFGG

【 0 0 6 9 】

配列番号 1 0 2 は、A t E R F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している : GMTHDPVSYGALDVENDSEDMLVALGIDDFGG

【 0 0 7 0 】

配列番号 1 0 3 は、O R C A 2 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している : GMTHDPVSYGALDVEDLSDIILTDALGIDDFGG

40

【 0 0 7 1 】

配列番号 1 0 4 は、D R E B 1 A 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している : GMTHDPVSYGALDVENAFYMHDEAMFEMPALGIDDFGG

【 0 0 7 2 】

配列番号 1 0 5 は、C B F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している : GMTHDPVSYGALDVDEETMFGMPALG

50

I D D F G G

【 0 0 7 3 】

配列番号 1 0 6 は、D O F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVEDSFVWPAASFD
ALG I D D F G G

【 0 0 7 4 】

配列番号 1 0 7 は、バリエント E R F 2 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDD
FHFETMFSDALG I D D F G G

【 0 0 7 5 】

配列番号 1 0 8 は、バリエント E R F 2 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：NDSEDMLVYG
LLKDDFHFETMFSDLSCLDFDPA

【 0 0 7 6 】

配列番号 1 0 9 は、バリエント P T I 4 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDD
FEFEMFTDALG I D D F G G

【 0 0 7 7 】

配列番号 1 1 0 は、バリエント P T I 4 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：CLTETWGDLP
LKVDDFEFEMFTDALSVGWSPFSTAG

【 0 0 7 8 】

配列番号 1 1 1 は、バリエント A t E R F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGAL
DVENDFEFEMFTDALG I D D F G G

【 0 0 7 9 】

配列番号 1 1 2 は、バリエント A t E R F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：CFTESW
GDLPLKENDFEFEMFTDYG I L N D A F H G G

【 0 0 8 0 】

配列番号 1 1 3 は、バリエント O R C A 2 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDV
EDFDLEMLTDALG I D D F G G

【 0 0 8 1 】

配列番号 1 1 4 は、バリエント O R C A 2 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：FNENCEE I
ISP NYASEDFDLEMLTD I F K D Q D N Y E D E

【 0 0 8 2 】

配列番号 1 1 5 は、バリエント D R E B 1 A 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGAL
DVEDFEFEAMFMDALG I D D F G G

【 0 0 8 3 】

配列番号 1 1 6 は、バリエント D R E B 1 A 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GFDMEE
TLVEA I Y T A E Q S E D F E F E A M F M D S L L A N M A E G M

【 0 0 8 4 】

配列番号 1 1 7 は、バリエント C B F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDD
FEFETMFMDALG I D D F G G

【 0 0 8 5 】

10

20

30

40

50

配列番号 118 は、バリエーション C B F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している: EQSEGA FYMD
DFEFETMFMDTLLDNMAEG

【0086】

配列番号 119 は、バリエーション D O F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している: GMTHDPVSYGALDVED
FEFEAMFTDALGIDDFGG

【0087】

配列番号 120 は、バリエーション D O F 1 植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ (下線部) を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している: SAGKAVLDDE
DFEFEAMFTDMGACWAGAGFAD

10

【0088】

配列番号 121 ~ 127 は、バリエーション植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している。

【0089】

I. いくつかの実施形態の概観

新規の植物トランス活性化ドメイン (TAD)、TAD 相互作用モチーフならびに転写活性化因子として有用である可能性があり、対象の遺伝子の転写活性化のために合成転写活性化因子融合タンパク質において DNA 結合ポリペプチドと融合しうる前述の合成バリエーションが本明細書で開示される。本明細書で開示される特定の新規の植物 TAD および TAD 相互作用モチーフは、植物タンパク質である ERF2、PTI4、AtERF1、ORCA2、DREB1A、CBF1 および DOF1 から単離された。本明細書に記載される新規の植物 TAD および / または TAD 相互作用モチーフを含む合成転写活性化因子融合タンパク質は、遺伝子発現を増加させる (例えば、開始させる) ために特定の実施形態において、種々の細胞 (例えば、酵母細胞および植物細胞) において事実上どんな遺伝子のためにも利用することができる。

20

【0090】

トランス活性化ドメインは機能的に自律的であり、すなわち、単一の TAD は、多くの様々な異種 DNA 結合ドメインの 1 つに融合されると、およびプロモーター領域の異なる位置に繋ぎ止められると、転写を調節することができる。Hall and Struhl (2002)、上記。TAD は、一次配列相同性をほとんど共有しておらず、標的に結合した場合にのみ明確な構造をとると考えられている。Sigler (1988)、上記。TAD 内の酸性および疎水性残基は重要であると考えられている (例えば、Cress and Triezenberg (1991)、上記を参照されたい) が、活性への個々の残基の寄与は小さいと考えられている。Hall and Struhl (2002)、上記。

30

【0091】

合成トランス活性化ドメイン相互作用モチーフが植物細胞において発現を開始または増強するように機能するかどうかを先験的に予測するのは困難である。このように予測不可能であることは、少なくとも一部が、一部の TAD がその細胞内濃度とその TAD の強度の両方の機能として「スケルチング (squelching)」をもたらす (例えば、細胞転写機構の構成成分を滴定することにより) ことがある非常に強力なトランス活性化因子であることの結果でありうる。例えば、米国特許第 6,271,341 号 (段階的遺伝子調節の変異 VP16 TAD) を参照されたい。

40

【0092】

VP16 TAD と配列相同性を共有するある種の新規の植物 TAD および TAD 相互作用モチーフはその制御下の遺伝子に非常に異なるレベルの調節を与えるという予想外の知見が本明細書で開示される。TAD を「交換 (swapping)」するための一般化可能な戦略を使用して合成転写活性化因子融合タンパク質を産生すると、驚くべきことに、PTI4、DREB1A、ERF2 および CBF1 から単離される新規の TAD および TAD 相互作用モチーフは、当技術分野で非常に優れたトランス活性化因子と認識されている VP

50

16により与えられるよりも、植物細胞において遺伝子転写を大きく増加させることができることを見出された。ATERF1、ORCA2、およびDOF1由来の新規のTADおよびTAD相互作用モチーフが与える遺伝子転写の増加は少ないことも見出された。

【0093】

天然の配列に関してごく僅かの小さなアミノ酸変化を含むバリエーションTADおよびTAD相互作用モチーフは、天然のTADにより示される遺伝子調節特性をさらに増強または調整することができるという予想外の知見も本明細書で開示される。例えば、驚くべきことに、バリエーションERF2およびCBF1 TAD相互作用モチーフは、植物における対応する天然の相互作用モチーフよりもその制御下にある遺伝子の顕著に多くの転写をもたらすことを見出された。

10

【0094】

II. 省略字

chs	カルコンシンターゼ遺伝子	
HAS	高親和性部位	
HP	加水分解プロープ	
HSV	単純ヘルペスウイルス (Herpes Simplex Virus)	
MS	ムラシゲおよびスクーグ	
PNPG	p-ニトロフェニル-アルファ-D-グルコピラノシド	
PTU	植物転写ユニット	
SSC	生理食塩水-クエン酸ナトリウム	20
TAD	トランス活性化ドメイン	
TBP	TATA-結合タンパク質	
T-DNA	トランスファーDNA	
TFIIB	転写因子IIB	
TFIIH	転写因子IIH	
Ti	腫瘍誘導 (A. ツメファシエンス (A. tumefaciens) 由来プラスミド)	
UAS	上流活性化配列	
VP16	単純ヘルペス (Herpes Simplex) ビリオンタンパク質16	

20

【0095】

III. 用語

本開示の様々な実施形態の概説を容易にするために、特定の用語について以下に説明する。

30

【0096】

内在性の：本明細書で使用される場合、用語「内在性の」とは特定の生物、組織、または細胞内を起源とする物質（例えば、核酸分子およびポリペプチド）のことである。例えば、植物細胞において発現される「内在性」ポリペプチドとは、同一種の遺伝的に操作されていない植物と同じ種類の細胞において正常に発現されるポリペプチドのことであってもよい。同様に、植物細胞に含まれる「内在性」核酸とは、同一種の遺伝的に操作されていない植物と同じ種類の細胞において正常に存在する核酸（例えば、ゲノムDNA）のことであってもよい。

40

【0097】

発現：本明細書で使用される場合、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cDNAを含む）のコード情報が細胞の作動的、非作動的、または構造的部分（例えば、タンパク質）に変換されるプロセスのことである。遺伝子発現は、外部シグナル、例えば、そこに含まれる遺伝子の発現を増加または減少させる作用物質への細胞、組織、または生物の曝露により影響を受ける可能性がある。遺伝子の発現は、DNAからRNAからタンパク質への経路中のどの場所でも調節することができる。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作用する制御を通じて、または産生された後の特定のタンパク質分子の活性化、不活性化、区画化、もしくは分解を通じて、または前述のいずれの

50

組合せによっても遺伝子発現の調節は起こる。遺伝子発現は、限定せずに、ノーザンプロット、RT-PCR、ウェスタンプロット、およびインビトロ、インサイツ、またはインビボタンパク質活性アッセイ（複数可）を含む、当技術分野で公知の方法によりRNAレベルでまたはタンパク質レベルで測定することが可能である。

【0098】

発現を増加させる：本明細書で使用される場合、用語「発現を増加させる」とは、発現の開始、ならびに鑄型構築物から産生される発現産物の量の量的増加のことである。いくつかの実施形態では、TADを含むポリペプチドを使用して核酸からの「発現を増加させる」ことができる。そのような実施形態では、発現の増加は、対照において（例えば、植物トランス活性化ドメインを含むタンパク質の非存在下で構築物から）産生される発現産物の量と比較することにより決定しうる。

10

【0099】

融合タンパク質：本明細書で使用される場合、用語「融合タンパク質」とは、少なくとも2つの作動可能に連結されたポリペプチドを含む分子のことである。ある種の例では、この2つの作動可能に連結されたポリペプチドは（例えば、異なる生物において）異なる遺伝子産物の一部として正常に発現しうる。追加の例では、この少なくとも2つの作動可能に連結されたポリペプチドは、異なる遺伝子産物の一部として正常に発現されるポリペプチドに由来していてもよい。本明細書に記載される融合タンパク質に存在する作動可能に連結されたポリペプチドは、典型的には融合タンパク質が発現されることになっている細胞において少なくとも1つの標的タンパク質または核酸と相互作用をする。例えば、作動可能に連結されたポリペプチドは、細胞転写機構の1つまたは複数の転写因子（複数可）もしくはタンパク質性エレメント（複数可）と相互作用してもよいし、または特定のポリペプチドもしくは核酸の構造エレメントと相互作用してもよい。

20

【0100】

異種性の：本明細書で使用される場合、用語「異種性の」とは、特定の生物、組織、または細胞内を起源としない物質（例えば、核酸分子およびポリペプチド）のことである。例えば、植物細胞において発現される「異種」ポリペプチドとは、同一種の遺伝的に操作されていない植物とは同じ種類の細胞において正常に発現されないポリペプチド（例えば、同じ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）であってもよい。

30

【0101】

単離された：「単離された」生体成分（例えば、核酸またはタンパク質）は、この成分が天然に存在する生物の細胞における他の生体成分（例えば、他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、ならびにタンパク質）から実質的に分離されている、別個に産生されている、またはそれから離れて精製されていて、同時に前記成分の化学的または機能的変化をもたらす（例えば、核酸は、この核酸と染色体中の残りのDNAを結びつけている化学結合を切断することにより染色体から単離されてもよい）。「単離」されている核酸分子およびタンパク質は、標準精製法により精製された核酸分子およびタンパク質を含んでいてもよい。この用語は、宿主細胞において組換え発現により調製される核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成される核酸分子、タンパク質、およびペプチドを包含する。

40

【0102】

核酸分子：本明細書で使用される場合、用語「核酸分子」とは、多量体型のヌクレオチドであってよく、これにはRNA、cDNA、ゲノムDNAのセンス鎖とアンチセンス鎖の両方ならびに上記の合成型および混合ポリマーが含まれていてもよい。ヌクレオチドとは、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改変型のことであってもよい。本明細書で使用される「核酸分子」は「核酸」および「ポリヌクレオチド」と同義である。核酸分子は、他に特に規定されていなければ、通常少なくとも10塩基長である。この用語には、一本鎖および二本鎖型のDNAが含まれる。核酸分子は、天然に存在するおよび/または天然には存在しないヌクレオチド連鎖によ

50

り互いに連結された天然に存在するヌクレオチドと改変されたヌクレオチドのいずれかまたは両方を含むことができる。

【0103】

「外来性」分子は、ヌクレオチド配列および/またはポリヌクレオチドのゲノム位置に関してならびにアミノ酸配列および/またはポリペプチドの細胞局在に関して特定の系（例えば、生殖質、変種、優良変種、および/または植物）を原産としない分子である。実施形態では、外来性もしくは異種ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、生体系（例えば、植物細胞、植物遺伝子、特定の植物種もしくは変種および/または植物染色体）に人為的に供給されておりその特定の生体系を原産としない分子であってもよい。したがって、核酸を「外来性」と指定することは、核酸が天然に存在する供給源以外の供給源を起源としたことを示していてもよく、または核酸が、天然にはない立体配置、遺伝子位置、もしくはエレメントの配置を有することを示していてもよい。

10

【0104】

これとは対照的に、例えば、「天然の」または「内在性の」核酸は、核酸が自然界において通常見出される染色体または他の遺伝物質に通常存在する核酸エレメント以外の核酸エレメントを含有しない核酸（例えば、遺伝子）である。内在性遺伝子転写物は、その天然の染色体遺伝子座でヌクレオチド配列によりコードされており、細胞に人為的に供給されてはいない。

【0105】

核酸分子は、当業者であれば容易に認識するように、化学的にもしくは生化学的に改変されていることもあれば、または非天然のもしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有していることもある。そのような改変には、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の一つまたは複数の類似物での置換、ヌクレオチド間改変（例えば、非荷電連鎖、例えば、メチルホスホン酸、リン酸トリエステル、ホスホロアミド酸、カルバミン酸、等；荷電連鎖、例えば、ホスホロチオエート、ジチオリン酸、等；懸垂部分、例えば、ペプチド；インターカレーター、例えば、アクリジン、ソラレン、等；キレーター；アルキル化剤；および改変連鎖、例えば、アルファアノマー核酸、等）が含まれる。用語「核酸分子」には、一本鎖、二本鎖、部分的二重鎖、三重鎖、ヘアピン、環状、およびパドロック（padlocked）立体構造を含む、任意のトポロジー立体構造も含まれる。

20

【0106】

いくつかの実施形態は、特定形態の核酸、オリゴヌクレオチドを用いる。オリゴヌクレオチドは比較的短い核酸分子であり、典型的には50またはそれよりも少ない核酸塩基を含む（しかし、一部のオリゴヌクレオチドは50を超える核酸塩基を含みうる）。オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチド配列を含むより長い核酸の切断（例えば、制限消化）により形成されることもあれば、または個々のヌクレオシドホスホロアミダイトから、配列特異的に化学的に合成されることもある。

30

【0107】

オリゴヌクレオチドは、特定のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出するためのプローブ配列として使用することができる。前述の内容に従えば、オリゴヌクレオチドプローブは合成的にまたはクローニングにより調製してもよい。適切なクローニングベクターは当業者には公知である。オリゴヌクレオチドプローブは標識されていてもよいし非標識でもよい。例えば、限定せずに、ニックトランスレーションによる放射標識、ランダムプライミング、および末端デオキシトランスフェラーゼでのテーリング（tailing）を含む、核酸分子を標識するための多種多様の技法が存在し、用いられるヌクレオチドは、例えば、放射性³²Pで標識される。使用することができる他の標識には、例えば、限定せずに、フルオロフォア、酵素、酵素基質、酵素補因子、および酵素阻害剤が含まれる。代わりに、単独でまたは他の反応性薬剤と併せて、検出可能なシグナルを発生する標識の使用は、受容体が結合するリガンドで置き換えてもよく、受容体は単独または他の試薬と併せてのいずれかで、検出可能なシグナルを発生するように標識されている（例えば、上記の標識により）。例えば、Leary et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4045-9を参

40

50

照されたい。

【0108】

本発明のいくつかの実施形態には、ヌクレオチド標的配列に「特異的にハイブリダイズ可能である」または「特異的に相補的である」ポリヌクレオチドが含まれる。「特異的にハイブリダイズ可能である」および「特異的に相補的である」は、ポリヌクレオチドと特定のヌクレオチド標的配列を含む核酸分子との間で安定した特異的結合が起こる程度の十分な相補性を示す用語である。核酸分子は、特異的にハイブリダイズ可能であるためにその標的配列に100%相補的である必要はない。核酸分子は、特異的結合が望ましい条件下で、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、非標的配列への核酸の非特異的結合を回避する程度の十分な相補性がある場合には特異的にハイブリダイズ可能である。

10

【0109】

特定のストリンジェンシー度をもたらすハイブリダイゼーション条件は、好ましいハイブリダイゼーション法の性質およびハイブリダイズする核酸配列の組成と長さに応じて変化する。一般的には、ハイブリダイゼーション温度およびハイブリダイゼーションバッファのイオン強度（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に寄与するが、洗浄回数もストリンジェンシーに影響する。特定のストリンジェンシー度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*, 2nd ed., 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 で考察されている。核酸のハイブリダイゼーションに関するさらに詳細な指示と手引きは、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 1, 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 に見ることができる。

20

【0110】

本明細書で使用される場合、「ストリンジェントな条件」は、ハイブリダイゼーション分子とDNA標的の間のミスマッチが25%未満である場合にのみハイブリダイゼーションが起こる条件を包含する。「ストリンジェントな条件」は特定レベルのストリンジェンシーをさらに含む。したがって、本明細書で使用される場合、「穏やかなストリンジェンシー」条件は、配列ミスマッチが25%を超える分子ではハイブリダイズしない条件であり、「中間のストリンジェンシー」はミスマッチが15%を超える分子ではハイブリダイズしない条件であり、「高ストリンジェンシー」の条件はミスマッチが10%を超える配列ではハイブリダイズしない条件である。「超高ストリンジェンシー」の条件は、ミスマッチが6%を超える配列ではハイブリダイズしない条件である。

30

【0111】

特定の実施形態では、ストリンジェントな条件は、PerfectHyb（商標）プラスハイブリダイゼーションバッファ（Sigma-Aldrich）中65で1時間のハイブリダイゼーション、続いて0.1xSSC/0.1%SDS中65での40分間連続洗浄である。

40

【0112】

作動可能に連結されたヌクレオチド配列：第一のヌクレオチド配列は、それが第二のヌクレオチド配列と機能的な関係がある場合、第二のヌクレオチド配列とまたは第二のヌクレオチド配列に「作動可能に連結」されている。例えば、プロモーターは、それがコード配列の転写または発現に影響を与える場合コード配列に作動可能に連結されている。組換え産生される場合、作動可能に連結されたヌクレオチド配列は一般に連続しており、必要に応じて同一リーディングフレームにおいて2つのタンパク質コード領域を結合させる。

50

しかし、ヌクレオチド配列は作動可能に連結されるのに連続している必要はない。

【0113】

用語「作動可能に連結された」は、遺伝子調節配列およびコード配列に関連して使用される場合、調節配列は連結されたコード配列の発現に影響を与えることを意味する。「調節配列」または「制御エレメント」とは、転写の時機およびレベル/量、RNAプロセッシングもしくは安定性、または関連するコード配列の翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列のことである。従来の調節配列は、5'非翻訳領域、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、リプレッサー結合配列、終止配列、ポリアデニル化認識配列、等を含みうる。特定の調節配列は、それに作動可能に連結されたコード配列の上流および/または下流に位置していることがある。さらに、コード配列に作動可能に連結された特定の調節配列は、二本鎖核酸分子の関連する相補鎖上に位置しうる。コード配列に「作動可能に連結」しうるエレメントは、プロモーターまたは他の従来の調節配列に限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、トランス活性化タンパク質のDNA結合ドメインは、トランス活性化タンパク質がプロモーターもしくは他の調節領域、またはそれに結合している分子（例えば、転写因子）と相互作用して転写に影響を与えるように、プロモーターまたは他の調節領域の近位にあるヌクレオチド配列に結合してもよい。そのような例では、トランス活性化タンパク質がそのDNA結合ドメインを通じて結合しているヌクレオチド配列は、プロモーターまたは他の調節配列の制御下でコード配列に「作動可能に連結」している。

10

【0114】

作動可能に連結したポリペプチド：ポリペプチドに関して本明細書で使用される場合、用語「作動可能に連結した」とは、単一分子（例えば、融合タンパク質）に、それぞれのポリペプチドがその意図される機能を果たすことができるように繋がっている少なくとも2つのポリペプチドのことである。典型的には、この少なくとも2つのポリペプチドはペプチド結合を通じて共有結合している。作動可能に連結されたポリペプチドを含む融合タンパク質は、標準組換えDNA技法により産生することができる。例えば、第一のポリペプチドをコードするDNA分子は第二のポリペプチドをコードする別のDNA分子にライゲーションされていてよく、こうして得られるハイブリッドDNA分子は宿主細胞において発現され、第一および第二のポリペプチドを含む融合タンパク質を産生することができる。特定の例では、この2つのDNA分子は、ライゲーション後に、コードされたポリペプチドの翻訳フレームが変更されない（すなわち、DNA分子がインフレームで互いにライゲーションされている）ように、5'から3'方向に互いにライゲーションすることができる。

20

30

【0115】

プロモーター：本明細書で使用される場合、用語「プロモーター」とは、DNAのうち、転写開始の上流にあり、RNAポリメラーゼおよび他のタンパク質の認識および結合に関与して転写をもたらすことができる領域のことである。プロモーターは細胞内での発現のためにコード配列に作動可能に連結していてもよく、またはプロモーターは、細胞内での発現のためにコード配列に作動可能に連結されていてもよいシグナル配列をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されていてもよい。「植物プロモーター」は植物細胞において転写を開始することができるプロモーターであってよい。

40

【0116】

発生制御下のプロモーターの例には、ある特定の組織、例えば、限定せずに、葉、根、種子、繊維、木部導管、仮導管、または厚壁組織において優先的に転写を開始するプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターは、「組織優先的（tissue-preferred）」と呼ばれる。ある特定の組織においてのみ転写を開始するプロモーターは「組織特異的」と呼ばれる。「細胞型特異的」プロモーターは主として、1つまたは複数の器官中のある特定の細胞型において、例えば、限定せずに、根または葉中の血管細胞において転写をもたらす。例示的な組織特異的または組織優先的プロモーターには、ファゼオリン遺伝子由来のプロモーターなどの根優先的プロモーター、キャブまたはルビスコ由来のプロモーター

50

などの葉特異的光誘導プロモーター、LAT52由来のプロモーターなどの葯特異のプロモーター、Zm13由来のプロモーターなどの花粉特異のプロモーター、およびapg由来のプロモーターなどの小孢子優先的プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【0117】

「誘導性」プロモーターは、環境制御下にあることがあるプロモーターでもよい。Ward et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366を参照されたい。誘導性プロモーターにより転写を開始することができる環境条件の例には、例えば、限定せずに、嫌気性条件および光の存在が含まれる。誘導性プロモーターを使用すれば、転写速度は誘導物質に応答して増加する。例示的な誘導性プロモーターには、銅に応答するACEI系由来のプロモーター、ベンゼンスルホンアミド除草剤解毒剤 (herbicide safener) に応答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、およびその転写活性が糖質コルチコステロイドホルモンにより誘導することができるステロイドホルモン遺伝子由来の誘導性プロモーター (Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0118】

組織特異的、組織優先的、細胞型特異的、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」プロモーターは、大半の環境条件下で活性であることができるプロモーターである。例示的な構成的プロモーターには、CaMV由来の35Sプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、イネ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'側XbaI/NcoI断片 (または前記XbaI/NcoI断片へのヌクレオチド配列類似性) (国際PCT出願第WO96/30530号) が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0119】

前述の構成的および非構成的プロモーターのいずれでも本発明のいくつかの実施形態において利用することができる。例えば、合成転写活性化因子融合タンパク質の活性により調節されることになる遺伝子を提供することができ (例えば、宿主細胞において)、この遺伝子はプロモーターに作動可能に連結されている。

30

【0120】

配列同一性：2つの核酸またはポリペプチド配列という状況において本明細書で使用される用語「配列同一性」または「同一性」とは、指定された比較ウィンドウにわたり最大一致になるようにアライメントさせた場合同じである2つの配列中の残基のことであってもよい。

【0121】

本明細書で使用される場合、用語「配列同一性の百分率」とは、比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列された配列 (例えば、核酸配列およびアミノ酸配列) を比較することにより決定される値のことであってもよく、比較ウィンドウにおける配列の一部は、この2つの配列の最適アライメントの基準配列 (付加も欠失も含まない) と比べた場合、付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含んでいてもよい。百分率は、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数を決定して適合する位置の数を出し、適合する位置の数を比較ウィンドウの位置の総数で割って、その結果に100を掛けて、配列同一性の百分率を出すことにより計算される。

40

【0122】

比較のために配列をアライメントさせるための方法は当技術分野では周知である。様々なプログラムおよびアライメントアルゴリズムが、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. 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

50

) 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) FEBS Microbiol. Lett. 174:247-50に記載されている。配列アライメント法および相同性計算の詳細な検討は、例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10に見出すことができる。

【0123】

国立バイオテクノロジー情報センター (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と接続して使用するために、国立バイオテクノロジー情報センター (Bethesda, MD) を含むいくつかの供給源からおよびインターネット上で入手可能である。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、インターネット上のBLAST (商標) の「ヘルプ」欄で入手可能である。核酸配列の比較では、BLAST (商標) (blastn) プログラムの「blast2 配列」機能をデフォルトパラメータを使用して用いることができる。基準配列にはるかに大きな類似性を有する核酸配列は、この方法により評価される場合には、百分率同一性の増加を示すことになる。

10

【0124】

ヌクレオチド配列に関して本明細書で使用される場合、用語「実質的に同一の」とは、85%を超えて同一である配列のことであってもよい。例えば、実質的に同一のヌクレオチド配列は、基準配列に少なくとも85.5%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、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%、または少なくとも99.5%同一であってもよい。

20

【0125】

保存的置換：本明細書で使用される場合、用語「保存的置換」とは、アミノ酸残基が同じクラスの別のアミノ酸と置換されている置換のことである。非保存的アミノ酸置換は、残基が同じクラスに分類されない置換、例えば、塩基性アミノ酸での中性または非極性アミノ酸の置換である。保存的置換を実施する目的で定義されうるアミノ酸のクラスは当技術分野では公知である。

30

【0126】

いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の脂肪族アミノ酸の、第二の異なる脂肪族アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がGly、Ala、Pro、Ile、Leu、Val、およびMetのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はGly、Ala、Pro、Ile、Leu、Val、およびMetから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。特定の例では、第一のアミノ酸がGly、Ala、Pro、Ile、Leu、およびValのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はGly、Ala、Pro、Ile、Leu、およびValから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。疎水性脂肪族アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がAla、Pro、Ile、Leu、およびValのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はAla、Pro、Ile、Leu、およびValから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

40

【0127】

いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の芳香族アミノ酸の、第二の異なる芳香族アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がHis、Phe、Trp、およびTyrのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はHis、Phe、Trp、およびTyrから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。非荷電芳香族アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がPhe、Trp、およびTyrのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はPhe、Trp、およびTyrから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

50

【0128】

いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の疎水性アミノ酸の、第二の異なる疎水性アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がAla、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Tyr、およびTrpのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はAla、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Tyr、およびTrpから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。非芳香族、疎水性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がAla、Val、Ile、Leu、およびMetのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はAla、Val、Ile、Leu、およびMetから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

【0129】

いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の極性アミノ酸の、第二の異なる極性アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がSer、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、Lys、Asp、およびGluのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はSer、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、Lys、Asp、およびGluから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。非荷電、極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がSer、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、およびProのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はSer、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、およびProから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。荷電、極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がHis、Arg、Lys、Asp、およびGluのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はHis、Arg、Lys、Asp、およびGluから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。荷電、極性アミノ酸の置換を伴う追加の例では、第一のアミノ酸がArg、Lys、Asp、およびGluのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はArg、Lys、Asp、およびGluから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。正荷電（塩基性）、極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がHis、Arg、およびLysのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はHis、Arg、およびLysから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。正に荷電した極性アミノ酸の置換を伴う追加の例では、第一のアミノ酸がArgまたはLysである場合、この第一のアミノ酸はArgおよびLysのうちのもう一方のアミノ酸により置き換えられてもよい。負に荷電した（酸性）極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がAspまたはGluである場合、この第一のアミノ酸はAspおよびGluのうちのもう一方のアミノ酸により置き換えられてもよい。正に荷電した極性アミノ酸以外の極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がSer、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Asp、およびGluのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はSer、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Asp、およびGluから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。負に荷電した極性アミノ酸以外の極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がSer、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、およびLysのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はSer、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、およびLysから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

【0130】

いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の電氣的に中性のアミノ酸の、第二の異なる電氣的に中性のアミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がGly、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln、およびTyrのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はGly、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln、およびTyrから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

【0131】

いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の非極性アミノ酸の、第二の異なる非

10

20

30

40

50

極性アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がAla、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Pro、およびMetのうちの一つである場合、この第一のアミノ酸はAla、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Pro、およびMetから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

【0132】

多くの例では、第一のアミノ酸を置き換えるために保存的置換において使用される特定の第二のアミノ酸の選択は、第一および第二のアミノ酸の両方が属する前述のクラスの数を最大にするために行い。したがって、第一のアミノ酸がSer（極性、非芳香族および電氣的に中性のアミノ酸）である場合、第二のアミノ酸は別の極性アミノ酸（すなわち、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、Lys、Asp、またはGlu）、別の非芳香族アミノ酸（すなわち、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、Lys、Asp、Glu、Ala、Ile、Leu、Val、またはMet）、または別の電氣的に中性のアミノ酸（すなわち、Gly、Thr、Cys、Asn、Gln、またはTyr）であってもよい。しかし、この場合の第二のアミノ酸はThr、Asn、Gln、Cys、およびGlyのうちの一つであるのが好ましいことがある。なぜならば、これらのアミノ酸は極性、非芳香族性、および電氣的中性に従ってすべての分類を共有しているからである。保存的置換において使用される特定の第二のアミノ酸を選択するのに場合により使用してもよい追加の基準は当技術分野では公知である。例えば、Thr、Asn、Gln、Cys、およびGlyがSerの保存的置換において使用されるのに利用可能である場合、Cysは望ましくない架橋および/またはジスルフィド結合の形成を回避するためには選択から除外するのがよい。同様に、Glyは、アルキル側鎖を欠いているので、選択から除外するのがよい。この場合、Thrは、例えば、側鎖ヒドロキシル基の機能性を保持するために選択してもよい。しかし、保存的置換において使用される特定の第二のアミノ酸の選択は、最終的には当業者の裁量に任せられる。

10

20

【0133】

アミノ酸配列との関係において本明細書で使用される用語「誘導体」は、本発明の融合タンパク質の化学的修飾を意味する。

【0134】

トランス活性化タンパク質：本明細書で使用される場合、用語「トランス活性化タンパク質」（または「トランス活性化因子」または「転写活性化因子タンパク質」または「転写活性化因子融合タンパク質」とは、核酸エレメントに結合し、この核酸エレメントに作動可能に連結されているポリヌクレオチド（例えば、対象の遺伝子）の転写を開始または増強するポリペプチドのことである。ある種の生物原産であるトランス活性化タンパク質には、例えば、限定せずに、ジンクフィンガーDNA結合タンパク質、UPA DNA結合ドメイン、GAL4、およびTALが含まれる。本発明の特定の実施形態には、DNA結合タンパク質由来の少なくとも一つのDNA結合ドメインおよび植物トランス活性化ドメイン由来の相互作用モチーフを含む合成融合タンパク質トランス活性化因子が含まれる。

30

【0135】

特異的結合：ポリペプチドおよびタンパク質ドメインに関して本明細書で使用される場合、用語「特異的結合」とは、安定して特異的な結合が結合パートナー（複数可）と起こるが、特異的に結合するポリペプチドにより認識される特異的アミノ酸配列または特異的ヌクレオチド配列を欠く他の分子とは起こらないほど、ポリペプチドまたはタンパク質ドメインとその結合パートナー（複数可）（例えば、特定のアミノ酸配列を含むポリペプチド（複数可）または特定のヌクレオチド配列を含む核酸（複数可））との間の十分に強力な相互作用のことである。安定して特異的な結合は、「プルダウン」アッセイ（例えば、GSTプルダウン）、酵母2ハイブリッドアッセイ、酵母3ハイブリッドアッセイ、ELISA、等などの当業者には常用の技法により確かめることができる。互いへの「特異的結合」という属性を有する分子は互いに「特異的に結合する」と言ってもよい。

40

50

【 0 1 3 6 】

形質転換：本明細書で使用される場合、用語「形質転換」とは、1つまたは複数の核酸分子（複数可）の細胞内への移入のことである。細胞は、核酸分子の細胞ゲノム内への組み込みにより、またはエピソーム複製のどちらかにより、核酸分子が細胞によって安定的に複製されるようになると、細胞内に移入された核酸分子により「形質転換」される。本明細書で使用される場合、用語「形質転換」は、核酸分子をそのような細胞に導入することができるすべての技法を包含する。例には、ウイルスベクターでのトランスフェクション、プラスミドベクターでの形質転換、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 (Agrobacterium) 媒介移入 (Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7)、直接DNA取込み、および微粒子銃 (Klein et al. (1987) Nature 327:70) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【 0 1 3 7 】

導入遺伝子：外来性核酸配列。いくつかの例では、導入遺伝子は、少なくとも1つの合成転写活性化因子融合タンパク質を含むポリペプチドをコードする配列であってよい。いくつかの例では、導入遺伝子は、少なくとも1つの植物TADおよび/または少なくとも1つのバリエーションTADを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードしていてもよい。いくつかの例では、導入遺伝子は対象の遺伝子（例えば、レポーター遺伝子、除草剤抵抗性を与える遺伝子、および農業的に重要な植物形質に寄与する遺伝子）をコードしていてもよい。これらのおよび他の例では、導入遺伝子は、導入遺伝子のコード配列に作動可能に連結された1つまたは複数の調節配列（例えば、プロモーター）を含有していてもよい。本開示の目的のために、用語「トランスジェニック」とは、生物（例えば、植物）を指すのに使用される場合、外来性核酸配列を含む生物のことである。いくつかの例では、外来性核酸配列を含む生物は、核酸配列が分子形質転換技法を経て導入された生物であってよい。他の例では、外来性核酸配列を含む生物は、核酸配列が、例えば、植物において遺伝子移入または他家受粉により導入された生物であってよい。

20

【 0 1 3 8 】

ベクター：本明細書で使用される場合、用語「ベクター」とは、例えば、形質転換細胞を産生するために細胞内に導入することができる核酸分子のことである。ベクターは、宿主細胞においてベクターを複製させる、複製起点などの核酸配列を含みうる。ベクターの例には、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ、および外来性DNAを細胞内に運ぶウイルスが含まれるが、これらに限定されない。ベクターは、1つまたは複数の遺伝子、アンチセンス分子、および/または選択可能マーカー遺伝子ならびに当該技術分野で公知の他の遺伝要素も含んでいてもよい。ベクターは細胞を形質導入する、形質転換する、または感染して、それによってベクターによりコードされた核酸分子および/またはタンパク質を細胞に発現させてもよい。ベクターは場合によって、核酸分子の細胞内への進入を達成するのを支援する物質（例えば、リボソーム、タンパク質被覆、等）を含む。

30

【 0 1 3 9 】

特に示されるまたは暗示されることがなければ、用語「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」は、本明細書で使用される場合「少なくとも1つ」を意味する。

40

【 0 1 4 0 】

他に特に説明されなければ、本明細書で使用される専門用語および科学用語はすべて、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解されているのと同じ意味を有する。分子生物学における一般用語の定義は、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)に見ることができる。

50

【0141】

I V . 植物トランス活性化ドメイン由来の相互作用モチーフ

本開示は、新規の植物TADおよびそれ由来のタンパク質 - タンパク質相互作用モチーフ、ならびにそれをコードする核酸を提供する。植物タンパク質であるERF2 (シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*))、PTI4 (ジャガイモ (*Solanum tuberosum*))、AtERF1 (シロイヌナズナ (*A. thaliana*))、ORCA2 (ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*))、DREB1A (シロイヌナズナ (*A. thaliana*))、CBF1 (シロイヌナズナ (*A. thaliana*))、およびDOF1 (トウモロコシ (*Zea mays*))から同定され単離されたTADを使用して、いくつかの実施形態において異種TAD内に「交換 (swap)」されうる植物TAD相互作用モチーフを同定した、またはこれらのTADを使用してバリエーションTAD相互作用モチーフを産生させた。新たに同定された植物TAD、その中の相互作用モチーフ、およびそのバリエーションTADを特定の実施形態において使用すれば (例えば、合成転写活性化因子タンパク質に包含することにより)、対象の遺伝子に新しく望ましい発現調節制御を与えることができる。

10

【0142】

VP16のTAD (V16 TAD) は特徴付けられており、前述の新規植物TADおよび相互作用モチーフの構造領域は、VP16 TADにおける対応する構造との類似性により言及される。VP16 TADは2つのサブドメインに分割することができ、それぞれのサブドメインは、DNA結合ドメインに繋ぎ止められると独立して自律的に転写を活性化することができる。VP16サブドメインは、アミノサブドメイン (または「VP16トランス活性化サブドメインI」または「VP16₄₁₂₋₄₅₆」) およびカルボキシルサブドメイン (または「VP16トランス活性化サブドメインII」または「VP16₄₅₆₋₄₉₀」) と呼ばれることもある。VP16はその相互作用ドメインを通じて、転写因子IIB (TFIIB) のp62 / Tfb1サブユニットを含む、転写に関するいくつかの標的タンパク質と相互作用する。

20

【0143】

VP16の活性は、TAD内の酸性残基だけではなく、疎水性芳香族アミノ酸にも依存している。例えば、Cress and Triezenberg (1991) *Science* 251(4989):87-90を参照されたい。しかし、酸性VP16 TADは、酸性TADにおける規則的二次構造の欠如のせいで、他の多くのポリペプチド配列よりも変異誘発に対して寛容性がありうる (Sigler (1988) *Nature* 333:210-2)。VP16 TADサブドメインの不定形の性質は、TADが様々な結合パートナーとの複数のタンパク質 / タンパク質相互作用を媒介するのに寄与している可能性があり (Dyson and Wright (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12(1):54-60)、TADサブドメインは、溶液中に遊離している場合よりも標的タンパク質に結合している場合のほうがより秩序立った構造 (例えば、短いヘリックス (Langlois et al. (2008)、上記)) をとる可能性がある。例えば、Garza et al. (2009) *Life Sci.* 84(7-8):189-93; Jonker et al. (2005) *Biochemistry* 44(3):827-39; Langlois et al. (2008)、上記を参照されたい。

30

【0144】

いくつかの実施形態には、配列番号10 ~ 16からなる群から選択される植物TAD相互作用モチーフを含む合成転写活性化因子タンパク質が含まれる。いくつかの例示的な合成転写活性化因子タンパク質は、植物TAD相互作用モチーフを含み、そのようなタンパク質は、例えば、限定せずに、配列番号2 ~ 8および配列番号100 ~ 106を含む配列を有しうる。植物TAD相互作用モチーフを含む追加の例示的なTADには、天然のトランス活性化因子TADに含まれる天然のTAD相互作用モチーフ配列を配列番号10 ~ 16のうちの1つで置き換えることにより操作されたTADが含まれる。

40

【0145】

本発明のいくつかの実施形態は、保存的アミノ酸置換および / または相同相互作用モチーフ中の類似する位置に見出されるアミノ酸 (例えば、基準TAD相互作用モチーフを含む天然のタンパク質のオルソログ由来の) での置換を含むバリエーションTAD相互作用モチ

50

ーフは新しい特定の遺伝子調節特性をもたらすという驚くべき発見を巧みに利用する。これらの特定の特性は、一定レベルの発現が望まれるポリヌクレオチドの発現に望ましい可能性がある。例えば、バリエーション T A D 相互作用モチーフは、それ自体が発現を増強する天然の基準 T A D モチーフを超える増強された発現を与えることができ、したがって最大化された発現が目標となることが多いタンパク質合成および精製反応には望ましい可能性がある。他の例では、バリエーション T A D 相互作用モチーフは、最大化よりも少ない発現が望ましい場合には、天然の基準 T A D モチーフよりも少ない発現を提供する。

【 0 1 4 6 】

したがって、いくつかの実施形態には、バリエーション T A D 相互作用モチーフを含む合成転写活性化因子タンパク質が含まれる。いくつかの例では、バリエーション T A D 相互作用モチーフは、配列番号 1 0 ~ 1 6 のうちの 1 つのバリエーションであってもよい。バリエーション T A D 相互作用モチーフは天然の T A D 相互作用配列のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むが、この配列中の 1 つまたは複数のアミノ酸は、異なる相同 T A D における対応する位置に見出されるアミノ酸に変更されている。バリエーション T A D 相互作用モチーフは天然の T A D 相互作用配列のアミノ酸配列を有するポリペプチドも含むが、この配列における 1 つまたは複数のアミノ酸では保存的置換が行われている。バリエーション T A D 相互作用モチーフは、例えば、限定せずに、基準 T A D 相互作用モチーフ配列（例えば、配列番号 1 0 ~ 1 6 から選択される配列）に少なくとも 9 5 % 同一である、基準配列に少なくとも 9 0 % 同一である、基準配列に少なくとも 8 5 % 同一である、基準配列に少なくとも 8 0 % 同一である、基準配列に少なくとも 7 5 % 同一である、基準配列に少なくとも 7 0 % 同一である、基準配列に少なくとも 6 5 % 同一である、基準配列に少なくとも 6 0 % 同一である、基準配列に少なくとも 5 5 % 同一である、基準配列に少なくとも 5 0 % 同一である、または基準配列に 5 0 % 未満で同一であってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 7 】

バリエーション T A D 相互作用モチーフには、例えば、限定せずに、配列番号 1 7 ~ 2 2 （例示的なバリエーション E R F 2 T A D 相互作用モチーフ）、配列番号 2 3 ~ 2 8 （例示的なバリエーション P T I 4 T A D 相互作用モチーフ）、配列番号 2 9 ~ 3 4 （例示的なバリエーション A t E R F 1 T A D 相互作用モチーフ）、配列番号 3 5 ~ 4 0 （例示的なバリエーション O R C A 2 T A D 相互作用モチーフ）、配列番号 4 1 ~ 4 6 （例示的なバリエーション D R E B 1 A T A D 相互作用モチーフ）、配列番号 4 7 ~ 5 2 （例示的なバリエーション C B F 1 T A D 相互作用モチーフ）、および配列番号 5 3 ~ 5 8 （例示的なバリエーション D O F 1 T A D 相互作用モチーフ）が含まれる。バリエーション T A D 相互作用モチーフを含む例示的な T A D には、天然のトランス活性化因子 T A D に含まれる T A D 相互作用モチーフ配列を配列番号 1 7 ~ 5 8 からなる群から選択されるバリエーション T A D で置き換えることにより操作された T A D が含まれる。例えば、バリエーション T A D 相互作用モチーフを含む例示的な T A D には配列番号 1 0 7 ~ 1 2 0 が含まれる。

【 0 1 4 8 】

前述のポリペプチドのいずれでもおよびすべてをコードする核酸は、ポリペプチドのアミノ酸配列から直ちに同定可能である。例えば、T A D または T A D 相互作用モチーフは、転写されて m R N A を生成し続いて T A D または T A D 相互作用モチーフのアミノ酸に翻訳される天然のポリヌクレオチドによりコードされていてもよい。しかし、当業者であれば、遺伝コードの縮重のせいで、同一のポリペプチドをコードする他に多くの等価のポリヌクレオチドが存在することを認識している。バリエーション T A D 相互作用モチーフ（例えば、配列番号 1 7 ~ 5 8 ）は、所望の特定のバリエーションのアミノ酸配列から R N A コドン表を参照して容易に決定可能であるポリヌクレオチドによりコードされていてもよい。特定の実施形態では、T A D 相互作用モチーフ（またはそのバリエーション）をコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、例えば、T A D 相互作用モチーフを含むタンパク質（例えば、融合タンパク質）の発現を最大化または最適化するように、宿主細胞のコドン使用に従って組み立てられるのが望ましいことがある。

【 0 1 4 9 】

V. 融合タンパク質転写活性化因子

本開示は、植物 TAD 相互作用モチーフおよび/またはバリエーション TAD 相互作用モチーフを含む合成転写活性化因子融合タンパク質も提供する。いくつかの実施形態では、合成転写活性化因子融合タンパク質は少なくとも 1 つの DNA 結合ドメインをさらに含む。そのような合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸（例えば、DNA）も提供される。

【0150】

いくつかの実施形態では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、配列特異的な形態で DNA に結合する少なくとも第一のポリペプチド（すなわち、「DNA 結合ドメイン」）を含む。合成転写活性化因子融合タンパク質の第一の DNA 結合ドメインポリペプチドは、植物 TAD 相互作用モチーフまたはバリエーション TAD 相互作用モチーフを含む少なくとも第二のポリペプチドに作動可能に連結されうる。いくつかの例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、融合タンパク質における第一と第二のポリペプチド間に位置するスーパー配列、リーダー配列、融合タンパク質を細胞小器官（例えば、核）に対して標的化するペプチド、細胞酵素により切断されるポリペプチド、ペプチドタグおよび作動可能に連結された第一および第二のポリペプチドの機能に干渉しない他のアミノ酸配列などの、追加のポリペプチドを含みうる。

10

【0151】

いくつかの実施形態では、合成転写活性化因子融合タンパク質の第一および第二のポリペプチドは、融合タンパク質をコードするキメラ遺伝子を作製するために、互いにインプレームでライゲーションされている第一および第二のポリペプチドをコードする単一のポリヌクレオチドからのその発現により作動可能に連結されてもよい。DNA 結合ドメインおよび TAD 相互作用モチーフを含む転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの例には、限定せずに、配列番号 79 ~ 93 が含まれる。別の実施形態では、合成転写活性化因子融合タンパク質の第一および第二のポリペプチドは、独立して発現される第一および第二のポリペプチドの架橋などの他の手段により作動可能に連結されてもよい。

20

【0152】

合成転写活性化因子融合タンパク質内に含まれうる植物 TAD 相互作用モチーフおよびバリエーション TAD 相互作用モチーフには、セクション IV（上記）に記載されている TAD 相互作用モチーフおよびそのバリエーションが含まれる。例えば、合成転写活性化因子融合タンパク質は、配列番号 10 ~ 58 からなる群から選択されるポリペプチドを含んでいてもよい。

30

【0153】

合成転写活性化因子融合タンパク質内に含まれうる DNA 結合ドメインには、ジンクフィンガータンパク質由来のジンクフィンガー DNA 結合ドメイン（例えば、Z6 DNA 結合ドメイン）が含まれる。個々のジンクフィンガー DNA 結合ドメインは広範囲の DNA 部位に対して標的化および結合するように設計することが可能である。例えば、Wu et al. (2007) Cell. Mol. Life Sci. 64:2933-44 を参照されたい。標準 Cys_2His_2 、ならびに非標準 Cys_3His ジンクフィンガータンパク質は、ヘリックスを二重らせんの主溝内に挿入することにより DNA に結合する。ジンクフィンガードメインによる DNA の認識はモジュールであり、それぞれのフィンガーは主に標的中の 3 つの連続する塩基対に接触し、タンパク質中の少数のキーとなる残基が認識を媒介する。合成転写活性化因子融合タンパク質中に複数のジンクフィンガー DNA 結合ドメインを含むことにより、融合タンパク質の DNA 結合特異性はさらに増加しうる（および、したがって、それによって与えられるどんな遺伝子調節効果の特異性も増加しうる）。例えば、Urnov et al. (2005) Nature 435:646-51 を参照されたい。したがって、1 つまたは複数のジンクフィンガー DNA 結合ドメインは、宿主細胞内に導入された合成転写活性化因子融合タンパク質が宿主細胞のゲノム内で独特である DNA 配列と相互作用するように、操作し利用することができる。

40

50

【 0 1 5 4 】

いくつかの例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) におけるモジュラートランス活性化因子である G A L 4 由来の D N A 結合ドメインを含むが、このトランス活性化因子は他の多くの生物におけるトランス活性化因子としても機能する。例えば、Sadowski et al. (1988) *Nature* 335:563-4を参照されたい。この調節系では、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) におけるガラクトース代謝経路の酵素をコードする遺伝子の発現は、利用可能な炭素源により厳密に調節されている (Johnston (1987) *Microbiol. Rev.* 51:458-76)。これらの代謝酵素の転写制御は、正の調節タンパク質である G A L 4 と G A L 4 が特異的に結合する 1 7 b p 対称 D N A 配列 (U A S) の間の相互作用により媒介される。

10

【 0 1 5 5 】

天然の G A L 4 は 8 8 1 アミノ酸残基からなり、分子量は 9 9 k D a である。G A L 4 は機能的に自律したドメインを含み、その複合活性がインピボでの G A L 4 の活性を占める (Ma & Ptashne (1987) *Cell* 48:847-53); Brent & Ptashne (1985) *Cell* 43(3 Pt 2):729-36)。G A L 4 の N 末端 6 5 アミノ酸が G A L 4 D N A 結合ドメインを構成する (Keegan et al. (1986) *Science* 231:699-704; Johnston (1987) *Nature* 328:353-5)。配列特異的結合は、D N A 結合ドメインに存在する 6 個の C y s 残基により配位される 2 価陽イオンの存在を必要とする。配位陽イオン含有ドメインは D N A ヘリックスの主溝との直接接触を介して 1 7 b p U A S のそれぞれの末端で保存された C C G トリプレットと相互作用してこれを認識する (Marmorstein et al. (1992) *Nature* 356:408-14)。タン

20

【 0 1 5 6 】

合成転写活性化因子融合タンパク質に含まれる追加の D N A 結合ドメインには、例えば、限定せずに、A V R B S 3 誘導性遺伝子由来の結合配列、A V R B S 3 誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作される合成結合配列 (例えば、U P A D N A 結合ドメイン; 配列番号 8 9)、T A L、L e x A (例えば、Brent & Ptashne (1985) 上記を参照されたい)、L a c R (例えば、Labow et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-56; Baim et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(12):5072-6を参照されたい)、ステロイドホルモン受容体 (Ei11iston et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:1

30

【 0 1 5 7 】

いくつかの例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、複数の T A D 相互作用モチーフを含む。例えば、限定せずに、合成転写活性化因子融合タンパク質は 2 個、3 個、4 個、またはそれよりも多い T A D 相互作用ドメインを含みうる。いくつかの例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、複数の D N A 結合ドメインを含む。例えば、限定せずに、合成転写活性化因子融合タンパク質は 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個またはそれよりも多い D N A 結合ドメインを含みうる。

40

【 0 1 5 8 】

V I . 融合タンパク質転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子

いくつかの実施形態では、本開示は、植物 T A D 相互作用モチーフ、バリエーション T A D 相互作用モチーフ、植物 T A D、またはバリエーション T A D をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。そのような核酸分子は、D N A 結合ドメインをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列をさらに含みうる。例えば、いくつかの実施形態における核酸は、2 つのポリヌクレオチド配列が単一の融合タンパク質の一部として転写されるように、D N A 結合ドメインをコードする第二のポリヌクレオ

50

チド配列にインフレームで融合されている、植物 T A D 相互作用モチーフ、バリエーション T A D 相互作用モチーフ、植物 T A D、またはバリエーション T A D をコードする第一のポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 1 5 9 】

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、植物 T A D 相互作用モチーフ、バリエーション T A D 相互作用モチーフ、植物 T A D、またはバリエーション T A D をコードする第一のポリヌクレオチド配列の最後のコドンと、D N A 結合ドメインをコードする第二のポリヌクレオチド配列の最初のコドンは、例えば、イントロンまたは「 S T O P 」をコードすることなくいかなる数のヌクレオチドトリプレットで分離されていてもよい。同様に、D N A 結合ドメインをコードする第一のポリヌクレオチド配列をコードするヌクレオチド配列の最後のコドンと植物 T A D 相互作用モチーフ、バリエーション T A D 相互作用モチーフ、植物 T A D、またはバリエーション T A D をコードする第二のポリヌクレオチド配列の最初のコドンは、いかなる数のヌクレオチドトリプレットで分離されていてもよい。これらのおよび追加の実施形態では、植物 T A D 相互作用モチーフ、バリエーション T A D 相互作用モチーフ、植物 T A D、またはバリエーション T A D をコードする第一のポリヌクレオチド配列の最後（すなわち、核酸配列のもっとも 3 ' 側）の最後のコドンと D N A 結合ドメインをコードする第二のポリヌクレオチド配列は、それに直に連続する追加のポリヌクレオチドコード配列の最初のコドンとフェイズレジスター（phase-register）で融合されていてもよく、または合成ヌクレオチドリンカー（例えば、融合を実現するのに使用されていた可能性のあるヌクレオチドリンカー）によりコードされる配列などの短いペプチド配列だけによりそれから分離されていてもよい。そのような追加のポリヌクレオチド配列の例には、例えば、限定せずに、タグ、標的ペプチド、および酵素的切断部位が含まれる。同様に、第一および第二のポリヌクレオチド配列のもっとも 5 ' 側（核酸配列において）の最初のコドンは、それに直に連続する追加のポリヌクレオチドコード配列の最後のコドンとフェイズレジスターで融合されていてもよく、または短いペプチド配列だけによりそれから分離されていてもよい。

10

20

【 0 1 6 0 】

植物 T A D 相互作用モチーフ、バリエーション T A D 相互作用モチーフ、植物 T A D、またはバリエーション T A D をコードするポリヌクレオチド配列と D N A 結合ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を分離する配列は、例えば、コードされているアミノ酸配列が融合タンパク質の翻訳を著しく変更しそうなでないような、いかなる配列からなってもよい。本明細書に開示される T A D 相互作用ドメイン（およびそのバリエーション）と既知の D N A 結合ドメインの自律的性質のために、介在配列はこれらの構造体のそれぞれの機能に例において干渉することはない。

30

【 0 1 6 1 】

本発明のいくつかの実施形態は、植物 T A D 相互作用モチーフ、バリエーション T A D 相互作用モチーフ、植物 T A D、またはバリエーション T A D をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、D N A 結合ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を含まない核酸分子も含む。そのような核酸分子は、例えば、分子生物学技法において T A D 相互作用モチーフコード配列の取り扱いを容易にするのに有用である可能性がある。例えば、いくつかの実施形態では、T A D 相互作用モチーフコード配列は、この配列を発現ベクター内にサブクローニングするのに適したベクターに導入しうる、または T A D 相互作用モチーフコード配列は、対象のヌクレオチド配列に作動可能に連結された T A D 相互作用モチーフコード配列を含む追加の核酸分子の産生を促進する核酸分子内に導入しうる。

40

【 0 1 6 2 】

例えば、少なくとも 1 つの特定の植物 T A D 相互作用モチーフ、バリエーション T A D 相互作用モチーフ、植物 T A D、またはバリエーション T A D を含み、少なくとも 1 つの特定の D N A 結合ドメインをさらに含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列はすべて当業者であれば直ちに認識するであろう。遺伝コードの縮重は特定のアミノ酸配列に有限数のコード配列を提供する。本発明の実施形態に従って融合タンパク質をコードする特定の

50

配列の選択は、実践者の裁量の範囲内である。コード配列が異なれば適用も異なるのが望ましいこともある。

【0163】

いくつかの実施形態では、例えば、特定の宿主におけるポリヌクレオチド配列の発現を増強するために、植物TAD相互作用モチーフ、バリエーションTAD相互作用モチーフ、植物TAD、またはバリエーションTADをコードするポリヌクレオチド配列のヌクレオチド（および/またはDNA結合ドメインコード配列のヌクレオチド）を改変するのが望ましいことがある。遺伝コードは64の可能なコドンがあって重複しているが、大半の生物はこれらのコドンのサブセットを優先的に使用している。種においてもっとも頻りに利用されるコドンは最適コドンと呼ばれ、それほど頻りに利用されないコドンは希少または低使用コドンに分類される（Zhang et al. (1991) Gene 105:61-72）。コドンは、「コドン最適化」と呼ばれることもあるプロセスにおける特定の宿主の好ましいコドン使用を反映するように置換しうる。特定の原核生物または真核生物宿主により好まれるコドンを含む最適化されたコード配列は、例えば、翻訳速度を高めるようにまたは望ましい特性（例えば、非最適化配列から産生される転写物と比べて長い半減期）を有する組換えRNA転写物を産生するように調製しうる。

10

【0164】

VII. 融合タンパク質転写活性化因子の発現

いくつかの実施形態では、植物TAD相互作用モチーフ（または、バリエーションTAD相互作用モチーフ、植物TAD、もしくはバリエーションTAD）をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列、およびDNA結合ドメインをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの融合タンパク質コード核酸分子（複数可）は、そこでの融合タンパク質の発現のために細胞、組織、または生物内に導入しうる。

20

【0165】

いくつかの実施形態では、そのような核酸分子は、例えば、例えば、限定せずに、線形プラスミドおよび閉鎖環状プラスミドを含むベクター系でありうる。特定の例では、ベクターは発現ベクターであってもよい。特定の実施形態に従った核酸配列は、例えば、この核酸配列が1つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されるように、ベクター内に挿入することができる。多く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、ベクター内に挿入される核酸のサイズ、ベクターで形質転換される特定の宿主細胞、および/または発現されるのが望ましい融合タンパク質の量に依存することがある。ベクターは典型的には、様々な構成成分を含むし、その素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特定の宿主細胞（複数可）に依存する。

30

【0166】

いくつかの実施形態は、少なくとも1つのDNA結合ドメインに作動可能に連結された、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ、バリエーションTAD相互作用モチーフ、植物TAD、またはバリエーションTADを含む融合タンパク質をコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列（複数可）に作動可能に連結された少なくとも1つの調節配列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うる。この1つまたは複数のヌクレオチド配列（複数可）は、融合タンパク質を産生する植物細胞、組織、または生物において調節配列（複数可）の制御下で、発現されうる。

40

【0167】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのDNA結合ドメインに作動可能に連結された、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ、バリエーションTAD相互作用モチーフ、植物TAD、またはバリエーションTADを含む融合タンパク質をコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列（複数可）に作動可能に連結された調節配列は、核酸分子が増幅されることになる細菌細胞、または核酸分子が発現されることにな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もよい。

【0168】

50

いくつかの実施形態に従った核酸分子において使用するのに適したプロモーターには、誘導性、ウイルス、合成、または構成的であるプロモーターが含まれ、そのすべてが当技術分野では周知である。本発明の実施形態において有用でありうるプロモーターの非限定的例は、米国特許第 6, 437, 217 号 (トウモロコシ RS 8 1 プロモーター)、米国特許第 5, 641, 876 号 (イネアクチンプロモーター)、米国特許第 6, 426, 446 号 (トウモロコシ RS 3 2 4 プロモーター)、米国特許第 6, 429, 362 号 (トウモロコシ PR - 1 プロモーター)、米国特許第 6, 232, 526 号 (トウモロコシ A 3 プロモーター)、米国特許第 6, 177, 611 号 (構成的トウモロコシプロモーター) ; 米国特許第 5, 322, 938 号、米国特許第 5, 352, 605 号、米国特許第 5, 359, 142 号、および米国特許第 5, 530, 196 号 (3 5 S プロモーター) ; 米国特許第 6, 433, 252 号 (トウモロコシ L 3 オレオシンプロモーター)、米国特許第 6, 429, 357 号 (イネアクチン 2 プロモーター、およびイネアクチン 2 イントロン)、米国特許第 6, 294, 714 号 (光誘導性プロモーター)、米国特許第 6, 140, 078 号 (塩誘導性プロモーター)、米国特許第 6, 252, 138 号 (病原体誘導性プロモーター)、米国特許第 6, 175, 060 号 (垂リン酸欠乏誘導性プロモーター)、米国特許第 6, 388, 170 号 (二方向性プロモーター)、米国特許第 6, 635, 806 号 (ガンマコイキシン (coixin) プロモーター)、ならびに米国特許出願第 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) により提供される。

10

【0169】

20

追加の例示的なプロモーターには、ノパリンシンターゼ (NOS) プロモーター (Eber t 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・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) の腫瘍誘発プラスミド上に担持されている)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 19 S 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 3 5 S 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 3 5 S 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)、クロロフィル a / b 結合タンパク質遺伝子プロモーター、CaMV 3 5 S (米国特許第 5, 322, 938 号、米国特許第 5, 352, 605 号、米国特許第 5, 359, 142 号、および米国特許第 5, 530, 196 号)、FMV 3 5 S (米国特許第 6, 051, 753 号、および米国特許第 5, 378, 619 号)、PC 1 S V プロモーター (米国特許第 5, 850, 019 号)、SCP 1 プロモーター (米国特許第 6, 677, 503 号)、および AGR tu . 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) が含まれる。

30

【0170】

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うる。組織特異的プロモーターは、生物のその他の組織と比べて、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されたヌクレオチド配列のより高い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には限定せずに、タベータム特異的プロモーター、薬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 出願第 WO 99 / 042587 号を参照されたい)、胚珠特異的プロモーター (例えば、米国特許出願第 2001 / 047525 A 1 号を参照されたい)、果実特異的プロモーター (例えば、米国特許第 4, 943, 674 号および米国特許第 5, 753, 475 号を参照されたい)、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 号および米国特許第 5, 608, 152 号を参照されたい) が含まれる。いくつかの実施形態では、発生段階特異的プロモーター (例えば

40

50

、発生の後期段階で活性なプロモーター)は、本発明の組成物または方法において使用しうる。

【0171】

いくつかの実施形態で核酸分子に作動可能に連結されうる追加の調節配列には、プロモーター配列と翻訳リーダー配列として機能するコード配列の間に位置する5'UTRが含まれる。翻訳リーダー配列は完全にプロセシングされたmRNAに存在し、一次転写物のプロセシングおよび/またはRNA安定性に影響しうる。翻訳リーダー配列の例には、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、植物ルビスコリーダー、ならびにその他が含まれる(例えば、Turner and Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36を参照されたい)。5'UTRの非限定的例は、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AGRTunos(GenBank受託番号V00087;およびBevan et al. (1983)、上記)により提供される。

10

【0172】

いくつかの実施形態で核酸分子に作動可能に連結されうる追加の調節配列には、3'非翻訳配列、3'転写終止領域、またはポリアデニル化領域も含まれる。これらの配列はヌクレオチド配列の下流に位置する遺伝要素であり、ポリアデニル化シグナル、および/または転写もしくはmRNAプロセシングに影響することができる他の調節シグナルを与えるポリヌクレオチドが含まれる。ポリアデニル化シグナルはmRNA前駆体の3'末端へのポリアデニル酸ヌクレオチドの付加を引き起こすように植物において機能する。ポリアデニル化配列は、種々の植物遺伝子に、またはT-DNA遺伝子に由来することが可能である。3'転写終止領域の非限定的例はノバリンシンターゼ3'領域である(nos 3'; Fraley et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7)。様々な3'非翻訳領域の使用の例は、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非限定的例には、エンドウ(*Pisum sativum*) RbcS2遺伝子(Ps.RbcS2-E9; Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-9)およびAGRTunos(GenBank受託番号E01312)由来のシグナルが含まれる。

20

【0173】

特定の実施形態において有用でありうる調節配列に関する追加の情報は、例えば、Goedel (1990) "Gene Expression Technology," *Methods Enzymol.* 185, Academic Press, San Diego, CAに記載されている。

30

【0174】

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与える選択可能マーカールを含む。選択可能マーカールを使用して、本発明の核酸分子を含む植物または植物細胞を選択することもできる。マーカールは、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、およびハイグロマイシン)、または除草剤抵抗性(例えば、グリホサート)をコードしうる。選択可能マーカールの例には、カナマイシン抵抗性を与え、例えば、カナマイシンおよびG418を使用して選択することができるneo遺伝子、ピアラホス抵抗性を与えるbar遺伝子、グリホサート抵抗性を与える変異EPSPシンターゼ遺伝子、プロモキシニルに対する抵抗性を与えるニトリラーゼ遺伝子、イミダゾリノンまたはスルホニル尿素抵抗性を与える変異アセト乳酸シンターゼ遺伝子(ALS)、およびメトトレキサート抵抗性DHFR遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。例えば、限定せずに、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を含む化学薬剤に対する抵抗性を与える複数の選択可能マーカールが利用可能である。そのような選択可能マーカールの例は、例えば、米国特許第5,550,318号、

40

50

米国特許第 5, 633, 435 号、米国特許第 5, 780, 708 号、および米国特許第 6, 118, 047 号に説明されている。

【0175】

本発明の核酸分子またはベクターは、スクリーニング可能マーカ―もまたは代わりに含む。スクリーニング可能マーカ―を使用すれば発現をモニターすることができる。例示的なスクリーニング可能マーカ―には、様々な発色基質が知られている酵素をコードするグルクロニダーゼまたは *uidA* 遺伝子 (GUS) (Jefferson et al. (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405)、植物組織においてアントシアニン色素 (赤色) の生成を調節する産物をコードする *R-lous* 遺伝子 (Dellaporta et 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., Plenum, NY (pp. 263-82))、ラクタマーゼ遺伝子 (Sutcliffe et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-41)、様々な発色基質が知られている酵素をコードする遺伝子 (例えば、PADAC、発色セファロsporin)、ルシフェラーゼ遺伝子 (Ow et al. (1986) *Science* 234:856-9)、発色カテコールを転換するカテコールジオキシゲナーゼをコードする *xy1E* 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 およびドパキノンにまで酸化し、次にメラニンに凝縮することができ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)、およびガラクトシダーゼが含まれる。

10

20

【0176】

宿主細胞の形質転換に適した方法には、例えば、限定せずに、プロトプラストの形質転換による (例えば、米国特許第 5, 508, 184 号を参照されたい)、乾燥/阻害媒介 DNA 取込み (例えば、Potrykus et al. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8 を参照されたい)、エレクトロポレーションによる (例えば、米国特許第 5, 384, 253 号を参照されたい)、炭化珪素繊維を用いた攪拌による (例えば、米国特許第 5, 302, 523 号および米国特許第 5, 464, 765 号を参照されたい)、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換 (例えば、米国特許第 5, 563, 055 号、米国特許第 5, 591, 616 号、米国特許第 5, 693, 512 号、米国特許第 5, 824, 877 号、米国特許第 5, 981, 840 号、および米国特許第 6, 384, 301 号を参照されたい) および DNA 被覆粒子の加速により (例えば、米国特許第 5, 015, 580 号、米国特許第 5, 550, 318 号、米国特許第 5, 538, 880 号、米国特許第 6, 160, 208 号、米国特許第 6, 399, 861 号、および米国特許第 6, 403, 865 号を参照されたい) DNA を細胞内に導入することができるいかなる方法でも含まれる。これらの技法などの技法の適用を通じて、実質的にいかなる種の細胞も安定的に形質転換することができる。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内に組み込まれる。多細胞種の場合は、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することができる。これらの技法のうちどれでも使用して、例えば、トランスジェニック植物のゲノムに本発明の 1 つ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産することができる。

30

40

【0177】

植物中に発現ベクターを導入するためのもっとも広く利用されている方法は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) の天然の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*) のそれぞれの Ti および Ri プラスミドは、植物の遺伝的形質転換の原因となる遺伝子を担持している。Ti (腫瘍誘発性) プラスミドは T-DNA として知られる大きなセグメントを含有しており、このセグメントは形質転換された植物に移される。Ti プラスミドの別のセグメントである vir 領域は T-DNA 移入の原因である。T-DNA 領域は、それぞれが末端反復ヌクレオチド配列で構成

50

されている左側および右側ボーダーにより境を接している。いくつかの改変されたバイナリーベクターでは、腫瘍誘発性遺伝子は除去されており、*vir*領域の機能は、T-DNAボーダー配列により境を接している外来DNAを移すのに利用される。T領域は、例えば、トランスジェニック植物および細胞の効率的回収のための選択可能マーカー、ならびに本発明の融合タンパク質をコードする核酸などの移入のための挿入配列の複数のクローニング部位を含有していてもよい。

【0178】

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. ツメファシエンズ (*A. tumefaciens*) のTiプラスミド (例えば、米国特許第4,536,475号、米国特許第4,693,977号、米国特許第4,886,937号、および米国特許第5,501,967号、ならびに欧州特許EP 0 122 791を参照されたい) またはA. リゾゲネス (*A. rhizogenes*) のRiプラスミドに由来する。追加の植物形質転換ベクターには、例えば、限定せずに、Herrera-Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209-13; Bevan et al. (1983)、上記; Klee et al. (1985) *Bio/Technol.* 3:637-42; および欧州特許EP 0 120 516に記載されるベクターならびに前述のいずれかに由来するベクターが含まれる。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*) などの他の細菌は、多数の種々の植物への遺伝子移入を媒介するように改変することが可能である。これらの植物関連共生細菌は、武装解除されたTiプラスミドと適切なバイナリーベクターの両方を獲得することにより遺伝子移入にコンピテントになることができる。

10

20

【0179】

レシピエント細胞に外来性DNAを与えたのち、形質転換された細胞は一般的にさらなる培養および植物再生のために同定される。形質転換された細胞を同定する能力を改善するために、形質転換体を作製するのに使用されるベクターと一緒に、前述のように、選択可能またはスクリーニング可能マーカー遺伝子を用いることを望んでもよい。選択可能マーカーを使用する場合には、形質転換された細胞は、この細胞を選択的薬剤 (1種または複数) に曝露することにより潜在的に形質転換された細胞集団内で同定される。スクリーニング可能マーカーを使用する場合には、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することができる。

【0180】

選択的薬剤への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正にスコア化された細胞は、植物の再生を支持する培地において培養されうる。いくつかの実施形態では、任意の適切な植物組織培養培地 (例えば、MSおよびN6培地) は、成長調節物質などの物質をさらに含むことにより改変してもよい。組織は、植物再生取組みを開始するのに十分な組織が入手可能になるまで、または手動選択の繰り返しラウンドに続いて、この組織の形態が再生に適するようになるまで (例えば、少なくとも2週間)、成長調節物質を有する基本培地上で維持され、次に苗条形成の助けとなる培地に移されてもよい。培養物は、十分な苗条形成が起こるまで定期的に移される。苗条が形成されると、根形成の助けとなる培地に移される。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のために土壌に移すことができる。

30

40

【0181】

再生中の植物における対象の核酸分子 (例えば、本発明の少なくとも1つの融合タンパク質を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列) の存在を確かめるため、種々のアッセイを実施しうる。そのようなアッセイには、例えば、サザンおよびノーザンブロットティング、PCR、および核酸塩基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 (ELISAおよび/またはウェスタンブロット) によりまたは酵素機能により、タンパク質産物の存在を検出するなどの生化学的アッセイ; 葉または根アッセイなどの植物部分アッセイ; ならびに再生植物体全体の表現型の解析が含まれる。

【0182】

組込みイベントは、例えば、対象のヌクレオチド配列に特異的であるオリゴヌクレオチ

50

ドプライマーを使用する、例えば、PCR増幅により分析することができる。PCR遺伝子型判定は、ゲノム内に組み込まれた対象の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由来のゲノムDNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、続いてPCR増幅産物の標準クローニングおよび配列解析が含まれるがこれらに限定されないと理解されている。PCR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を参照されたい)、細胞培養物を含む、任意の植物種または組織型に由来するゲノムDNAに適用してもよい。

【0183】

アグロバクテリウム(Agrobacterium)依存性形質転換法を使用して形成されるトランスジェニック植物は典型的には、1つの染色体に挿入された単一組換えDNA配列を含有する。単一組換えDNA配列は「トランスジェニックイベント」または「組込みイベント」と呼ばれる。そのようなトランスジェニック植物は挿入されたDNA配列に対し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であるトランスジェニック植物は、単一外来性遺伝子配列を含有する独立した分離個体トランスジェニック植物、例えば、F₀植物をそれ自体と性的に交配させて(自家受粉)F₁種子を生産することにより得られる。生産されたF₁種子の4分の1は、導入遺伝子に関してホモ接合性になる。F₁種子が出芽すれば、典型的には、ヘテロ接合体とホモ接合体の区別を可能にするSNPアッセイまたは熱増幅アッセイ(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することが可能である植物をもたらす。

10

【0184】

特定の実施形態では、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ(および/またはバリエーションTAD相互作用モチーフ)および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む少なくとも1つの合成転写活性化因子融合タンパク質のコピーは、少なくとも1つの合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子(複数可)が導入されている細胞において産生される。それぞれの合成転写活性化因子融合タンパク質は、様々な形質転換イベント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イベントにおいて導入された単一の核酸配列から発現されうる。いくつかの実施形態では、複数のそのような融合タンパク質は単一のプロモーターの制御下で発現されうる。他の実施形態では、複数のそのような融合タンパク質は複数のプロモーターの制御下で発現されうる。

20

30

【0185】

本発明の核酸分子での植物または植物細胞の直接的形質転換に加えて、トランスジェニック植物は、少なくとも1つのトランスジェニックイベントを有する第一の植物とそのようなイベントを欠く第二の植物を交雑させることによりいくつかの実施形態で調製しうる。例えば、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ(および/またはバリエーションTAD相互作用モチーフ)および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を、形質転換を受け入れられる第一の植物系統内に導入してトランスジェニック植物を生産することができ、そのトランスジェニック植物を第二の植物系統と交雑させて、合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を第二の植物系統に移入させることができる。

40

【0186】

VIII. 融合タンパク質転写活性化因子を含む植物材料

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ(および/またはバリエーションTAD相互作用モチーフ)および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質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、そのような植物は、植物組織または植物細胞の形質転換、および植物体全体の再生により生産することができる。追加の実施形態では、そのような植物は、合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を生殖質内に移入することを通じて得られる。そのような植物細胞を含む植物材料も提供される。そのような植物材料はこの植物細胞を含む植物から得られる。

50

【0187】

少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ（および/またはバリエーションTAD相互作用モチーフ）および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質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または植物材料は以下の特徴、植物の細胞における融合タンパク質の発現、植物の細胞の色素体における融合タンパク質の発現、植物の細胞の核における融合タンパク質の発現、植物の細胞における融合タンパク質の局在化、植物の細胞のゲノムにおけるヌクレオチド配列の組み込み、植物の細胞の染色体外DNAにおけるこのヌクレオチド配列の存在、および/または植物の細胞におけるこのヌクレオチド配列に対応するRNA転写物の存在のうちの1つまたは複数をいくつかの実施形態において示しうる。そのような植物は、コードされた融合タンパク質の発現以外の1つまたは複数の望ましい形質をさらに有しうる。そのような形質には、その発現が植物の細胞における融合タンパク質により調節される、内在性またはトランスジェニックヌクレオチド配列の発現から生じる形質、例えば、限定せずに、昆虫、他の有害生物、および病原体に対する抵抗性；除草剤に対する耐性；増強された安定性、収率、または貯蔵寿命；環境耐性；医薬品製造；工業製品製造；ならびに栄養強化が含まれる。

10

【0188】

本発明に従ったトランスジェニック植物は、本発明の核酸分子で形質転換することができるいかなる植物でもよい。したがって、植物は双子葉植物でも単子葉植物でもよい。本方法において使用可能な双子葉植物の非限定的例には、シロイヌナズナ（*Arabidopsis*）、アルファルファ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、キャノーラ、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、ハウレンソウ、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、およびスイカが含まれる。本方法において使用可能な単子葉植物の非限定的例には、トウモロコシ、タマネギ、イネ、モロコシ、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、およびシバクサが含まれる。本発明に従ったトランスジェニック植物はいかなる形態で使用してもまたは栽培してもよい。

20

【0189】

いくつかの実施形態は、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ（および/またはバリエーションTAD相互作用モチーフ）および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする1つ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つまたは複数のそ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生産される商品生産物も提供する。少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ（および/またはバリエーションTAD相互作用モチーフ）および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列を含有する商品生産物には、例えば、限定せずに、食品生産物、粗挽き粉、油、または粉砕もしくは全粒粉またはそのような合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする1つもしくは複数のヌクレオチド配列を含む植物の種子が含まれる。1つまたは複数の商品または商品生産物における本発明の合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列が検出されたら、この商品または商品生産物が、本発明の合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする1つ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一部は生産された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つの植物TAD相互作用モチーフ（および/またはバリエーションTAD相互作用モチーフ）および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質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、そ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入手し、それから食物または餌を調製することにより生産しうる。

30

40

【0190】

いくつかの実施形態では、本発明の合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする又

50

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または種子は、RNA i 分子に転写されるトランスジェニックイベント、殺虫タンパク質（例えば、バチルス・チューリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）殺虫タンパク質）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与える遺伝子）、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、増加した収量、変化した脂肪酸代謝、または細胞質雄性不稔の回復）に寄与する遺伝子を限定せずに含む、そのゲノムにおける少なくとも1つの他のトランスジェニックイベントも含みうる。

【0191】

いくつかの実施形態では、本発明の合成転写活性化因子融合タンパク質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または種子は、変化した脂肪酸代謝形質に対する内在性遺伝子標的、乾燥耐性形質に対する内在性遺伝子標的、窒素利用効率形質に対する内在性遺伝子標的、またはトランスジェニック植物における望ましい表現型（例えば、増加した収量、または細胞質雄性不稔の回復）に寄与する他の任意の内在性遺伝子標的を限定せずに含む、トランスジェニック植物のゲノム内に内在性または天然の遺伝子標的を含んでいてもよい。内在性または天然の遺伝子標的は、合成転写活性化因子融合タンパク質が特異的に結合し、それによって標的遺伝子の転写に影響するヌクレオチド配列に作動可能に連結されうる。

10

【0192】

IX. 融合タンパク質転写活性化因子による発現の調節

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ（および/またはバリエーションTAD相互作用モチーフ）および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質を使用して、細胞において対象のヌクレオチド配列（例えば、対象の遺伝子）の発現を増加させる（例えば、開始する）ことができる。対象のヌクレオチド配列は、細胞のゲノムにとっていくつかの実施形態では内在性でありうる。他の実施形態では、対象のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの外来性核酸分子（複数可）が細胞内に導入されている。一般的には、対象のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている第二のヌクレオチド配列は、第二のヌクレオチド配列と融合タンパク質の間の安定で特異的な結合が起こるように、融合タンパク質のDNA結合ドメインにより認識されることになる。いくつかの例では、対象のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子（複数可）はそのような第二のヌクレオチド配列をさらに含む。いくつかの例では、対象のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子（複数可）は、対象のヌクレオチド配列が宿主細胞にとって内在性である第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されるように、宿主細胞に導入される。例えば、対象のヌクレオチド配列を含む核酸分子は、対象のヌクレオチド配列がDNA結合ドメインにより認識される内在性配列に作動可能に連結されるように、対象のヌクレオチド配列を宿主細胞のゲノム内に挿入する相同組換えを促進しうる。いくつかの例では、対象のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子（複数可）は、対象のヌクレオチド配列が宿主細胞にとって内在性である第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されるように、宿主細胞内では内在性であるまたは天然である。

20

30

【0193】

様々な形質転換イベントにおいて導入される対象の複数のヌクレオチド配列（複数可）は、いくつかの例において単一の融合タンパク質の調節制御下で発現させることができる。他の例では、対象の単一のヌクレオチド配列（例えば、単一の組込みイベント）が調節され発現される。いくつかの実施形態では、対象の複数のヌクレオチド配列が、単一の核酸結合部位への本発明の融合タンパク質の結合により調節されうる、例えば、対象の複数のヌクレオチド配列がすべて、融合タンパク質のDNA結合ドメインが特異的に結合する同じ第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されうる。そのような複数を含む対象のヌクレオチド配列はある種の例では必ずしも同じではない。したがって、複数の異なる遺伝子産物は単一の融合タンパク質の調節制御下で発現されうる。

40

【0194】

50

特定の実施形態では、本発明の融合タンパク質の調節制御下にある対象のヌクレオチド配列の発現産物はマーカー遺伝子産物、例えば、限定せずに、蛍光分子でありうる。そのような発現産物の発現に関する定量的および定性的観測により、特定のTAD相互作用モチーフまたはTAD相互作用モチーフパリアントの特定の調節特性を評価するシステムが提供されうる。

【0195】

発現産物（例えば、タンパク質、前駆体タンパク質、および阻害性RNA分子）は、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ（および/またはパリアントTAD相互作用モチーフ）および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下で発現されうる。特定の例では、合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下での発現産物は、限定せずに、この融合タンパク質をコードする核酸が導入されている宿主細胞において正常に発現される内在性または天然のポリペプチドであってもよい。他の例では、合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下での発現産物は、宿主細胞において正常には発現されない異種ポリペプチドであってもよい。例えば、限定せずに、合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下での発現産物は、除草剤抵抗性、ウイルス抵抗性、病原菌抵抗性、昆虫抵抗性、線虫抵抗性、または真菌抵抗性に関与するポリペプチドであってもよい。例えば、米国特許第5,569,823号、米国特許第5,304,730号、米国特許第5,495,071号、米国特許第6,329,504号、および米国特許第6,337,431号を参照されたい。合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下での発現産物は、代わりに、例えば、限定せずに、草勢もしくは収量に関与するポリペプチド（極端な温度、土壌状態、光レベル、水位、および化学的環境に対する耐性に関与するポリペプチドを含む）、または対象の形質を含む植物を同定するためのマーカーとして使用しうるポリペプチド（例えば、選択可能マーカー遺伝子産物、および種子色に関与するポリペプチド）であってもよい。

10

20

【0196】

本発明のいくつかの実施形態において、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ（および/またはパリアントTAD相互作用モチーフ）および少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下にある可能性のあるポリペプチドの非限定的例には、アセト乳酸シンターゼ（ALS）、変異ALS、およびALSの前駆体（例えば、米国特許第5,013,659号を参照されたい）；CP4 EPSPSまたはクラスII EPSPSなどのEPSPS（例えば、米国特許第4,971,908号および米国特許第6,225,114号を参照されたい）；例えば、限定せずに、光合成、ならびに脂肪酸、アミノ酸、油、アロテノイド（arotenoid）、テルペノイド、およびデンプンの合成を含む、色素体において起こる生理的過程を改変する酵素が含まれる。特定の実施形態において合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下にある可能性のあるポリペプチドの他の非限定的例には、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脂肪酸デサチュラーゼ、グルタミンシンセターゼ、デンプン修飾酵素、必須アミノ酸の合成に関与するポリペプチド、プロビタミンA、ホルモン、Bt毒素、およびタンパク質が含まれる。前述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は入手可能であり、そのようなヌクレオチド配列は、少なくとも1つの植物TAD相互作用モチーフ（および/またはパリアントTAD相互作用モチーフ）および作動可能に連結された部位に特異的に結合する少なくとも1つのDNA結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下で発現されるDNA結合ドメインの特異的結合部位に作動可能に連結されうる。

30

40

【0197】

さらに、調節制御下に置かれている前述のポリペプチドのいずれかをコードする対象のパリアントヌクレオチド配列は、当業者により同定されうる（例えば、特定のポリペプチドをコードする他の遺伝子と高い相同性を有する遺伝子をクローニングすることにより、またはDNAコドン縮重を考慮してインシリコ配列生成により）。例えば、宿主生物の好ましいコドン使用に一致するそのようなパリアントは特定の実施形態では望ましいことが

50

ある。対象のそのようなバリエーションヌクレオチド配列が同定されると、本発明に従った合成転写活性化因子ポリペプチドにより配列の調節制御を与える核酸分子は、例えば、核酸分子中の対象のバリエーションヌクレオチド配列を、使用される特定の合成転写活性化因子融合タンパク質内に含まれるDNA結合ドメインの既知の結合部位に作動可能に連結することにより、設計することができる。本明細書に記載される実施形態では、この核酸分子と本明細書に記載される特定の合成転写活性化因子融合タンパク質の1つが宿主細胞内に同時に存在する場合は、対象のそのようなバリエーションヌクレオチド配列の発現の驚くべき増加を観察しうる（例えば、宿主植物細胞において）。

【0198】

本明細書で考察される参考文献は、本出願の提出日に先立つその開示のためだけに提供される。本発明者らが先行発明を理由にそのような開示に先行する資格がないことを認めたと解釈されるものは本明細書にはなにもない。

【0199】

以下の実施例はある種の特長および/または実施形態を説明するために提供される。実施例は、例示される特定の特長または実施形態に本開示を限定するものと解釈されるべきではない。

(実施例)

【実施例1】

【0200】

植物トランス活性化相互作用モチーフの同定

7つのタンパク質、PTI4 (GenBank受託番号ACF57857.1)、ERF2 (GenBank受託番号NP_199533.1)、AtERF1 (GenBank受託番号NP_567530.4)、ORCA2 (GenBank受託番号CAB93940.1)、DREB1A (GenBank受託番号NP_567720.1)、CBF1 (GenBank受託番号NP_567721.1)、およびDOF1 (GenBank受託番号NP_001105709.1)がVP16トランス活性化ドメイン(配列番号1)に相同であると同定された。VP16トランス活性化ドメイン(配列番号1)のアミノ酸配列は、これらの推定植物転写活性化因子の領域と配列類似性を共有しており、VP16配列を使用してそれぞれの活性化因子内でトランス活性化ドメインを位置付けた。これらの植物活性化因子タンパク質の同定されたトランス活性化ドメインは、配列番号2 (PTI4)、配列番号3 (ERF2)、配列番号4 (AtERF1)、配列番号5 (ORCA2)、配列番号6 (DREB1A)、配列番号7 (CBF1)、および配列番号8 (DOF1)である。次に、VP16トランス活性化サブドメインIIの相互作用モチーフ(図1、配列番号9)を使用して、植物トランス活性化ドメインから相互作用モチーフを位置付けた。図2は、VP16と植物トランス活性化ドメインのアライメントを示しており、新規の相互作用モチーフは反転されている。

【実施例2】

【0201】

植物トランス活性化ドメインの同定された相互作用モチーフの改変

同定された植物トランス活性化ドメインの相互作用モチーフが改変された。VP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIの相互作用モチーフのアミノ酸接触残基を含有する相互作用モチーフの新しいバリエーションが産生された(Langlois et al. (2008) J. Am. Chem. Soc. 130:10596)。VP16トランス活性化ドメインの6つのアミノ酸接触残基は、転写因子TFIIHのサブユニットであるTfb1と直接相互作用すると提唱されている(図1)。アミノ酸は新たに同定された植物トランス活性化ドメインの相互作用モチーフ内に導入されて、バリエーション配列を生成した。

【0202】

サブドメインIIのVP16相互作用モチーフから同定された6アミノ酸接触残基を含有する相互作用モチーフを改変すれば、さらに多種多様な転写因子と相互作用して、それによりさらに高いレベルのタンパク質発現をもたらすことができる植物活性化因子の改変

された相互作用モチーフが生成されると我々は仮定した。

【0203】

ERF2 改変

VP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIに対してアライメントされたERF2中のAsn53からAla85までの領域(図2)は、ERF2の植物トランス活性化ドメイン配列として同定された。VP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIの相互作用モチーフに一致することが分かった領域、すなわち、Asp66からAsp76に改変が導入された。VP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIの相互作用モチーフの6接触残基とは異なるアミノ酸残基が改変された。これらの変更によりVP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIの相互作用モチーフに類似するERF2の例示的な改変相互作用モチーフ(すなわち、バリエーション相互作用モチーフ配列)が生じた(図3)。

10

【0204】

PTI4、AtERF1、ORCA2、DREB1A、CBF1、およびDOF1相互作用モチーフの改変

ERF2に導入された相互作用モチーフに類似するPTI4、AtERF1、ORCA2、DREB1A、CBF1、およびDOF1相互作用モチーフに改変が導入された。VP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIの相互作用モチーフの6直接接触残基とは異なる天然の配列のアミノ酸残基が改変され、それにより例示的なバリエーション相互作用モチーフが生成した。これらの変化が導入され、植物バリエーション相互作用モチーフはVP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIの相互作用モチーフに類似する(例えば、機能的に類似する)ものになった。VP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIの天然の相互作用モチーフ配列と比べた場合、これらのバリエーションまたは改変相互作用モチーフの例示的な配列は図4~9に記載されている。

20

【実施例3】

【0205】

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)レポーター株における植物活性化ドメインの相互作用モチーフを試験する

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)レポーター株

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)レポーター株を産生して、天然またはバリエーション相互作用モチーフのどちらかを含む植物活性化ドメインを試験した。3段階クローニング法により、酵母組込みベクターであるpHO-zBG-MEL1を構築した(図10)

30

【0206】

まず、酵母SSAレポーターベクターであるpNORMEL1(Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26(6):702-8)の2つの別々の断片がPCRにより増幅された。第一の断片は酵母KanMX発現カセットを含有し、それぞれに5' SpeI、BamHI、NheI、PacI、BglII、KpnI、および3' EcoRI制限部位を加える、プライマーであるKanMX-For(配列番号59)およびKanMX-Rev(配列番号60)を使用してpNORMEL1から増幅された。第二の断片は、細菌複製起点により分離されている酵母HO遺伝子座(Voth et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29(12):E59-9)に外向きに面する相同性アームを含有し、プライマーであるHO-For(配列番号61)およびHO-Rev(配列番号62)を使用して増幅された。前記2つの断片は、EcoRI/SpeIで消化され、ライゲーションされてKanMX選択可能HOTargetingベクターを生成した。

40

【0207】

次に、pMEL1-2由来のMEL1発現カセット(Melcher et al. (2000) Gene 247(1-2):53-61)はMEL1-For(配列番号63)およびMEL1-Rev(配列番号64)で増幅されて、KanMX選択可能HOTargetingベクターのKpnI部位にクローニングされた。

50

【0208】

最後に、ジンクフィンガータンパク質 (ZFP) 結合部位 (高親和性部位 (High Affinity Site)) を表して「HAS」と呼ばれる) は外部ベンダー (DNA 2.0、Menlo Park、CA) により新規に合成された。この部位はヒトCCR5 遺伝子をターゲティングするジンクフィンガータンパク質 (ZFP) に対する結合部位を含有していた (Perez et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:808-16)。HAS断片はプライマーであるHAS-For-F1 (配列番号65) およびHAS-For-R1 (配列番号66) を使用してPCR増幅され、MEL1レポーター遺伝子の上流に位置する、KanMX HO MEL1ベクターのBamHI-PacI部位にクローニングされた。この最終ベクターはpHO-zBG-MEL1と命名された (図10)。

10

【0209】

pHO-zBG-MEL1はNotIで直線化されて、ターゲティングのための隣接相同性アームを酵母HO遺伝子座に曝露させ、製造業者が示すプロトコルを使用して、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 株であるBY4741MAT (Invitrogen、Carlsbad、CA) に形質転換された。手短かに言えば、3mLの対数期BY4741培養物はペレット化され、TELバッファー (10mM Tris HCL pH 8.0、1mM EDTA、100mM 酢酸リチウム) 中で洗浄された。酵母細胞ペレットは、3µgの直線化されたpHO-zBG-MEL1を含有する360µLの酵母形質転換液 (33.3% PEG-3350 (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)、0.1M 酢酸リチウム (Sigma-Aldrich)、および1xTE中0.2mg/mLサケ精子DNA (Stratagene、La Jolla、CA)) に再懸濁され、42°Cで40分間熱ショックを受けた。酵母細胞は、1mg/LのGeneticin (登録商標) (Life Technologies、Carlsbad、CA) を含有するYPDプレート上での選択に先立って、ペレット化され、洗浄され、2時間富栄養培地で増殖させた。抵抗性クローンはYPD+Geneticin (登録商標) プレート上で再画線され、その後の形質転換に使用された。

20

【0210】

酵母ZFP-転写活性化因子発現カセット構築

インフレームCCR5ジンクフィンガー結合タンパク質 (CCR5-ZFP) - 植物トランス活性化相互作用モチーフを含有するDNA構築物が構築された。配列番号80~93に記載されている天然およびバリエーション植物トランス活性化相互作用モチーフはBamHI/HindIII制限酵素断片として動員され、CCR5-ZFPドメインをコードする配列の下流に直接クローニングされた (Perez et al. (2008)、上記)。得られたZFP転写活性化因子発現カセットは、GAL1, 10プロモーター (West et al. (1987) Genes Dev. 1:1118-31) およびCYC1ターミネーター (Osborne et al. (1988) Genes Dev. 2:766-72) を利用し、酵母pRS315シリーズベクターを基盤としていた。得られたベクターは、CCR5-ZFPとのインフレーム融合物として天然およびバリエーション植物トランス活性化相互作用モチーフを含有していた。

30

【0211】

さらに、いくつかの対照が含まれた。空ベクター対照ならびに2つの異なるVP-16転写活性化因子発現カセット、SGMO VP16-CCR5 (配列番号79) およびVP16v2 CCR5-CCR5が研究で使用された。VP-16転写活性化因子発現カセットは両方ともGAL1, 10プロモーターにより推進され、CYC1ターミネーターにより停止された。空ベクター対照はCCR5-ZFPドメインのみを含有し、トランス活性化相互作用モチーフは含有していなかった。

40

【0212】

酵母活性アッセイ

BY4741レポーターライン株の一晚培養物はYPD+Geneticin (登録商標) において増殖され、ZFP転写活性化因子発現カセットを含有する1µgのベクターは、96ウェルフォーマットにおいて標準酵母形質転換プロトコルを使用して送達され

50

た。形質転換はすべて重複して行われた。形質転換された酵母細胞はロイシンを欠く合成デキストロース培地 (SD - Leu) に回収されて、ZFP転写活性化因子発現カセットを含有するベクターを選択した。72時間後、酵母細胞はSD - Leu中形質転換体の1対10希釈により濃縮され、さらに24時間増殖させた。次に、酵母細胞はロイシンを欠く合成ラフィノース培地 (SR - Leu) に1対10で希釈され、GAL1, 10プロモーターを抑制解除した。24時間後、酵母細胞はペレット化され、ロイシンを欠く合成ガラクトース培地 (SG - Leu) に再懸濁された。ガラクトース誘導の0、3、および6時間後の時点で、110 μ Lの酵母細胞がMEL1アッセイのために収穫された。

【0213】

MEL1アッセイでは、110 μ Lの酵母細胞のうち100 μ Lが100 μ Lの水に希釈され、分光光度計を使用して600 nmでの光学密度 (OD₆₀₀) が測定された。残りの10 μ Lの酵母細胞は30 で1時間90 μ LのMEL1バッファー (77 mM Na₂HPO₄、61 mM クエン酸、2 mg/mL PNPG (Sigma - Aldrich)) 中でインキュベートされた。反応は100 μ Lの1M Na₂CO₃の添加により停止された。MEL1活性はOD₄₀₅で評価され、mUはOD₄₀₅とOD₆₀₀の測定値の比に基づく式を使用して計算された (Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26(6):702-8)。

10

【0214】

様々な植物トランス活性化相互作用モチーフによる活性化から生じたMel1レポーター遺伝子の発現レベルは図11に示されている。これらの様々な植物トランス活性化相互作用モチーフから生じたMEL1タンパク質の発現は、空ベクター対照ならびにVP16トランス活性化ドメイン (配列番号1) のサブドメインII (VP16 (v2) - CCR5) およびSGMO VP16 (SGMO VP16 - CCR5) からのMel1の活性化と比較された。

20

【0215】

改変されたERF2 (v2) 植物トランス活性化相互作用モチーフは、VP16対照と比べた場合、予想外の高レベルな発現を生じた。さらに、このバリエーション植物トランス活性化相互作用モチーフでのMel1の発現は、天然型のERF2 (v3) 植物トランス活性化相互作用モチーフを超える増加をもたらした。

【0216】

改変されたPTI4 (v2) 植物トランス活性化相互作用モチーフはMEL1タンパク質をVP16トランス活性化ドメイン対照に類似するレベルで発現させた。しかし、PTI4相互作用モチーフに導入された改変は、天然のPTI4 (v3) 植物トランス活性化相互作用モチーフと比べた場合、顕著に高いレベルのMel1発現をもたらした。

30

【0217】

AtERF1 (v3)、AtERF1 (v2)、ORCA2 (v3)、ORCA2 (v2)、DOF1 (v3)、DOF1 (v2)、DREB1A (v3)、DREB1A (v2)、CBF1 (v3) およびCBF1 (v2) 植物トランス活性化相互作用モチーフは、VP16対照と比べた場合、酵母アッセイにおいてMel1の高レベルの発現をもたらさなかった。しかし、AtERF1、DREB1A、およびCBF1植物トランス活性化相互作用モチーフは酵母においてMel1の発現を確かに推進した。ORCA2 (v3) およびDOF1 (v2) 植物トランス活性化相互作用モチーフのみは酵母アッセイにおいてMel1のいかなる発現ももたらさなかった。

40

【0218】

改変バリエーション (v2) 植物トランス活性化相互作用モチーフの植物トランス活性化ドメインにより産生されるMEL1のレベルは、Mel1酵母アッセイにおいて天然 (v3) 植物トランス活性化相互作用モチーフと比べた場合、一般的に高かった。酵母アッセイにおいてMel1の発現を推進しなかった唯一の改変植物トランス活性化相互作用モチーフは、DOF1 (v2) 相互作用モチーフであった。この植物トランス活性化相互作用モチーフは酵母アッセイにおいていかなるMEL1発現も生じなかった。

50

【実施例 4】

【0219】

ジンクフィンガーDNA結合ドメインを含むレポーター構築物を含有するタバコにおける植物活性化ドメインの相互作用モチーフの機能

レポーター構築物 pDAB9897

Z6 DNA結合ドメインポリヌクレオチド配列の8直列型反復(配列番号67; Yokoi et al. (2007) Mol Ther. 15(11):1917-23)は、クローニングを容易にするために、SacII部位を5'および3'末端に付加させて新規に合成された(IDT、Corallsville、IA)。全8X-Z6結合ドメイン(配列番号68)は続いて、所望の植物発現エレメントを含有する既存のGateway(登録商標)エンターベクターにクローニングされた。8X-Z6結合部位はSacII断片上に動員され、バックボーンベクターに見出される独自のSacII部位を使用して、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)アクチン-2プロモーター(AtAct2プロモーターv2; An et al. (1996) Plant J. 10:107-21)の直ぐ上流にクローニングされた。それに続いて、gus遺伝子(GUS; Jefferson (1989) Nature 342:837-8)は、独自のNcoI/SacI部位を使用してシロイヌナズナ(*A. thaliana*)アクチン-2プロモーターの直接制御下でこのベクターにクローニングされ、NcoI部位のATGコドンが開始コドンを形成した。AtuORF23 3'UTR(アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)オープンリーディングフレーム-23、3'非翻訳領域; 欧州特許出願第222493 A1号)を使用して転写を終止させた。

10

20

【0220】

最終形質転換ベクターであるpDAB9897(図12)は、シロイヌナズナ(*A. thaliana*)ユビキチン-10プロモーター(AtUbi10プロモーターv2(Callis et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:12486-93)): :ホスフィントリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(pat v3(Wohlleben et al. (1988) Gene 70:25-37)): :植物選択のためのアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*A. tumefaciens*)オープンリーディングフレーム-1、3'非翻訳領域(AtuORF1 3'UTR v3(Huang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22)選択可能マーカーカセットを含有するデステイネーションベクターとのGateway(登録商標)ライゲーションの結果であった。最終形質転換ベクターは塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*A. tumefaciens*)株であるLBA4404(Invitrogen、Carlsbad、CA)中に形質転換された。

30

【0221】

pDAB9897を用いたタバコのアグロバクテリウム(*Agrobacterium*)媒介形質転換

トランスジェニックレポーター植物イベントを起こすため、プチハバナ(Petit Havana)タバコ植物から切り取った葉片(1cm²)を、プラスミドであるpDAB9897を宿すアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*A. tumefaciens*)株であるLBA4404の一晚培養物中でインキュベートし、OD₆₀₀約1.2nmまで増殖させ、無菌フィルターペーパー上で吸い取り乾燥させ、次に60×20mm皿(1皿あたり5片)中のMS培地(Phyto Technology Labs、Shawnee Mission、KS)および30g/Lスクロース上に置いて、1mg/Lのインドール酢酸および1mg/Lのベンジアミノプリン(benzylamino purine)を添加してNescofilm(登録商標)(Karlan Research Products Corporation、Cottonwood、AZ)で密封した。48時間の共培養に続いて、葉片は250mg/Lのセフォタキシム(cephotaxime)および5mg/LのBASTA(登録商標)を有する同じ培地に移された。3~4週間後、小植物は、葉収穫および分子分析に先立ってさらに2~3週間、PhytaTrays(商標)中の250mg/Lのセフォタキシムおよび10mg/LのBASTA(登録商標)を有するMS培地に移された。

40

【0222】

50

レポーターイベントのコピー数およびPTU分析

PCR DNA単離。トランスジェニックタバコ植物組織は新たに生育させた小植物から収穫され、96ウェル収集プレート(Qiagen, Valencia, CA)において少なくとも2日間凍結乾燥させた(Labconco, Kansas City, MO)。次に、DNAは製造業者の説明書に従って、DNEasy(商標)96ウェル抽出キット(Qiagen)を使用して単離された。組織破壊にはModel 2-96A Kleco(商標)組織粉碎機(Garcia Manufacturing, Visalia, CA)が使用された。

【0223】

サザンDNA単離。トランスジェニックタバコ植物組織は新たに生育させた小植物から収穫され、2mLの円錐チューブ(Eppendorf)において少なくとも2日間凍結乾燥させた(Labconco, Kansas City, MO)。次に、DNAは製造業者の説明書に従って、DNEasy(商標)Plant Mini抽出キット(Qiagen)を使用して単離された。組織破壊にはModel 2-96A Kleco(商標)組織粉碎機(Garcia Manufacturing)が使用された。

10

【0224】

DNA定量化。得られたゲノムDNAは、Quant-iT(商標)PicoGreen(登録商標)DNAアッセイキット(Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して定量された。20ng/μLから1.25ng/μL(連続希釈された)に及ぶ5つの予め定量されたDNA標準が標準曲線作成のために使用された。試料は先ず、アッセイの線形範囲内にあるように1対10または1対20の希釈度で希釈され、ゲノムDNAの濃度は製造業者のプロトコールに従って決定された。次に、Synergy 2(商標)プレートリーダー(Biotek, Winooski, VT)を使用して蛍光が記録された。ゲノムDNA濃度は、バックグラウンド蛍光補正から計算された標準曲線から評価された。次に、TEまたは水を使用して、DNAは、Biorobot 3000(商標)自動化液体ハンドラー(Qiagen)を使用してPCRのために共通の濃度10ng/μLまで希釈された。サザン分析のためのDNAは希釈せずにおいた。

20

【0225】

コピー数評価。推定トランスジェニックイベントは、TaqMan(登録商標)アッセイ(Applied Biosystems, Carlsbad, CA)に類似する多重DNA加水分解プローブアッセイを使用して組込みコンプレキシティ(integration complexity)について分析された。導入遺伝子インサートのコピー数は、pat導入遺伝子と内在性タバコ基準遺伝子であるpal(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ; GenBank受託番号AB008199)の両方について配列特異的プライマーおよびプローブを使用して評価された。両遺伝子についてのアッセイは、LightCycler(登録商標)プローブ設計ソフトウェア2.0(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を使用して設計された。両遺伝子についてのリアルタイムPCRは、LightCycler(登録商標)480システム(Roche Applied Science)を使用して評価された。

30

40

【0226】

増幅では、LightCycler(登録商標)480プローブマスター混合物(Roche Applied Science)が、0.4μMのそれぞれのプライマーおよび0.2μMのそれぞれのプローブを含有する10μL容積多重反応において1×最終濃度で調製された(表1)。2段階増幅反応は、58で38秒間、伸長物で実施され、蛍光を取得した。試料はすべて3連で実行され、それぞれの試料の分析に平均Ct値が使用された。リアルタイムPCRデータの解析は相対定量モジュールによりLightCycler(登録商標)ソフトウェア(Roche Applied Science)を使用して実施され、Ct法に基づいている。単一コピー標準物質由来のgDNAの試料は結果を正規化するために含まれた。単一コピー標準物質イベントはサザン分析により既

50

に同定されており、pat遺伝子の単一インサートを有することが確かめられていた。

【0227】

【表1】

表1. patとpal加水分解プローブ(HP)アッセイの両方において使用されたプライマーとプローブの配列。それぞれのプローブの蛍光エピトープは異なっており、そのせいでアッセイは多重反応として同時に実行することができた。

プライマー	ヌクレオチド配列(5'-3')	種類
TQPATS	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT (配列番号69)	プライマー
TQPATA	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAACAGT (配列番号70)	プライマー
TQPATFQ	CY5-GGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG-BHQ2 (配列番号71)	Cy5プローブ
TQPALS	TACTATGACTTGATGTTGTGTGGTGA (配列番号72)	プライマー
TQPALA	GAGCGGTCTAAATCCGACCCTTATTC (配列番号73)	プライマー
TQPALFQ	6FAM-AAACGATGGCAGGAGTGCCCTTTTCTATC AAT-BHQ1 (配列番号74)	6FAMプローブ

10

20

【0228】

PTU PCR。低コピーイベントは続いて無傷の植物転写単位(PTU)についてPCRによりスクリーニングされた。Blu636(配列番号75)およびBlu637(配列番号76)プライマーを使用して、正確な増幅によりZ6-Act2/GUS/ATORF23 PTU(3,771bp)からなる3.7kb産物が得られた。Phusion(登録商標)GCマスター混合物(New England Biolabs、Beverly, MA)は、以下の反応条件、98 で30秒間、続いて98 で10秒間、67 で30秒間、72 で2分間、および72 で10分間の最終伸長を30サイクルで使用された。上で詳述したPTU PCR反応に加えて、内在性遺伝子であるchs(カルコンシンターゼ; GenBank受託番号FJ969391.1)の増幅もゲノムDNA鋳型の品質を確認するために含まれた。3'CHSフォワード(配列番号77)および3'CHSリバー(配列番号78)プライマーは反応に含まれ、この反応は350bp増幅産物を産生した。20μLの反応が使用され、最終濃度はトランスジェニックプライマーでは0.5μMおよび内在性基準遺伝子では0.2μMであった。

30

【0229】

サザン分析。試料ごとに、5μgのゲノムDNAは、37で一晩のインキュベーションにより、制限酵素であるAseI(New England Biolabs)で完全に消化された。消化されたDNAは、製造業者が提唱するプロトコールに従って、Quick Precip(商標)溶液(Edge Biosystems、Gaithersburg, MD)での沈殿により濃縮された。次に、ゲノムDNAは65で1時間25μLの水中に再懸濁された。再懸濁された試料は、1xTAEバッファーで調製された0.8%アガロースゲル上にローディングされ、1xTAE中1.1V/cmで一晩電気泳動された。前記ゲルは変性バッファー(0.2M NaOH/0.6M NaCl)中に30分間浸され、続いて中和バッファー(0.5M Tris-HCl(pH 7.5)/1.5M NaCl)に30分間浸された。

40

【0230】

DNA断片のナイロン膜への移行は、クロマトグラフィーペーパーウィックおよびペー

50

パーティールを使用して、 $20 \times \text{SSC}$ バッファーを一晩ゲルを通して処理されたImmobilon (商標) NY + 転写膜 (Millipore, Billerica, MA) 上に受動的にウィッキングさせることにより実施された。移行に続いて、膜は $2 \times \text{SSC}$ で短時間洗浄され、Stratalinker (登録商標) 1800 (Stratagene, La Jolla, CA) と架橋され、 80°C で3時間真空ベーキングされた。

【0231】

プロットは、Robbins Scientific Model 400ハイブリダイゼーションインキュベーター (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA) を使用してガラス製ローラーボトル中、 65°C で1時間プレハイブリダイゼーション液 (PerfectHyb (商標) plus, Sigma-Aldrich) と一緒にインキュベートされた。プローブは、全コード配列を含有するPCR断片から調製された。PCRアンプリコンは、Qiaex II (登録商標) ゲル抽出キット (Qiagen) を使用して精製され、Random RT Prime-iT (登録商標) 標識キット (Stratagene, La Jolla, CA) により [^{32}P] dCTP を標識された。プロットは、プレハイブリダイゼーション液におよそ200万カウントプロット $\cdot \text{mL}^{-1}$ まで直接添加された変性プローブに 65°C で一晩ハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーションに続いて、プロットは $0.1 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{ SDS}$ を用いて 65°C で40分間順次洗浄された。最後に、プロットは記憶蛍光体画像化スクリーンに曝露され、Molecular Dynamics (商標) Storm (商標) 860 撮像システムを使用して撮像された。正確な単一コピー組込みイベントは、単一ハイブリダイゼーションバンドの同定により確かめられた。

10

20

【0232】

ホモ接合型 T_2 レポーター植物の生成

合計で51のBASTA (登録商標) 抵抗性植物が生成され、このうち24は、コピー数の加水分解プローブ分析に基づいて低コンプレキシティ ($1 \sim 2$ コピーの pat) であることが分かった。これらの低コンプレキシティイベントのうち、PCR分析により決定される場合、18が無傷のPTUを示した。サザンプロット分析に続いて、2つの単一コピー、無傷のPTUイベントが選択され、成熟するまで温室で生育され、そこで自家受粉させておいた。次に T_1 種子を収集し、表面殺菌し (20% 漂白剤で3分間、続いて2回の無菌蒸留水すすぎ)、Phytatrays (商標) (Sigma, St. Louis, MO) においてMS培地 (Phytotechnology Labs, Shawnee Mission, KS) および 30 g/L スクロース上で発芽させた。patコピー数分析による接合状態スクリーニングに続いて、ホモ接合型 T_1 植物が選択され、成熟するまで温室で生育され、そこで自家受粉させておいた。次に、 T_2 種子を収集し、表面殺菌し、前述と同じように発芽され、植物トランス活性化試験のためにレポーター植物を生成するのに使用された。

30

【0233】

植物ZFP - 植物転写活性化因子発現構築物

バリエーションまたは天然植物トランス活性化相互作用モチーフを含有する植物ZFP - 転写活性化因子構築物が構築された。クローニングのための制限酵素部位BamHI / SacI が隣接する植物トランス活性化相互作用モチーフ (天然と改変バリエーションの両方) が新規に合成された (DNA 2.0, Menlo Park, CA)。植物トランス活性化相互作用モチーフはBamHI / SacI断片上に動員され、既存のGateway (登録商標) Entryバックボーンベクターに見出される独自のBamHI / SacI部位を使用してZ6ジンクフィンガーDNA結合ドメインの直ぐ下流にクローニングされた (Yokoi et al. (2007)、上記)。この段階が完了すると、ZFP転写活性化因子構築物 (植物トランス活性化相互作用モチーフに融合されたZ6 DNAジンクフィンガータンパク質結合ドメインを含有する) は、構成的キャッサバ葉脈モザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) プロモーター (CsVMVプロモーターv2; Verdaguer et al. (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39) の制御下に置かれ、アグロバクテリウム・ツメファシ

40

50

エンス (*A. tumefaciens*) 由来の ORF 23 3' UTR を終端とした。最終形質転換ベクター (表 2) は、植物選択のために、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) ユビキチン - 3 プロモーター (*At Ubi 3* プロモーター v 2; Callis et al. (1995) *Genetics*, 139 (2):921-39) / ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ II (*HPT II* v 1; Gritz et al. (1983) *Gene* 25(2-3):179-88) / アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) オープンリーディングフレーム - 24、3' 非翻訳領域 (*Atu ORF 24* 3' UTR v 2) カセットを含有するデスティネーションベクターとの Gateway (登録商標) 媒介ライゲーション (*Invitrogen*、*Carlsbad*、*CA*) から生じた。

【 0 2 3 4 】

10

【表 2】

表 2. タバコで試験された植物 ZFP-転写活性化因子構築物。配列識別子は、Z6ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されバイナリーベクターにおいて発現された植物トランス活性化相互作用モチーフの DNA 配列を与える。

植物トランス活性化相互作用モチーフ	構築物番号および植物トランス活性化相互作用モチーフ配列			
	天然		改変された	
Pti4	pDAB107881	図13 配列番号81	pDAB106273	図22 配列番号88
AtERF1	pDAB107882	図14 配列番号82	pDAB106274	図23 配列番号89
ORCA2	pDAB107883	図15 配列番号83	pDAB106275	図24 配列番号90
Drebla	pDAB107884	図16 配列番号84	pDAB106276	図25 配列番号91
Dof1	pDAB107885	図17 配列番号86	pDAB106277	図26 配列番号93
ERF2	pDAB107886	図18 配列番号80	pDAB106278	図27 配列番号87
Cbf1	pDAB107887	図19 配列番号85	pDAB106279	図28 配列番号92
VP16	pDAB106272	図20 配列番号79	--	--
空ベクター-ジンクフィンガーのみ (トランス活性化相互作用モチーフなし)	pDAB106238	図21	--	--

20

30

40

【 0 2 3 5 】

最終バイナリーベクターは DNA 塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) 株である LBA 4404 (*Invitrogen*) に形質転換された。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインは含有するがトランス活性化相互作用モチーフで構成された活性化因子は含まない対照ベクターである pDAB106238 (図 21) が含まれた。この構築物では、ジンクフィンガー結合ドメインは構成的アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) MAS プロモーター (*Atu Mas* プロモーター v 4; 米国特許第 5, 001, 060 号、米国特許第 5, 573, 932 号および米国特許第 5, 290, 924 号) の制御下に置かれ、アグロバクテリウム

50

・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) 由来の ORF 23 3' UTR を終端とした。さらに、ベクターは、植物選択のために、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) ユビキチン - 3 プロモーター / ハイグロマイシンホストランスメラーゼ II / アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) オープンリーディングフレーム - 24、3' 非翻訳領域カセットを含有している。

【0236】

植物 ZFP - 転写活性化因子構築物を含有する植物イベントを生成するために、T₂ レポータータバコ植物から切り取った葉片 (1 cm²) を、表 2 に収載されている 16 のプラスチックのうちの一つを宿主アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) 株である LBA 4404 (Invitrogen, Carlsbad, CA) の一晚培養物中でインキュベートし、OD₆₀₀ 約 1.2 nm まで増殖させ、無菌フィルターペーパー上で吸い取り乾燥させ、次に 60 × 20 mm 皿 (1 皿あたり 5 片) 中の MS 培地 (Phytotechnology Labs, Shawnee Mission, KS) および 30 g / L スクロース上に置いて、1 mg / L のインドール酢酸および 1 mg / L のベンジアミノプリンを添加して Nescofilm (登録商標) (Karlan Research Products Corporation, Cottonwood, AZ) で密封した。48 時間の共培養に続いて、葉片は 250 mg / L のセフトキシムおよび 10 mg / L のハイグロマイシンを有する同じ培地に移された。3 ~ 4 週間後、小植物は、さらに 2 ~ 3 週間、PhytaTrays (商標) 中の 250 mg / L のセフトキシムおよび 10 mg / L のハイグロマイシンを有する MS 培地に移され、続いて葉収穫および gus 発現分析を行った。合計で 20 ~ 30 の植物イベントが、16 の植物転写活性化因子構築物ごとに生成された。

10

20

【0237】

gus 発現分析

mRNA 単離。トランスジェニックタバコ植物組織は新たに生育している小植物から収穫され、96 ウェル収集プレート (Qiagen) においてドライアイス上で急速冷凍された。次に、RNA は、製造業者の使用説明書に従って、RNeasy (登録商標) 96 ウェル抽出キット (Qiagen) を使用して単離された。組織破壊には Model 2 - 96 A Kleco (商標) 組織粉碎機 (Garcia Manufacturing) が使用された。

30

【0238】

RNA 定量化。得られた mRNA は NanoDrop (商標) 8000 分光光度計 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) を使用して定量化された。それぞれのウェルはローディングに先立って 4 μL の無リボヌクレアーゼ水で覆われ、4 μL の非希釈試料を定量化する。mRNA 濃度は、標準 RNA 核酸測定法を使用して、NanoDrop (商標) 8000 ソフトウェアから推定された。mRNA は無リボヌクレアーゼ水で約 83 ng / μL まで手作業で希釈された (hand-diluted)。

【0239】

cDNA 調製。cDNA は、製造業者の使用説明書に従って、Quantitect (登録商標) RT キット (Qiagen, Carlsbad, CA) を使用して希釈 mRNA から調製された。合計で 1 μg の mRNA がそれぞれの反応で使用された。完了すると、cDNA は分析が完了するまで -20 °C で貯蔵された。

40

【0240】

RT-PCR。ハイグロマイシン上で選択されたイベントは、両方が TaqMan (登録商標) アッセイに類似している 2 つの DNA 加水分解プローブアッセイを使用して gus 遺伝子転写物レベルについて分析された。個々のイベントごとの gus mRNA の定常状態レベルは、配列特異的プライマーおよびプローブを使用して評価された。前記 mRNA は、内在性タバコ基準遺伝子である BYEF (GenBank 受託番号 GI: 927382) について定常状態レベルの mRNA を使用して正規化された。両遺伝子についてのアッセイは、LightCycler (登録商標) プローブ設計ソフトウェア 2.0

50

(Roche Applied Science) を使用して設計された。両遺伝子についてのリアルタイムPCRはLightCycler (登録商標) 480システムを使用して評価された。gus増幅では、LightCycler (登録商標) 480プローブマスター混合物が、0.4 μMのそれぞれのプライマーおよび0.2 μMのプローブを含有する10 μL容積多重反応において1×最終濃度で調製された(表3)。

【0241】

2段階増幅反応は、56で40秒間の伸長で実施され、蛍光を取得した。試料はすべて3連で非希釈で実行され、それぞれの試料の分析に平均Ct値が使用された。BYEEF増幅では、LightCycler (登録商標) 480プローブマスター混合物が、0.25 μMのそれぞれのプライマー(表3)および0.1 μMのUPL 119プローブ(Roche Applied Science)を含有する10 μL容積多重反応において1×最終濃度で調製された。2段階増幅反応は、58で25秒間、伸長物で実施され、蛍光を取得した。試料はすべて3連で1対10の希釈で実行され、それぞれの試料の分析に平均Ct値が使用された。リアルタイムPCRデータの解析は相対定量モジュールを使用するLightCycler (登録商標) ソフトウェアを使用して実施され、Ct法に基づいている。次に、様々な植物転写活性化因子処理間での相対的発現レベルが比較された(図29)。

【0242】

【表3】

表3. gusとBYEEF加水分解プローブ(HP)アッセイの両方において使用されたプライマーとプローブの配列。

プライマー	ヌクレオチド配列(5'-3')	種類
TQGUSS	AGACAGAGTGTGATATCTACCC (配列番号75)	プライマー
TQGUSA	CCATCAGCACGTTATCGAAT (配列番号76)	プライマー
TQGUSFQ	6FAM-CACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTT-BHQ1 (配列番号77)	6FAMプローブ
BYEEFU119F	AGGCTCCCACTTCAGGATG (配列番号78)	プライマー
BYEEFU119R	CACGACCAACAGGGACAGTA (配列番号79)	プライマー

【0243】

結果

図29は、BYEEF内在性遺伝子発現レベルにより正規化された場合の、様々な植物トランス活性化相互作用モチーフについてのgus転写物レベルの得られた比を示している。様々な植物トランス活性化相互作用モチーフのgus遺伝子の活性化は空ベクター対照およびVP16トランス活性化ドメインのサブドメインIIの相互作用モチーフと比較された。いくつかの植物トランス活性化相互作用モチーフは、VP16トランス活性化因子のサブドメインIIと比べた場合、予想外に高レベルの発現を示した。例えば、PTI4、DREB1A、ERF2、およびCBF1植物トランス活性化相互作用モチーフは、VP16転写活性化ドメインのサブドメインIIよりも多くのgus mRNAを発現した。

【0244】

天然型(v3)と比べた場合の改変されたパリアント(v2)について植物トランス活性化相互作用モチーフにより産生されるmRNAのレベルは、植物トランス活性化相互作用

用モチーフ間で異なった。ERF2植物トランス活性化相互作用モチーフの改変型は、ERF2天然配列相互作用モチーフよりも顕著に多くのgus mRNAを産生した。同様に、改変されたCBF1植物トランス活性化相互作用モチーフは、CBF1天然配列相互作用モチーフよりも多くのmRNAを産生した。逆に、PTI4およびDREB1Aトランス活性化相互作用モチーフ内に導入された改変では、天然型のPTI4およびDREB1A植物トランス活性化相互作用モチーフと比べた場合、産生されたgus mRNAレベルは低かった。

【実施例5】

【0245】

GAL4レポーター構築物を含有するタバコにおける相互作用モチーフ機能

10

GAL4結合ドメインを含むレポーター構築物を含有するタバコ系統

レポーター構築物であるpGalGUSは、下に記載される戦略を使用して構築される。酵母GAL4結合配列および23bpスペース領域の6つの直列型繰り返し(Baleja et al. (1997) J. Biomol. NMR 10:397-401に記載されている)は、クローニングを容易にするためにSacII部位を加えて新規に合成される(IDT)。6×Gal4結合部位はSacII断片上に移動され、これを使用して、SacIIでも消化される既存のエントリーベクター由来のZ6結合部位を置き換える。このクローニング段階は、GAL4結合部位を、gus遺伝子の発現を推進するシロイヌナズナ(Arabidopsis)アクチン2プロモーターの直ぐ上流に置く。最終形質転換ベクターであるpGalGUS(図30)は、植物選択に使用されるシロイヌナズナ(Arabidopsis)ユビキチン10プロモーター

20

【0246】

pGalGUSを用いたタバコのアグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介形質転換トランスジェニックレポーター植物は、上記のプロトコールを使用して作成される。「pDAB9897を用いたタバコのアグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介形質転換」を参照されたい。

30

【0247】

レポーターイベントのコピー数およびPTU分析

低コンプレキシティコピー数、BASTA(登録商標)抵抗性トランスジェニック植物が生成され、TaqMan(登録商標)コピー数分析に基づいて同定される。低コンプレキシティイベントのうち、PCR分析により決定される場合、サブセットが無傷のPTUを示す。これらのイベントはサザンプロット分析によりさらに分析される。サザンプロット分析に続いて、少なくとも1つの単一コピー、無傷のPTUイベントが選択され、温室で成熟するまで生育され、自家受粉させておく。T₁種子が収集され、表面殺菌され、発芽させる。patコピー数分析による接合状態スクリーニングに続いて、ホモ接合型T₁植物が選択され、温室で成熟するまで生育され、自家受粉させておく。次に、T₂種子が収集され、表面殺菌され、発芽させ(既に記載されている通りに)、これを使用して活性化因子試験のためにレポーター植物を生成する。

40

【0248】

植物GAL4-転写活性化因子発現構築物

バリエーションまたは天然の植物トランス活性化相互作用モチーフを含有する植物GAL4-転写活性化因子構築物が構築される。実施例4(「植物ZFP-植物転写活性化因子発現構築物」)に記載される植物ZFP-転写活性化因子発現構築物は、ジンクフィンガー結合タンパク質ポリヌクレオチド配列の代わりにGAL4結合タンパク質ポリヌクレオチド配列を挿入することにより改変される。ヘミコット(hemicot)植物最適化GAL4 DNA結合ドメインポリヌクレオチド配列(Keegan et al. (1986) Science 231(4739):699-704)が、NcoI/BamHI断片としてジンクフィンガー結合タンパク質ポリヌク

50

レオチド配列の代わりに挿入される。この段階が完了すると、GAL4 - 転写活性化因子構築物は構成的キャッサバ葉脈モザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) プロモーターの制御下に置かれ、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) 由来のORF23 3'UTRを終端とする。最終バイナリー形質転換ベクターは、植物選択のために、シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) ユビキチン3 - HptIIカセットを含有するデスティネーションベクターでのGateway (登録商標) 形質転換から生じて、完成される。最終形質転換ベクターは塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) 株であるLBA4404 (*In vitro*) 中に形質転換される。

【0249】

植物GAL4 - 転写活性化因子構築物を含有する植物イベントを産生するために、実施例4に記載される一過性形質転換プロトコールが使用される。合計で20~30の植物イベントが、16のGAL4 - 転写活性化因子構築物ごとに生成される。

【0250】

gus発現分析

ハイグロマイシン上で選択されるイベントは、2つのDNA加水分解プローブアッセイを使用してgus遺伝子転写物レベルについて分析される。個々のイベントごとの定常状態レベルのgus mRNAは、配列特異的プライマーとプローブを使用して評価される。イベントごとのmRNAは、内在性タバコ基準遺伝子、例えば、BEEFの定常状態レベルのmRNAを使用して正規化される。両遺伝子のアッセイは実施例4に記載されるプロトコールを使用して設計される。リアルタイムPCRデータの解析は、相対定量モジュールを使用するLightCycler (登録商標) ソフトウェアを使用して実施され、Ct法に基づいている。様々な活性化因子構築物の相対的発現レベルが比較される。その結果によれば、植物トランス活性化相互作用モチーフおよびこれらの植物トランス活性化相互作用モチーフの操作されたバリエーションは転写活性化因子として使用することができ、遺伝子の転写活性化のためにGAL4結合タンパク質と融合することができることが示されている。

【実施例6】

【0251】

TALレポーター構築物を含有するタバコにおける相互作用モチーフ機能

TAL結合ドメインを含むレポーター構築物を含有するタバコ系統

レポーター構築物であるpTALGUSは下記の戦略を使用して構築される。AVRBS3 - 誘導性遺伝子のコンセンサス結合配列から採取され、UPA DNA結合ドメインと名付けられた8つの直列型繰り返し配列 (TATATAAACCTNNCCCTCT (配列番号99)) (Kay et al. (2009) Plant J. 59(6):859-71) は、クローニングを容易にするためにSacII部位が付加されて新規に合成される (IDT)。8 x UPA結合部位はSacII断片上に動員され、これを使用して、同様にSacIIで消化される既存のエントリーベクター由来のZ6結合部位を置き換える。このクローニング段階は、UPA結合部位を、gus遺伝子の発現を推進するシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) アクチン2プロモーターの直ぐ上流に置く。最終形質転換ベクターであるpTALGUS (図31) は、植物選択に使用されるシロイヌナズナ (*A. thaliana*) ユビキチン10プロモーター/pat遺伝子発現カセットを含有するデスティネーションベクターでのGateway (登録商標) 形質転換反応から生じる。最終形質転換ベクターは、塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) 株であるLBA4404 (*In vitro*) 中に形質転換される。

【0252】

pTALGUSを用いたタバコのアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換トランスジェニックレポーター植物は、上記のプロトコールを使用して作成される。「pDAB9897を用いたタバコのアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換」を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0253】

レポーターイベントのコピー数およびPTU分析

低コンプレキシティコピー数、BASTA（登録商標）抵抗性トランスジェニック植物が生成され、TaqMan（登録商標）コピー数分析を利用して同定される。低コンプレキシティイベントのうち、PCR分析により決定される場合、サブセットが無傷のPTUを示す。これらのイベントはサザンブロット分析によりさらに分析される。サザンブロット分析に続いて、少なくとも1つの単一コピー、無傷のPTUイベントが選択され、温室で成熟するまで生育され、自家受粉させておく。T₁種子が収集され、表面殺菌され、発芽する。patコピー数分析による接合状態スクリーニングに続いて、ホモ接合型T₁植物が選択され、温室で成熟するまで生育され、自家受粉させておく。次に、T₂種子が収集され、表面殺菌され、発芽させ（既に記載されている通りに）、これを使用して活性化因子試験のためにレポーター植物を生成する。

10

【0254】

植物TAL-転写活性化因子発現構築物

バリエーションまたは天然の植物トランス活性化相互作用モチーフを含有する植物TAL-転写活性化因子構築物が構築される。実施例4に記載される植物ZFP-転写活性化因子発現構築物は、ジンクフィンガー結合タンパク質ポリヌクレオチド配列の代わりにTAL結合タンパク質ポリヌクレオチド配列を挿入することにより改変される。DNA結合に必要な17.5 TAL繰り返しは新規に合成され、トウモロコシ(*Zea mays*) Opaque-2核局在化配列(nuclear localization sequence)(Van Eenennaam et al. (2004) *Metabolic Engineering* 6:101-8)に融合される。それぞれのドメインの配列は、UPA-ボックスコンセンサス配列について予測されるように、可変残基(12および13位)で異なるアミノ酸を利用してDNA結合を指令する(Boch et al. (2009) *Science* 326(5959):1509-12)。ヘミコット植物最適化TAL DNA結合ドメインポリヌクレオチド配列が、NcoI/BamHI断片としてジンクフィンガー結合タンパク質ポリヌクレオチド配列の代わりに挿入される。この段階が完了すると、TAL-転写活性化因子構築物は構成的キャッサバ葉脈モザイクウイルス(Cassava Vein Mosaic Virus)プロモーターの制御下に置かれ、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*A. tumefaciens*)由来のORF23 3'UTRを終端とする。最終形質転換ベクターは、植物選択のために、シロイナズナ(*Arabidopsis*)ユビキチン3-HptIIカセットを含有するデステイナーションベクターでのGateway（登録商標）形質転換から完成される。最終形質転換ベクターは塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*A. tumefaciens*)株であるLBA4404(*In vitro*ogen)中に形質転換される。

20

30

【0255】

植物TAL-転写活性化因子構築物を含有する植物イベントを産生するために、実施例4に記載される一過性形質転換プロトコールが使用される。合計で20~30の植物イベントが、16のTAL-転写活性化因子構築物ごとに生成される。

【0256】

gus発現分析

ハイグロマイシン上で選択されるイベントは、2つのDNA加水分解プローブアッセイを使用してgus遺伝子転写物レベルについて分析される。個々のイベントごとのgus mRNAの定常状態レベルは、配列特異的プライマーとプローブを使用して評価される。前記mRNAは、内在性タバコ基準遺伝子、例えば、BEEFのmRNAの定常状態レベルを使用して正規化される。両遺伝子のアッセイは実施例4に記載されるプロトコールを使用して設計される。リアルタイムPCRデータの解析は、相対定量モジュールを使用するLightCycler（登録商標）ソフトウェアを使用して実施され、Ct法に基づいている。様々な活性化因子構築物の相対的発現レベルが比較される。

40

【 図 1 】

473 480
 VP16TAD: D D F E F E Q M F T D
 * * * * *

【 図 2 】

VP16 (配列番号 :1) GMTHD-PVSYG-A-LDV-D-D-FEF-EQMF-TDAGLIDD
 ERF2 (配列番号 :2) NDS-ED-MLVY-GL-L-K-DAPHPDTS-SS--T-LSCLF
 PT14 (配列番号 :3) CLT-ET-WGDL--P-L-KWDSSE-DWVYGLLKALSYCW
 AtERF1 (配列番号 :4) CFT-ES-WGDL--P-L-K-EN-DSE-D--ML-Y-YGLLN
 ORCA2 (配列番号 :5) -FN-ENC-ETIISPNYAS-EDLS-D-I--ILTPHFKDQD
 DREB1A (配列番号 :6) GFDMEETLVEAIYTAEQS-ENAFYHDERAFEMPSLLANM
 CBF1 (配列番号 :7) ---EQS--EGAFYM---D--E---EYMGMEPILLDNM
 DOP1 (配列番号 :8) --SAG-K-A-V---LDD--ED-SEVWPAASE--LNGACWA

FGG-----
 DFPA-----
 SPFSFTAG
 DAFHGG--
 NYEDE---
 AEGM----
 AEG-----
 GAGFAD--

【 図 3 】

ERF2
 VP16 モチーフ (配列番号 :9)
 ナイティブ ERF2 (配列番号 :10)
 VER2_1 (配列番号 :17)
 VER2_2 (配列番号 :18)
 VER2_3 (配列番号 :19)
 VER2_4 (配列番号 :20)
 VER2_5 (配列番号 :21)
 VER2_6 (配列番号 :22)
 VER2_7 (配列番号 :121)

D F E F E Q M F T D
 D S H T S S S
 D D F X₁ X₂ X₃ X₄
 D X₅ F X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀
 D X₁₁ F X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆
 D X₁₇ F X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂
 D X₂₃ F X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈
 D S H T S S S
 D X₂₉ F X₃₀ X₃₁ X₃₂ X₃₃ S

式中：
 X₁ = E または H X₅ = D または A X₁₁ = D, または E
 X₂ = Q または T X₆ = E または H X₁₂ = D, E, または H
 X₃ = M または S X₇ = D または E X₁₃ = D または E
 X₄ = T または S X₈ = Q または T X₁₄ = Q または T
 X₉ = M または S X₁₅ = A, V, I, L, または M
 X₁₀ = T または S X₁₆ = F, W, または Y
 X₁₇ = S, T, N, Q, C, G, または P

X₁₈ = D または E
 X₁₉ = H, R, K, D, または E
 X₂₀ = D または E
 X₂₁ = S, T, N, Q, C, G, Y, または P
 X₂₂ = A, V, I, L, M, F, Y, または W
 X₂₃ = A, V, I, L, M, F, Y, または W
 X₂₄ = S, T, N, Q, C, G, E, または Y
 X₂₅ = A, D, または E
 X₂₆ = 任意
 X₂₇ = D または E
 X₂₈ = 任意
 X₂₉ = A, V, I, L, M, F, Y, W, または S
 X₃₀ = A, V, I, L, M, F, Y, W, または S
 X₃₁ = 任意
 X₃₂ = D または E
 X₃₃ = D または E
 X₃₄ = A, V, I, L, L, または M
 X₃₅ = F, W, または Y

【 図 4 】

PT14
 VP16 モチーフ (SEQ ID NO:9)
 ナイティブ PT14 (SEQ ID NO:11)
 vPT14_1 (SEQ ID NO:23)
 vPT14_2 (SEQ ID NO:24)
 vPT14_3 (SEQ ID NO:25)
 vPT14_4 (SEQ ID NO:26)
 vPT14_5 (SEQ ID NO:27)
 vPT14_6 (SEQ ID NO:28)
 vPT14_7 (SEQ ID NO:122)

D F E F E Q M F T D
 D S H T S S S
 D D F X₁ X₂ X₃ X₄
 D X₅ F X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀
 D X₁₁ F X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆
 D X₁₇ F X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂
 D X₂₃ F X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈
 D X₂₉ F X₃₀ X₃₁ X₃₂ X₃₃ X₃₄
 D S H T S S S
 D X₃₅ F X₃₆ X₃₇ X₃₈ X₃₉ X₄₀

式中：
 X₁ = F または S X₇ = 任意 X₁₇ = F または S
 X₂ = D または E X₈ = D または E X₁₈ = D または E
 X₃ = Q または M X₉ = 任意 X₁₉ = Q または M
 X₄ = M または V X₁₀ = A, V, I, L, または M X₂₀ = M または V
 X₅ = F または Y X₁₁ = 任意 X₂₁ = F または Y
 X₆ = T または L X₁₂ = F, W, または Y X₂₂ = T または L
 X₁₃ = 任意
 X₁₄ = 任意
 X₁₅ = 任意
 X₁₆ = 任意
 X₂₃ = 任意 X₃₀ = 任意
 X₂₄ = F, W, または Y X₃₁ = F, W, Y, A, V, I, L, または M
 X₂₅ = D または E X₃₂ = D または E
 X₂₆ = 任意 X₃₃ = 任意
 X₂₇ = A, V, I, L, L, または M X₃₄ = A, V, I, L, M, F, W, または Y
 X₂₈ = F, W, または Y X₃₅ = F, W, Y, A, V, I, L, または M
 X₂₉ = 任意 X₃₆ = 任意
 X₃₇ = F または S
 X₃₈ = F, W, または Y
 X₃₉ = E または D
 X₄₀ = A, V, I, L, L, または M
 X₄₁ = F, W, または Y
 X₄₂ = T または L

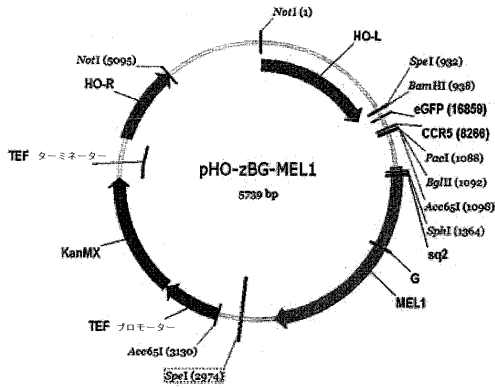
【 図 5 】

AtERF1
 VP16 モチーフ (配列番号 :9)
 ナイティブ AtERF1 (配列番号 :12)
 vAtERF1_1 (配列番号 :29)
 vAtERF1_2 (配列番号 :30)
 vAtERF1_3 (配列番号 :31)
 vAtERF1_4 (配列番号 :32)
 vAtERF1_5 (配列番号 :33)
 vAtERF1_6 (配列番号 :34)
 vAtERF1_7 (配列番号 :123)

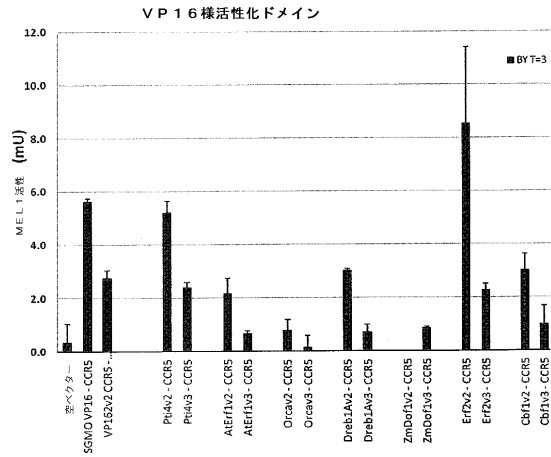
D F E F E Q M F T D
 E N S E D - M V
 X₁ N X₂ E X₃ - X₄ X₅
 X₆ X₇ X₈ E X₉ - X₁₀ X₁₁
 X₁₂ - X₁₃ E F X₁₄ X₁₅ X₁₆
 X₁₇ - X₁₈ E X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂
 X₂₃ - X₂₄ E X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈
 E N F E F E - T G
 E N X₂₉ E X₃₀ X₃₁ - X₃₂ X₃₃

式中：
 X₁ = D または E X₆ = 任意
 X₂ = F または S X₇ = 任意
 X₃ = D または E X₈ = 任意
 X₄ = F または L X₉ = D または E
 X₅ = T または V X₁₀ = F, L, A, V, I, M, Y, または W
 X₁₁ = 任意
 X₁₂ = D または E X₁₇ = D または E
 X₁₃ = F または S X₁₈ = 任意
 X₁₄ = D または E X₁₉ = F, W, または Y
 X₁₅ = F または L X₂₀ = D または E
 X₁₆ = T または V X₂₁ = S, T, N, Q, C, G, P, または Y
 X₂₂ = F, L, A, V, I, M, Y, または W
 X₂₃ = 任意 X₂₄ = D または E
 X₂₅ = 任意
 X₂₆ = 任意
 X₂₇ = F, L, A, V, I, M, Y, または W
 X₂₈ = D, E, H, R, または K
 X₂₉ = S, T, N, Q, C, G, P, または Y
 X₃₀ = F, L, A, V, I, M, Y, または W
 X₃₁ = 任意
 X₃₂ = D または E
 X₃₃ = F または S
 X₃₄ = F, W, または Y
 X₃₅ = E または D
 X₃₆ = F, W, Y, または L
 X₃₇ = T または V
 X₃₈ = D または E

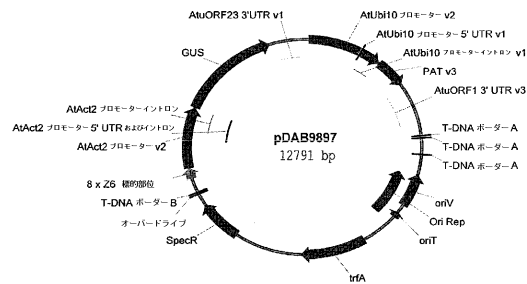
【 図 1 0 】



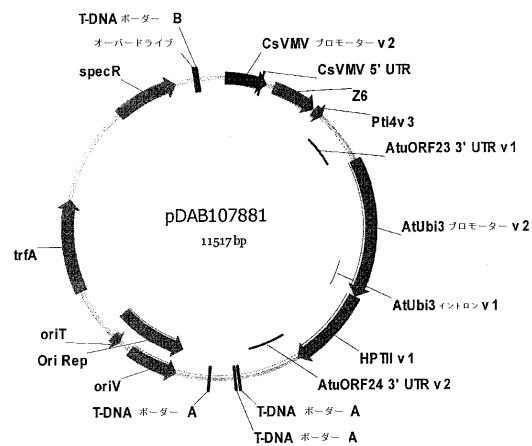
【 図 1 1 】



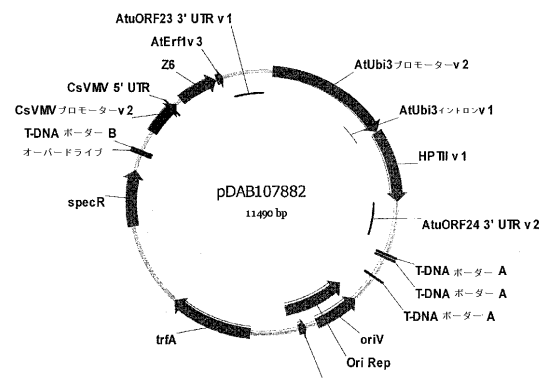
【 図 1 2 】



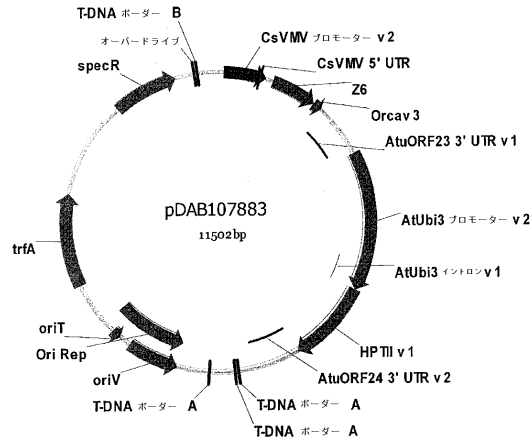
【 図 1 3 】



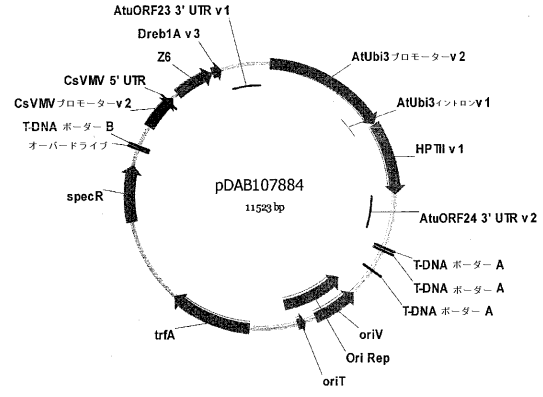
【 図 1 4 】



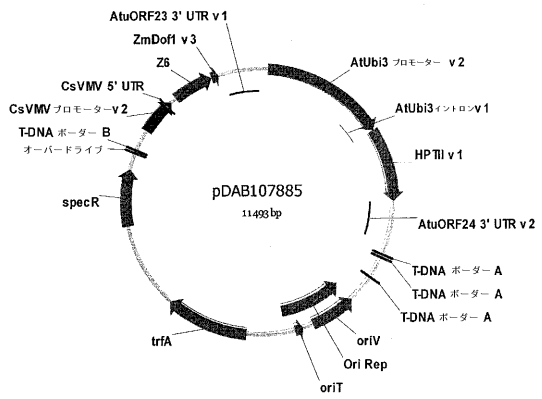
【 図 1 5 】



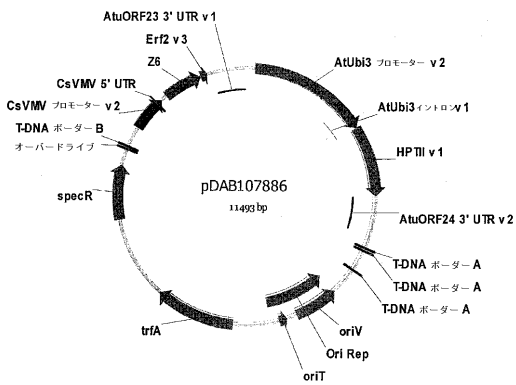
【 図 1 6 】



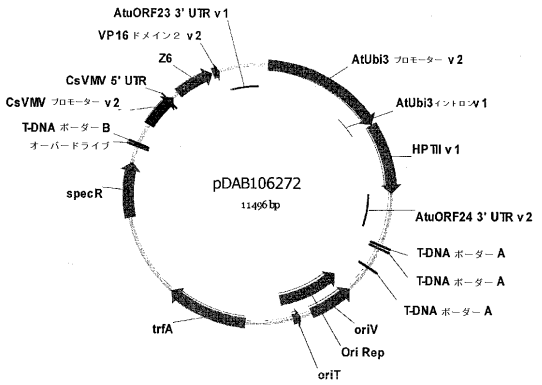
【 図 1 7 】



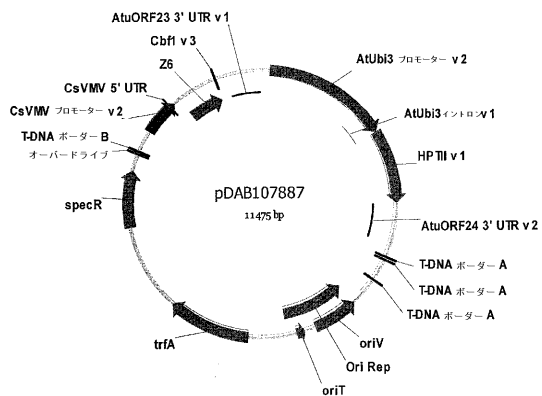
【 図 1 8 】



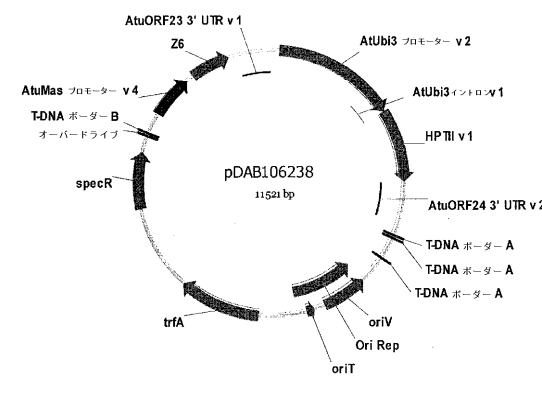
【 図 2 0 】



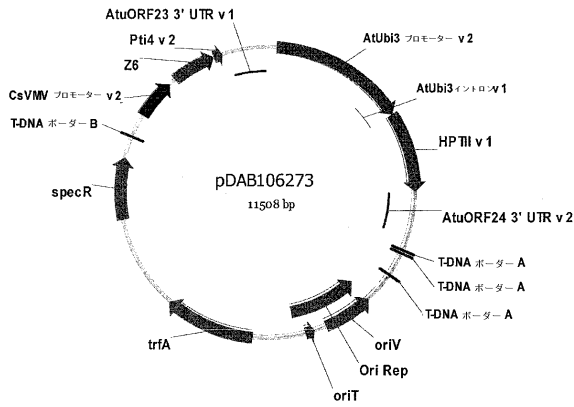
【 図 1 9 】



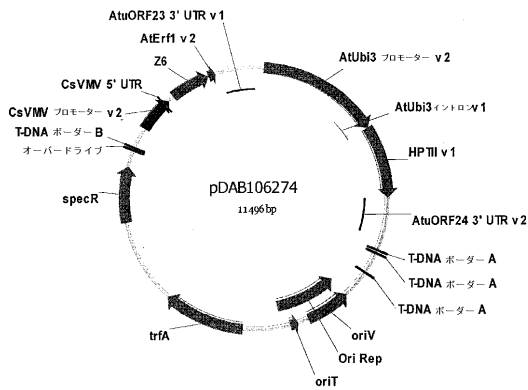
【 図 2 1 】



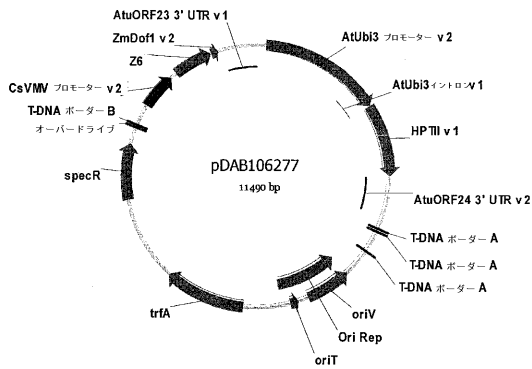
【 図 2 2 】



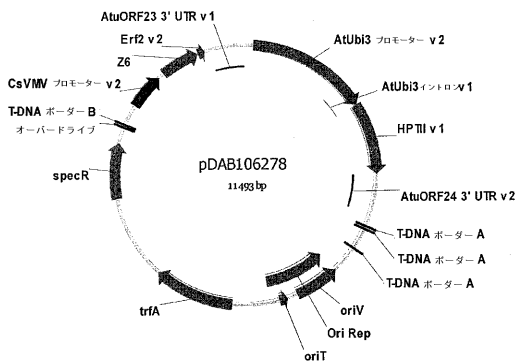
【 図 2 3 】



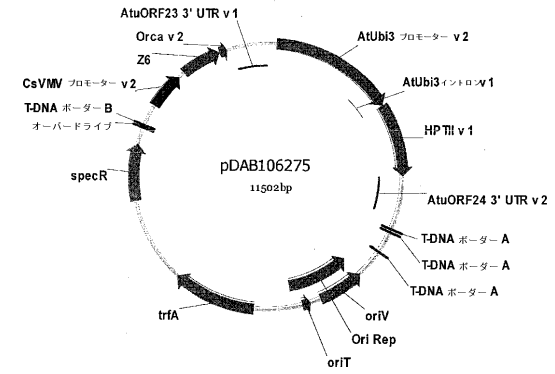
【 図 2 6 】



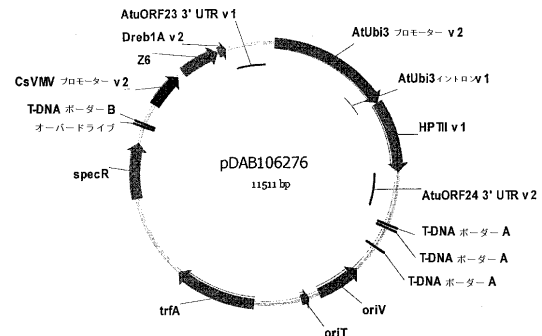
【 図 2 7 】



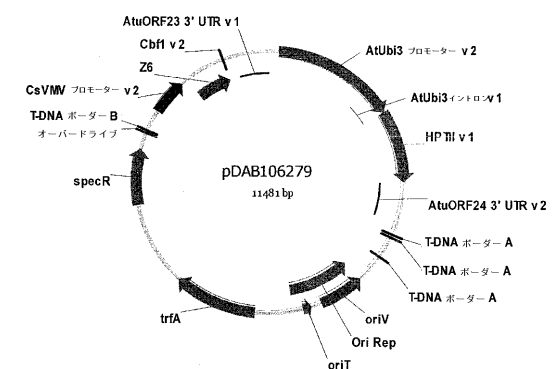
【 図 2 4 】



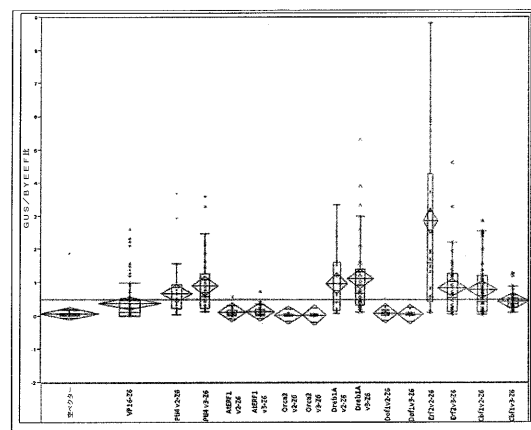
【 図 2 5 】



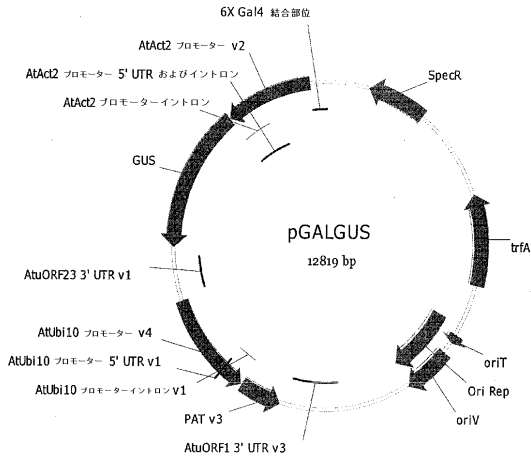
【 図 2 8 】



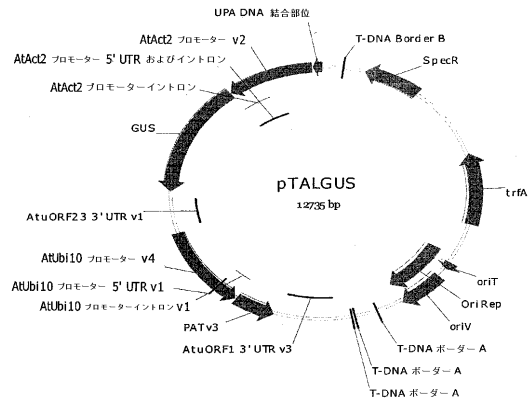
【 図 2 9 】



【図 30】



【図 31】



【配列表】

2017193546000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月24日(2017.5.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリヌクレオチドに特異的に結合するDNA結合ポリペプチド、および配列番号41～46および125からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む合成転写活性化因子融合タンパク質であって、

前記ポリヌクレオチドが作動可能に第二のポリヌクレオチドに連結した際に、対象のポリペプチドをコードする前記第二のポリヌクレオチドの発現を増加させる、合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項2】

前記トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号14である、請求項1に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項3】

DNA結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、AVRBS3誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項1または2に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

質。

【請求項 4】

少なくとも1つの追加のDNA結合ポリペプチドを含む、請求項1または2に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 5】

少なくとも1つの追加のトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む、請求項1または2に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 6】

配列番号104、配列番号115および配列番号116からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

【請求項 7】

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、前記ポリヌクレオチドが、

標的ポリヌクレオチドに特異的に結合するDNA結合ポリペプチドをコードする第一のヌクレオチド配列、および

配列番号41～46および125からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のヌクレオチド配列を含み、

第一および第二のヌクレオチド配列が前記ポリヌクレオチドからインフレームでおよび単一転写物で発現され、さらに

前記合成転写活性化因子融合タンパク質が、標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結している対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させる、核酸分子

。

【請求項 8】

前記トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号14である、請求項7に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記標的ポリヌクレオチドが、配列番号67、配列番号68および配列番号99からなる群から選択される、請求項7に記載の核酸分子。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチドが配列番号84または配列番号91と少なくとも80%同一である、請求項7に記載の核酸分子。

【請求項 11】

前記ポリヌクレオチドが配列番号84または配列番号91と少なくとも90%同一である、請求項7に記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチドが配列番号84または配列番号91である、請求項7に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記DNA結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、AVRBS3誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項7または8に記載の核酸分子。

【請求項 14】

前記ポリヌクレオチドが、DNA結合ポリペプチドをコードする少なくとも1つの追加のヌクレオチド配列を含む、請求項7または8に記載の核酸分子。

【請求項 15】

前記ポリヌクレオチドが、トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドをコードする少なくとも1つの追加のヌクレオチド配列を含む、請求項7または8に記載の核酸分子。

【請求項 16】

前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、遺伝子

調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項 7 または 8 に記載の核酸分子。

【請求項 17】

前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドにおいて、第一および第二のヌクレオチド配列が第三のヌクレオチド配列により分離されている、請求項 7 または 8 に記載の核酸分子。

【請求項 18】

ベクターである、請求項 7 または 8 に記載の核酸分子。

【請求項 19】

選択可能マーカ―またはスクリーニング可能マーカ―を含むベクターである、請求項 18 に記載の核酸分子。

【請求項 20】

植物発現ベクターである、請求項 18 に記載の核酸分子。

【請求項 21】

請求項 7 ~ 12 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む細胞。

【請求項 22】

酵母細胞である、請求項 21 に記載の細胞。

【請求項 23】

前記細胞が植物細胞であり、前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、前記植物細胞において機能的なプロモーターに作動可能に連結している、請求項 21 に記載の細胞。

【請求項 24】

前記核酸分子が前記植物細胞のゲノム内に組み込まれる、請求項 23 に記載の植物細胞。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物材料。

【請求項 26】

前記植物材料が、植物組織または植物部分である、請求項 25 に記載のトランスジェニック植物材料。

【請求項 27】

請求項 23 に記載の植物細胞を含む、植物商品生産物。

【請求項 28】

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むトランスジェニック植物であって、前記ポリヌクレオチドが、

標的ポリヌクレオチドに特異的に結合する DNA 結合ポリペプチドをコードする第一のヌクレオチド配列、および

配列番号 41 ~ 46 および 125 からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のヌクレオチド配列を含み、

前記第一および第二のヌクレオチド配列が前記ポリヌクレオチドからインフレームでおよび単一転写物で発現され、さらに

前記合成転写活性化因子融合タンパク質が、標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結している対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させる、トランスジェニック植物。

【請求項 29】

前記トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 14 である、請求項 28 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 30】

前記標的ポリヌクレオチドが、配列番号 67、配列番号 68 および配列番号 99 からなる群から選択される、請求項 28 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 31】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 84 または配列番号 91 と少なくとも 80% 同一であ

る、請求項 2 8 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 3 2】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 8 4 または配列番号 9 1 と少なくとも 9 0 % 同一である、請求項 2 8 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 3 3】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 8 4 または配列番号 9 1 である、請求項 2 8 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 3 4】

植物細胞において対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させるための方法であって、

前記標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結した対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主植物細胞に、請求項 7 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の核酸分子を導入し、

それによって前記植物細胞において対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させることを含む方法。

【請求項 3 5】

前記核酸分子を植物細胞に導入することが、前記分子を用いて植物細胞を形質転換することを含み、前記分子がベクターである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが植物細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

対象のポリペプチドが、前記植物細胞に対して外来性のポリペプチドである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 8】

対象のポリペプチドが、前記植物細胞に対して内在性のポリペプチドである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記核酸分子を植物細胞に導入することが、前記核酸分子を含む植物を、前記核酸分子を含まない植物と交雑させ、植物細胞を含む子孫植物を生産することを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 0】

植物細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結している対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を請求項 2 3 に記載の植物細胞に導入し、

それによって植物細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

【請求項 4 1】

前記核酸分子を植物細胞に導入することが、前記分子によって前記植物を形質転換することを含み、前記分子がベクターである、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが植物細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結した標的ポリヌクレオチドが、植物細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記核酸分子を植物細胞に導入することが、前記核酸分子を含む植物を前記核酸分子を含まない植物と交雑させて、植物細胞を含む子孫植物を産生することを含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0256

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0256】

gus 発現分析 ハイグロマイシン上で選択されるイベントは、2つのDNA加水分解プローブアッセイを使用してgus 遺伝子転写物レベルについて分析される。個々のイベントごとのgus mRNAの定常状態レベルは、配列特異的プライマーとプローブを使用して評価される。前記mRNAは、内在性タバコ基準遺伝子、例えば、B Y E E FのmRNAの定常状態レベルを使用して正規化される。両遺伝子のアッセイは実施例4に記載されるプロトコルを使用して設計される。リアルタイムPCRデータの解析は、相対定量モジュールを使用するLightCycler (登録商標)ソフトウェアを使用して実施され、Ct法に基づいている。様々な活性化因子構築物の相対的発現レベルが比較される。

本発明は、以下の態様を含む。

[1]

DNA結合ポリペプチド、および配列番号10～58からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む合成転写活性化因子融合タンパク質。

[2]

DNA結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、AVRBS3誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[3]

少なくとも1つの追加のDNA結合ポリペプチドを含む、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[4]

配列番号2～8および配列番号100～120からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[5]

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号10～16、配列番号22、配列番号28、配列番号34、配列番号40、配列番号46、配列番号52、および配列番号58からなる群から選択される、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[6]

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号17、配列番号23、配列番号29、配列番号35、配列番号41、配列番号47、および配列番号53からなる群から選択される、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[7]

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号18、配列番号24、配列番号30、配列番号36、配列番号42、配列番号48、および配列番号54からなる群から選択される、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[8]

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号19、配列番号25、配列番号31、配列番号37、配列番号43、配列番号49、および配列番号55からなる群から選択される、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[9]

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 2 0、配列番号 2 6、配列番号 3 2、配列番号 3 8、配列番号 4 4、配列番号 5 0、および配列番号 5 6 からなる群から選択される、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[1 0]

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号 2 1、配列番号 2 7、配列番号 3 3、配列番号 3 9、配列番号 4 5、配列番号 5 1、および配列番号 5 7 からなる群から選択される、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[1 1]

少なくとも 1 つの追加のトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む、[1]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[1 2]

対象のヌクレオチド配列が第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結している場合、対象のヌクレオチド配列の発現を増加させる合成転写活性化因子融合タンパク質であって、第二のヌクレオチド配列に特異的に結合する DNA 結合ポリペプチド、および配列番号 1 0 ~ 1 6、配列番号 2 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 0、配列番号 4 6、配列番号 5 2、および配列番号 5 8 からなる群から選択されるタンパク質トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む融合タンパク質。

[1 3]

DNA 結合ポリペプチド、および配列番号 1 0 ~ 1 6、配列番号 2 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 0、配列番号 4 6、配列番号 5 2、および配列番号 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む合成転写活性化因子融合タンパク質。

[1 4]

トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号 1 0 ~ 1 6、配列番号 2 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 0、配列番号 4 6、配列番号 5 2、および配列番号 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する、[1 3]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[1 5]

トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号 1 0 ~ 1 6、配列番号 2 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 0、配列番号 4 6、配列番号 5 2、および配列番号 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、[1 3]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[1 6]

トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号 1 0 ~ 1 6、配列番号 2 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 0、配列番号 4 6、配列番号 5 2、および配列番号 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する、[1 3]に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

[1 7]

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、DNA 結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および配列番号 1 0 ~ 5 8 からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。

[1 8]

DNA 結合ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの追加のポリヌクレオチド配列を含む、[1 7]に記載の核酸。

[1 9]

配列番号 1 0 ~ 5 8 からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの追加のポリヌクレオチド配列を含む、[1 7]に記載

載の核酸。

[2 0]

第一および第二のポリヌクレオチド配列が遺伝子調節エレメントに作動可能に連結されている、[1 7] に記載の核酸。

[2 1]

第一および第二のポリヌクレオチド配列が第三のポリヌクレオチド配列により分離されている、[1 7] に記載の核酸。

[2 2]

宿主細胞のゲノムに組み込まれている、[1 7] に記載の核酸。

[2 3]

宿主細胞が植物細胞である、[2 2] に記載の核酸。

[2 4]

DNA 結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーDNA 結合ドメイン、AVRBS3 誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、[1 7] に記載の核酸。

[2 5]

DNA 結合ポリペプチドが、配列番号 6 7、配列番号 6 8、および配列番号 9 9 からなる群から選択される配列に特異的に結合する、[2 4] に記載の核酸。

[2 6]

[1 7] に記載の核酸を含むベクター。

[2 7]

選択可能マーカーまたはスクリーニング可能マーカーを含む、[2 6] に記載のベクター。

[2 8]

植物発現ベクターである、[2 6] に記載のベクター。

[2 9]

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、DNA 結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および配列番号 2 ~ 8、配列番号 1 0 ~ 1 6、配列番号 2 2、配列番号 2 8、配列番号 3 4、配列番号 4 0、配列番号 4 6、配列番号 5 2、配列番号 5 8、および配列番号 1 0 0 ~ 1 2 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。

[3 0]

配列番号 8 0 ~ 9 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、[2 9] に記載の核酸。

[3 1]

配列番号 8 0 ~ 9 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも 8 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、[2 9] に記載の核酸。

[3 2]

配列番号 8 0 ~ 9 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも 9 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、[2 9] に記載の核酸。

[3 3]

配列番号 8 0 ~ 9 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、[2 9] に記載の核酸。

[3 4]

配列番号 8 0 ~ 9 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも 9 7 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、[2 9] に記載の核酸。

[3 5]

配列番号 80 ~ 93 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも 98% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、[29] に記載の核酸。

[36]

配列番号 80 ~ 93 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、[29] に記載の核酸。

[37]

DNA 結合ポリペプチドが、ジンクフィンガー DNA 結合ドメイン、AVRBS3 誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、GAL4、TAL、LexA、Tetリプレッサー、LacR、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、[29] に記載の核酸。

[38]

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、配列番号 80 ~ 93、配列番号 80 ~ 93 のうちの 1 つと実質的に同一であるヌクレオチド配列、配列番号 80 ~ 93 のうちの少なくとも 1 つに特異的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドの相補体、および配列番号 80 ~ 93 のうちの少なくとも 1 つに特異的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドの逆相補体からなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む核酸。

[39]

[17] に記載の核酸を含む細胞。

[40]

植物細胞または酵母細胞である、[39] に記載の細胞。

[41]

[29] に記載の核酸を含む細胞。

[42]

植物細胞または酵母細胞である、[41] に記載の細胞。

[43]

[39] に記載の細胞を含む植物組織、植物部分、植物商品生産物、または植物体全体。

[44]

[41] に記載の細胞を含む植物組織、植物部分、植物商品生産物、または植物体全体。

[45]

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA 結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、[17] に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

[46]

前記核酸を宿主細胞に導入することが、前記核酸を含むベクターを宿主細胞に導入することを含む、[45] に記載の方法。

[47]

前記核酸が宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、[45] に記載の方法。

[48]

対象のヌクレオチド配列が外来性ヌクレオチド配列である、[45] に記載の方法。

[49]

対象のヌクレオチド配列が内在性ヌクレオチド配列である、[45] に記載の方法。

[50]

前記核酸を宿主細胞に導入することが、前記核酸を含む植物を、宿主細胞を含む植物と交雑させることを含む、[45] に記載の方法。

[51]

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、D

NA結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を、[17]に記載の核酸を含む宿主細胞に導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

[52]

対象のヌクレオチド配列を宿主細胞に導入することが、対象のヌクレオチド配列を含むベクターを宿主細胞に導入することを含む、[51]に記載の方法。

[53]

前記核酸が宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、[51]に記載の方法。

[54]

第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列が、宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、[51]に記載の方法。

[55]

対象のヌクレオチド配列を宿主細胞に導入することが、対象のヌクレオチド配列を含む植物を、宿主細胞を含む植物と交雑させることを含む、[51]に記載の方法。

[56]

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、[17]に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

[57]

合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、DNA結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および植物遺伝子発現のトランス活性化のための手段をコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。

[58]

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、[57]に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

[59]

宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、DNA結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を、[57]に記載の核酸を含む宿主細胞に導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。

[60]

配列番号121~127からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフ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。

[61]

[60]に記載の核酸に特異的にハイブリダイズ可能である核酸の相補体。

[62]

[60]に記載の核酸に特異的にハイブリダイズ可能である核酸の逆相補体。

[63]

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが、配列番号22、配列番号28、配列番号34、配列番号40、配列番号46、配列番号52、および配列番号58からなる群から選択される、[60]に記載の核酸。

[64]

配列番号121~127からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含むポリペプチド。

[65]

トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが、配列番号22、配列番号2

8、配列番号34、配列番号40、配列番号46、配列番号52、および配列番号58からなる群から選択される、[64]に記載のポリペプチド。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 0 1 H	1/00	(2006.01)	A 0 1 H	1/00		A
A 0 1 H	5/00	(2006.01)	A 0 1 H	5/00		A
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C 0 7 K	14/00		

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ペトリノ, ジョゼフ

アメリカ合衆国 4 6 0 7 7 インディアナ州, ズィオンスヴィレ, ウッドストック コート 2
7 0

(72)発明者 リ, ジャンクアン

アメリカ合衆国 4 6 0 7 7 インディアナ州, ズィオンスヴィレ, イーグル レイク ドライブ
6 2 0 2

(72)発明者 エバンス, スティーブン, エル.

アメリカ合衆国 4 6 0 7 7 インディアナ州, ズィオンスヴィレ, ロックレス コート 4 6 5
4

(72)発明者 ブルー, ライアン, シー.

アメリカ合衆国 4 6 0 3 7 インディアナ州, フィッシャーズ, グレン アビー レーン 1 0
0 8 0

F ターム(参考) 2B030 CA14

4B064 AG01 CA06 CA11 CA19 CG24 DA11 DA20

4B065 AA01Y AA72X AA88X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA60

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA10 CA40 EA05 EA60

FA74

【外国語明細書】
2017193546000001.pdf