【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成18年1月5日(2006.1.5)

【公表番号】特表2005-500827(P2005-500827A)
【公表日】平成17年1月13日(2005.1.13)
【年通号数】公開・登録公報2005-002
【出願番号】特願2003-500102(P2003-500102)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ａ０１Ｈ　 1/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　39/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　39/395　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　37/02　(2006.01)
Ｃ０７Ｈ　21/00　(2006.01)
Ｃ１２Ｑ　 1/02　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/22　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/27　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/10　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ａ０１Ｈ　 1/00
Ａ６１Ｋ　39/00　Ａ
Ａ６１Ｋ　39/00　Ｈ
Ａ６１Ｋ　39/395
Ａ６１Ｐ　37/02
Ｃ０７Ｈ　21/00
Ｃ１２Ｑ　 1/02
Ａ６１Ｋ　37/02
Ａ６１Ｋ　37/24
Ａ６１Ｋ　37/36
Ｃ１２Ｎ　 5/00　Ｃ
Ｃ１２Ｎ　 5/00　Ｂ

【手続補正書】
【提出日】平成17年5月27日(2005.5.27)
【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】
人工染色体を生産する方法であって:
1または2以上の植物染色体を含む細胞に、核酸を導入する、および
1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む細胞を選択する、
ことを含み、ここで：
1または2以上の核酸ユニットが、リピート領域においてリピートされ、
核酸ユニットのリピートが共通核酸配列を有し、かつ

リピート領域が実質的に等量のユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸を含む、方法。
【請求項２】
人工染色体が卓越的に、1または2以上のリピート領域から作成される、請求項1の方法。
【請求項３】
細胞に導入される核酸が、植物染色体のある領域の増幅を容易化するか、または核酸を植物染色体の増幅可能領域にターゲティングさせる核酸配列を含む、請求項1の方法。
【請求項４】
細胞に導入される核酸が、rDNA、ラムダファージDNAおよびサテライトDNAからなる群より選択される1または2以上の核酸を含む、請求項1の方法。
【請求項５】
核酸が植物rDNAを含む請求項4の方法。
【請求項６】
rDNAが、シロイヌナズナ属植物、タバコ属植物、ナス属植物、トマト属植物、ニンジン属植物、ムギ属植物、トウモロコシ、アブラナ属植物、コムギ属植物およびイネ属植物からなる群より選択される植物からのものである請求項5の方法。
【請求項７】
核酸が動物rDNAを含む請求項4の方法。
【請求項８】
rDNAが哺乳動物rDNAである請求項7の方法。
【請求項９】
核酸が遺伝子間スペーサー領域の配列を含むrDNAを含む、請求項4の方法。
【請求項１０】
遺伝子間スペーサー領域がシロイヌナズナ属植物、ナス属植物、トマト属植物、ムギ属植物、トウモロコシ属植物、イネ属植物、ライムギ、コムギ、ラディッシュおよびマングビーンからなる群より選択される植物からのDNA由来である、請求項9の方法。
【請求項１１】
細胞に導入される核酸が、該核酸を含む細胞の同定を容易化する核酸配列を含む、請求項1の方法。
【請求項１２】
核酸配列が、蛍光タンパク質をコードする請求項11の方法。
【請求項１３】
タンパク質が緑色蛍光タンパク質である、請求項12の方法。
【請求項１４】
人工染色体を含む細胞を選択するステップが、核酸が導入された細胞のソーティングを含む、請求項1の方法。
【請求項１５】
人工染色体を含む細胞を選択するステップが、核酸が導入された細胞の蛍光イン シトゥーハイブリダイゼーション（FISH)分析を含む、請求項1の方法。
【請求項１６】
細胞に含まれる1または2以上の植物染色体が、シロイヌナズナ属植物、タバコおよびヒマワリ属植物染色体からなる群より選択される請求項1の方法。
【請求項１７】
細胞が植物プロトプラストである請求項16の方法。
【請求項１８】
細胞に導入される核酸が選択マーカーをコードする核酸を含む、請求項1の方法。
【請求項１９】
選択マーカーが、ホスヒノスリシン、アンモニウムグルホシネート、グリホサート、カナマイシン、ハイグロマイシン、ジヒドロホレートまたはスルホニルウレアへの抵抗性を付与する、請求項18の方法。

【請求項２０】
1または2以上のリピート領域を含む単離植物人工染色体であって:
1または2以上の核酸ユニットが、リピート領域においてリピートされ、
核酸ユニットのリピートが、共通核酸配列を有し、かつ
リピート領域が、実質的に等量のユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸を含む、人工染色体。
【請求項２１】
人工染色体が卓越的に、1または2以上のリピート領域から作成される、請求項20の植物人工染色体。
【請求項２２】
人工染色体が請求項1または2の方法により生産される、人工染色体を含む植物細胞。
【請求項２３】
請求項20または21の人工染色体を植物細胞内に導入することを含むトランスジェニック植物を生産する方法。
【請求項２４】
人工染色体が遺伝子産物をコードする異種核酸を含む請求項23の方法。
【請求項２５】
異種核酸が酵素、アンチセンスRNA、ｔRNA、rDNA、構造タンパク質、マーカータンパク質、リガンド、レセプター、リボザイム、治療タンパク質および生物医薬タンパク質からなる群より選択される産物をコードしている、請求項24の方法。
【請求項２６】
異種核酸が、ワクチン、血液因子、抗原、ホルモン、サイトカイニン、成長因子および抗体からなる群より選択される産物をコードする請求項24の方法。
【請求項２７】
異種核酸が、植物の病害、昆虫、除草剤、またはストレスへの抵抗性を提供する産物をコードする請求項24の方法。
【請求項２８】
異種核酸が、植物で農業重要形質を提供する産物をコードする請求項24の方法。
【請求項２９】
異種核酸が、栄養利用性を変更し、および/または植物の栄養質を改善する産物をコードする請求項24の方法。
【請求項３０】
異種核酸が細菌人工染色体（BAC)またはコウボ人工染色体（YAC)内に含まれる、請求項24の方法。
【請求項３１】
特定形質をコードする植物遺伝子を同定する方法であって、
植物の第一種からユークロマチン性DNAを含む人工染色体を生成し、
植物の第二種の植物細胞内に人工染色体を導入し、そして
人工染色体を含む植物細胞および/または人工染色体を含む植物細胞から生成した植物での表現型変化を検出する、
ことを含む方法。
【請求項３２】
人工染色体が、植物人工染色体または哺乳動物人工染色体である、請求項31の方法。
【請求項３３】
請求項31の方法であって、人工染色体が、
核酸を、1または2以上の植物染色体を含む細胞内に導入する、および
1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む植物細胞を選択する
ことを含む方法によって生産され、ここで、
核酸ユニットのリピートが、共通核酸配列を有し、かつ
リピート領域が実質的に等量のユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸を含む、

方法。
【請求項３４】
請求項31の方法であって、人工染色体が、
植物細胞内に核酸を導入する、および
SATACを含む植物細胞を選択する
ことを含む方法によって生産される、方法。
【請求項３５】
請求項31の方法であって、人工染色体が、
核酸を植物細胞内に導入する、および
ネオセントロメアおよびユークロマチンを含むミニ染色体を含む細胞を選択する
ことを含む方法によって生産されるミニ染色体である、方法。
【請求項３６】
植物細胞に導入される核酸が、選択マーカーをコードするDNAを含む、請求項33-35のいずれかの方法。
【請求項３７】
選択マーカーが、ホスヒノスリシン、アンモニウムグルホシネート、グリホサート、カナマイシン、ハイグロマイシン、ジヒドロホレート、またはスルホニルウレアに対する抵抗性を付与する請求項36の方法。
【請求項３８】
請求項31の方法であって、第一植物種からのユークロマチン性DNAを含む人工染色体が、
第一種植物の植物細胞内に、第一種植物種のDNAと相同組み換え可能な人工染色体を導入する、
人工染色体と第一植物種のDNAの間の組み換え事象について選択する、および
第一種植物種からのユークロマチン性DNAを含む人工染色体を選択する
ことを含む方法によって生産される、方法。
【請求項３９】
請求項31の方法であって、第一種植物種からのユークロマチン性DNAを含む人工染色体が、
第一種の植物細胞内に、第一種植物種のDNAと部位特異的組み換え可能な人工染色体を導入する、
人工染色体と第一植物種のDNAの間の部位特異的組み換え事象について選択する、および
第一植物種からのユークロマチン性DNAを含む人工染色体を選択する、
ことを含む方法によって生産される、方法。
【請求項４０】
部位特異的組み換え配列を含むように、第一種の植物細胞のDNAを修飾する、請求項39の方法。
【請求項４１】
人工染色体が、部位特異的組み換え配列を含む、請求項39の方法。
【請求項４２】
部位特異的組み換え配列を含むように第一種の植物細胞のDNAを修飾する、かつ人工染色体が部位特異的組み換え配列を含む、請求項39の方法。
【請求項４３】
部位特異的組み換え配列を含むように第一種の植物細胞のDNAを修飾する、かつ人工染色体が、第一植物種の植物細胞の部位特異的組み換え配列に相補的である部位特異的組み換え配列を含む、請求項39の方法。
【請求項４４】
部位特異的組み換えがレコンビナーゼ酵素によって触媒される、請求項39の方法。
【請求項４５】
アクロセントリック植物染色体を生産する方法であって：
部位特異的組み換え部位を含む第一核酸を、植物細胞の第一染色体内に導入する、

部位特異的組み換え部位を含む第二核酸を、植物細胞の第二染色体に導入する、
レコンビナーゼ活性を、植物細胞内に導入し、ここで該活性が第一および第二染色体の間の組み換えを触媒し、それによってアクロセントリック植物染色体が生産される、
ことを含む方法。
【請求項４６】
第一核酸が第一染色体のペリセントリックヘテロクロマチン内に導入される請求項45の方法。
【請求項４７】
第二核酸が、第二染色体のアームの遠位末端内に導入される、請求項45の方法。
【請求項４８】
第一核酸が、第一染色体のペリセントリックヘテロクロマチン内に導入され、かつ第二核酸が、第二染色体のアームの遠位末端内に導入される、請求項45の方法。
【請求項４９】
アクロセントリック植物染色体を生産する方法であって、
部位特異的組み換え部位を含む第一核酸を、植物細胞の染色体のペリセントリックヘテロクロマチン内に導入する、
部位特異的組み換え部位を含む第二核酸を、染色体の遠位末端内に導入し、ここで第一および第二組み換え部位が、染色体の同じアーム上に位置する、
レコンビナーゼ活性を細胞内に導入し、ここで活性が染色体の第一および第二組み換え部位の間の組み換えを触媒し、それによってアクロセントリック植物染色体が生産される、
ことを含む方法。
【請求項５０】
アクロセントリック植物染色体を生産する方法であって、
選択マーカーをコードする核酸に隣接する組み換え部位を含む核酸を、第一植物細胞内に導入する、
第一植物細胞から第一トランスジェニック植物を生成する、
植物細胞で機能性のプロモーターを含む核酸、組み換え部位および作動性連結におけるレコンビナーゼコード領域を、第二植物細胞内に導入する、
第二植物細胞から第二トランスジェニック植物を生成する、
第一および第二植物を交雑する、
選択マーカーをコードする核酸を含む細胞について選択する剤に抵抗性の植物を取得する、および
アクロセントリック植物染色体を含む細胞を含む抵抗性植物を選択する、
ことを含む方法。
【請求項５１】
アクロセントリック染色体の短いアームのDNAが5%より少ないユークロマチン性DNAを含む、請求項45-50いずれかの方法。
【請求項５２】
アクロセントリック染色体の短いアームのDNAが、1%より少ないユークロマチン性DNAを含む、請求項51の方法。
【請求項５３】
アクロセントリック染色体の短いアームがユークロマチン性DNAを含まない、請求項45-50いずれかの方法。
【請求項５４】
染色体内に導入される核酸が、選択マーカーをコードする核酸を含む、請求項45-49いずれかの方法。
【請求項５５】
アクロセントリック染色体の短いアームがユークロマチン性DNAを含まない、アクロセントリック植物人工染色体。
【請求項５６】

植物人工染色体の生産方法であって、
核酸を細胞の植物アクロセントリック染色体内に導入する、ここで該アクロセントリック染色体の短いアームがユークロマチン性DNAを含まない、
細胞を少なくとも1細胞分裂を経由して培養する、および
卓越的にヘテロクロマチン性である人工染色体を含む細胞を選択する、
ことを含む方法。
【請求項５７】
アクロセントリック染色体が、請求項45-49いずれかの方法によって生産される、請求項56の方法。
【請求項５８】
人工染色体を生産する方法であって、
植物細胞内に核酸を導入する、および
1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む植物細胞を選択し、
ここで1または2以上の核酸ユニットが、リピート領域内においてリピートし、
核酸ユニットのリピートが共通核酸配列を有し、かつ
共通核酸配列がユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸を示す配列を含む、
ことを含む方法。
【請求項５９】
核酸が双子葉植物種からの植物rDNAを含む請求項4の方法。
【請求項６０】
核酸が単子葉植物種からの植物rDNAを含む請求項4の方法。
【請求項６１】
遺伝子間スペーサー領域がタバコ属植物由来のDNA由来である請求項9の方法。
【請求項６２】
rDNAが植物rDNAである請求項9の方法。
【請求項６３】
植物が双子葉植物種である請求項62の方法。
【請求項６４】
植物が単子葉植物種である請求項62の方法。
【請求項６５】
細胞が双子葉植物細胞である請求項1の方法。
【請求項６６】
細胞が単子葉植物細胞である請求項1の方法。
【請求項６７】
1または2以上のリピート領域を含む単離植物人工染色体であって、
1または2以上の核酸ユニットが、リピート領域においてリピートされ、
核酸ユニットのリピートが共通核酸配列を有しかつ
共通核酸配列がユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸を示す配列を含む、
染色体。
【請求項６８】
請求項31の方法であって、人工染色体が、
植物細胞内に核酸を導入する、および
1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む植物細胞を選択し、ここで
核酸ユニットのリピートが共通核酸配列を有し、かつ
共通核酸配列がユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸を示す配列を含む、
ことを含む方法によって生産される、方法。
【請求項６９】
請求項44の方法であって、レコンビナーゼが、バクテリオファージP1Creレコンビナーゼ、コウボRレコンビナーゼおよびコウボFLPレコンビナーゼからなる群より選択される、方法。

【請求項７０】
第一および第二トランスジェニック植物を選択することをさらに含む請求項50の方法であって、
植物の一方が、ペリセントリックヘテロクロマチンに隣接する領域において染色体の短いアーム上に位置する組み換え部位を含む染色体を含み、かつ
他方の植物が染色体のrDNAに位置する組み換え部位を含む染色体を含む、方法。
【請求項７１】
2染色体上の組み換え部位が同じ方向におけるものである、請求項70の方法。
【請求項７２】
アクロセントリック植物染色体を生産する方法であって、
2部位特異的組み換え部位を含む核酸を、1または２以上の植物染色体を含む細胞内に導入する、
細胞内にレコンビナーゼ活性を導入する、ここで活性が2組み換え部位の間の組み換えを触媒し、それによって植物アクロセントリック染色体が生産される、
ことを含む方法。
【請求項７３】
2部位特異的組み換え部位が、別個核酸フラグメント上に含まれる、請求項72の方法。
【請求項７４】
別個核酸フラグメントが同時にまたは逐次的に細胞に導入される、請求項73の方法。
【請求項７５】
人工染色体が卓越的に、ヘテロクロマチン性である請求項56の方法。
【請求項７６】
植物人工染色体を生産する方法であって、
核酸を細胞の植物染色体内に導入する、ここで染色体は、rDNAおよびヘテロクロマチン性DNAの隣接領域を含む、
細胞を少なくとも1細胞分裂を経由して培養する、および
人工染色体を含む細胞を選択する、
ことを含む方法。
【請求項７７】
人工染色体が卓越的にヘテロクロマチン性である請求項76の方法。
【請求項７８】
核酸が導入される植物染色体がアクロセントリック染色体である請求項76または77の方法。
【請求項７９】
染色体の短いアームがrDNAおよびヘテロクロマチン性DNAの隣接領域を含む請求項78の方法。
【請求項８０】
ヘテロクロマチン性DNAがペリセントリックヘテロクロマチンである請求項76、77、または79いずれかの方法。
【請求項８１】
ベクターであって、
何れのプロモーターと作動可能に連関されていない選択マーカーをコードする核酸、ここで選択マーカーは動物細胞に通常は毒性の剤の存在下、動物細胞の成長を可能とする、かつここで、剤が植物細胞に毒性でない、
組み換えのための認識部位、および
植物染色体のある領域の増幅を容易化する、またはベクターを植物染色体の増幅可能領域にターゲティングするヌクレオチドの配列
を含むベクター。
【請求項８２】
増幅可能領域がヘテロクロマチン性核酸を含む請求項81のベクター。

【請求項８３】
増幅可能領域がrDNAを含む請求項81のベクター。
【請求項８４】
植物染色体のある領域の増幅を容易化する、またはベクターを植物染色体の増幅可能領域にターゲティングするヌクレオチドの配列が、増幅を容易化またはターゲティングを実施するためのrDNAの遺伝子間スペーサー領域の十分な部分を含む、請求項81のベクター。
【請求項８５】
該十分な部分が、遺伝子間スペーサー領域からの少なくとも14、20、30、50、100、150、300、または500連続ヌクレオチドを含む、請求項84のベクター。
【請求項８６】
選択マーカーがゼオマイシンへの抵抗性を付与する産物をコードする請求項81のベクター。
【請求項８７】
植物形質転換ベクターであって、
組み換えのための認識部位、
植物染色体のある領域の増幅を容易化するか、または植物染色体の増幅可能領域へベクターをターゲティングするヌクレオチドの配列および
植物細胞で発現されるとき細胞の選択を可能とする1または2以上の選択マーカー
を含み、ここで該植物形質転換ベクターは植物のアグロバクテリウム介在形質転換のためのものである、ベクター。
【請求項８８】
認識部位がatt部位を含む請求項81のベクター。
【請求項８９】
ｐAgIIa またはpAgIIbである請求項81のベクター。
【請求項９０】
ベクターであって、
何れのプロモーターに作動可能に連関されていない選択マーカーをコードする核酸、ここで選択マーカーは、動物細胞に通常毒性である剤の存在下、動物細胞の成長を可能とする、かつここで剤が植物細胞に毒性でない、
組み換えのための認識部位および
植物プロモーターに作動可能に連結されたタンパク質をコードする核酸、
を含むベクター。
【請求項９１】
認識部位がatt部位を含む、請求項90のベクター。
【請求項９２】
植物染色体のある領域の増幅を容易化するか、またはベクターを植物染色体の増幅可能領域にターゲティングするヌクレオチドの配列をさらに含む、請求項90のベクター。
【請求項９３】
プロモーターがノパリンシンターゼ（NOS)またはCaMV35Sである請求項90のベクター。
【請求項９４】
pAg1またはpAg2である請求項93のベクター。
【請求項９５】
増幅可能領域がヘテロクロマチン性核酸を含む請求項92のベクター。
【請求項９６】
増幅可能領域がrDNAを含む請求項92のベクター。
【請求項９７】
植物染色体の領域の増幅を容易化するか、または植物染色体の増幅可能領域にベクターをターゲティングするヌクレオチドの配列が、増幅またはターゲティングを実施するためrDNAの遺伝子間スペーサー領域の十分部分を含む、請求項96のベクター。
【請求項９８】

タンパク質が植物細胞に通常毒性である剤の存在下、植物細胞の成長を可能とする選択マーカーである、請求項90のベクター。
【請求項９９】
選択マーカーがハイグロマイシンまたはホスヒノスリシンへの抵抗性を付与する請求項98のベクター。
【請求項１００】
タンパク質が蛍光タンパク質である請求項90のベクター。
【請求項１０１】
蛍光タンパク質が緑色、青色および赤色蛍光タンパク質からなる群より選択される請求項100のベクター。
【請求項１０２】
ベクターであって、
何れのプロモーターと作動可能に連関されていない選択マーカーをコードする核酸、ここで選択マーカーは、植物細胞に通常毒性である剤の存在下植物細胞の成長を可能とする、かつ、ここで、剤が動物細胞に毒性でない、
組み換えのための認識部位、および
植物プロモーターに作動可能に連結されたタンパク質をコードする核酸
を含むベクター。
【請求項１０３】
ベクターであって、
組み換えのための認識部位および
植物染色体のある領域の増幅を容易化するか、または植物染色体の増幅可能領域にベクターをターゲティングするヌクレオチドの配列を含み、ここで植物がシロイヌナズナ属植物、タバコ属植物、ナス属植物、トマト属植物、ニンジン属植物、ムギ属植物、トウモロコシ、アブラナ属植物、コムギ属植物、ヒマワリ属植物、ダイズ属植物、ダイズ、ワタ属植物、ワタ、ヒマワリ属植物、ヒマワリおよびイネ属植物からなる群より選択されるものである、ベクター。
【請求項１０４】
認識部位がatt部位を含む請求項103のベクター。
【請求項１０５】
請求項81-86および88-104のいずれかのベクターを含む細胞。
【請求項１０６】
植物細胞である請求項105の細胞。
【請求項１０７】
細胞内に請求項90のベクターを導入することを含む方法であって、ここで細胞はベクター中の認識部位と、そのためのレコンビナーゼの存在下で組み換える認識部位を含む動物プラットフォームACesを含み、それによって何れのプロモーターと作動可能に連関されていない選択マーカーおよび、植物プロモーターに作動可能に連結されるタンパク質をコードする核酸を、プラットフォームACes内に取り込ませ、得られるプラットフォームACesを生産する、方法。
【請求項１０８】
組み換え部位はatt部位である請求項107の方法。
【請求項１０９】
動物は哺乳動物である請求項107の方法。
【請求項１１０】
プラットフォームACesが、組み換えるとベクターにおいてプロモーターと作動可能に連関されていない選択マーカーに作動可能に連結されるプロモーターを含む請求項107の方法。
【請求項１１１】
請求項107-110いずれかの方法であって、得られたプラットフォームACesを、植物細胞に

移入し、プラットフォームACesを含む植物細胞を生産することをさらに含む方法。
【請求項１１２】
得られたプラットフォームACesが移入に先立ち単離される、請求項111の方法。
【請求項１１３】
請求項111の方法であって、単離ACesがプロトプラストトランスフェクション、脂質介在送達、リポソーム、エレクトロポレーション、ソノポレーション、マイクロインジェクション、パーティクルボンバードメント、シリコンカルバイドウィスカー介在形質転換、ポリエチレングリコール（PEG）介在DNA取り込み、リポフェクションおよび脂質介在キャリアーシステムからなる群より選択される方法によって植物細胞内に導入される方法。
【請求項１１４】
請求項111の方法であって、得られたプラットフォームACesが細胞の融合によって移入される方法。
【請求項１１５】
請求項111の方法であって、細胞が植物プロトプラストである方法。
【請求項１１６】
請求項107の方法であって、該細胞が動物細胞である方法。
【請求項１１７】
請求項116の方法であって、動物細胞が哺乳動物細胞である方法。
【請求項１１８】
請求項111の方法であって、植物プロモーターに作動可能に連結される核酸によってコードされるタンパク質が発現されるような条件下でプラットフォームACesを含む植物細胞を培養することをさらに含む方法。
【請求項１１９】
請求項81のベクターを植物細胞内に導入すること、
植物細胞を培養すること、および
1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む植物細胞を選択する、
ことを含む方法。
【請求項１２０】
ベクターの十分部分が、植物細胞の染色体内に組み込み、染色体DNAの増幅という結果となる、請求項119の方法。
【請求項１２１】
請求項119または120の方法であって、
1または2以上の核酸ユニットが、リピート領域においてリピートされ、
核酸ユニットのリピートが共通核酸配列を有し、および
リピート領域がユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸の実質的等量を含む、方法。
【請求項１２２】
人工染色体を単離することをさらに含む請求項119の方法。
【請求項１２３】
ベクターを細胞内に導入することを含む方法であって、ここで
i)ベクターが：
a)何れのプロモーターと作動可能に連関されていない選択マーカーをコードする核酸、ここで選択マーカーは、動物細胞に通常毒性である剤の存在下で動物細胞の成長を可能とする、かつ該剤が植物細胞に毒性でない、
b)組み換えのための認識部位、および
c)動物プロモーターに作動可能に連結されるタンパク質をコードする核酸を含み
ii)細胞が：
組み換え部位およびベクターにおいてプロモーターと作動可能に連関されていない選択マーカーに組み換えで作動可能に連結される動物プロモーターを含むプラットフォーム植物人工染色体(PAC）を含み、

iii)導入が、ベクターがPACと組み換えられ、プロモーターに作動可能に連結される選択マーカーを含む植物プラットフォームPACを生産するような条件下で実施される、および得られた細胞を、動物プロモーターに作動可能に連結される核酸によってコードされるタンパク質が発現されるような条件下で培養する
ものである方法。
【請求項１２４】
人工染色体がACesである請求項119の方法。
【請求項１２５】
植物プラットフォームPACがACesである請求項123の方法。
【請求項１２６】
細胞に導入される核酸が、選択マーカーをコードする核酸を含む、請求項1の方法。
【請求項１２７】
植物細胞内で発現されると細胞の選択が可能となる1または2以上の選択マーカーをさらに含む請求項81のベクター。
【請求項１２８】
植物人工染色体を生産する方法であって
請求項81、87、または127のベクターを1または2以上の植物染色体を含む細胞に導入することおよび
1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む細胞を選択する、
ことを含み、ここで
1または2以上の核酸ユニットがリピート領域においてリピートされ、
核酸ユニットのリピートが共通核酸配列を有しおよび
共通核酸配列がユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸を示す配列を含む、方法。
【請求項１２９】
植物人工染色体を生産する方法であって
請求項81、87または127のベクターを、1または2以上の植物染色体を含む細胞内に導入すること、および
1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む細胞を選択すること
を含み、ここで
1または2以上の核酸ユニットがリピート領域においてリピートされ
核酸ユニットのリピートが共通核酸配列を有しおよび
リピート領域が実質的に等量のユークロマチン性およびヘテロクロマチン性核酸を含む、方法。
【請求項１３０】
ベクターが導入される細胞が動物細胞である請求項123の方法。
【請求項１３１】
該細胞が哺乳動物細胞である請求項130の方法。
【請求項１３２】
ヘテロクロマチン性DNAがペリセントリックヘテロクロマチンである請求項78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】０００１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００１】
関連出願
優先権の利益を、CARL PEREZ AND STEVEN FABIJANSKIによる米国仮出願番号 60/294,687、出願日2001年5月30日、名称 PLANT ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING PLANT ARTIFICIAL CHROMOSOMESに、およびCARL PEREZ AND STEVEN FA

BIJANSKIによる米国仮出願番号60/296,329、出願日 2001年7月4日、名称 PLANT ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING PLANT ARTIFICIAL CHROMOSOMESに請求する。この出願は、EDWARD PERKINS et alによる米国仮出願番号 60/294,758、出願日2001年5月30日、名称 CHROMOSOME-BASED PLATFORMSにおよびEDWARD PERKINS et al.による米国仮出願番号 60/366,891、出願日2002年3月21日名称CHROMOSOME-BASED PLATFORMSに関する。この出願はまたEDWARD PERKINS et alによる米国仮出願10/161,403、出願日2002年5月30日、名称 CHROMOSOME-BASED PLATFORMSにおよびEDWARD PERKINS et alによる PCT国際特許出願PCT/US02/17452、出願日2002年5月30日、名称CHROMOSOME-BASED PLATFORMSに関する。この出願はGYULA HADLACZKY および ALADAR SZALAYによる米国出願一連番号 08/695,191、出願日1996年8月7日、名称 ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES、いま米国特許番号 6,025,155に関する。この出願はまたGYULA HADLACZKYおよびALADAR SZALAYによる米国出願一連番号 08/682,080、出願日1996年7月15日、名称 ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES、いま米国特許番号6,077,697に関する。この出願はまたGYULA HADLACZKY および ALADAR SZALAYによる米国出願一連番号 08/629,822、出願日 1996年4月10日、名称 ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES (いま放棄された)に関し、そしてまたGYULA HADLACZKYおよびALADAR SZALAYによる共継続米国出願一連番号 09/096,648、出願日1998年6月12日、名称ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMESにおよびGYULA HADLACZKY および ALADAR SZALAYによる米国出願一連番号09/835,682, 1997年4月10日、名称 ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES (いま放棄)。この出願はまたそれぞれGYULA HADLACZKYおよびALADAR SZALAYによる共係属 米国出願一連番号 09/724,726、出願日2000年11月28日、米国出願一連番号 09/724,872、出願日2000年11月28日、米国出願一連番号 09/724,693、出願日 2000年11月28日、米国出願一連番号 09/799,462、出願日2001年3月5日、米国出願一連番号 09/836,911、出願日2001年4月17日、および米国出願一連番号10/125,767、出願日2002年4月17日に関し、そして名称ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMESである。この出願はまた国際PCT出願番号WO97/40183に関する。許容される場合、これらの出願の対象物のそれぞれは引用によりその全体を含める。

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００４】
ほとんどの野生型アグロバクテリウムは、比較的、広い双子葉食物宿主範囲を有し、そして25キロベースまで（例えばノパリン菌株）またはより多い（例えばオクトピン菌株）DNAを移入することのできる。よって、アグロバクテリウムを使用する、DNAを植物細胞に移入する多くの方法は、変更形態の原因となる遺伝子をもはや含まないようにTiプラスミドを改変すること、およびこれらの遺伝子を、所望の形質をコードする組換え体遺伝子で置換することに基づいて開発された。これらの2つの基本型のアグロバクテリウム植物形質転換システム、バイナリー [参照せよ、例えば、米国特許番号 4,940,838] および共取りこみ [参照せよ、例えば、Fraley et al. (1985) Biotechnology 3:629-635]方法。 T-DNAボーダーリピートは、両方のシステムに維持され、天然DNA移入プロセスを使用し、T-DNAボーダーの間に位置するDNAの部分を植物細胞に移入する。

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００６
【補正方法】変更

【補正の内容】
【０００６】
加えて、これらの方法によって生産された遺伝的に修飾された植物細胞は、ゲノムDNAのユークロマチン領域中に移入されるDNAを含む傾向がある。典型的には、多数の独立的トランスジェニック挿入事象は、好適な事象（例えば宿主ゲノムDNA内への遺伝子が挿入され、その結果それが、遺伝子再編成の証拠なく、時間的および位置的予測内の遺伝子発現の充分レベルを提供する）が同定される前にスクリーニングされなければならない。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１０】
発明の要約
ここに、植物人工染色体および植物人工染色体を生産するための方法を提供する。人工染色体は充分に機能的安定性染色体である。ここに提供する植物人工染色体は、それらを植物細胞の異種核酸の安定、制御、高レベル発現のための理想的ベクターとする特定の組成を有する。人工染色体は、細胞内で、独立、特大ゲノム維持、複製および分離が可能であり、そして多重、大異種遺伝子を有し得る。
ここに提供する人工植物染色体は、天然存在染色体からそれらを区別する順序セグメント化を呈する非天然染色体である。セグメント化外観は、種々の染色体分析技法を使用して可視化でき、そして特にこれらの染色体を生産する方法、染色体セグメントの増幅を介して生じることのできる、これらの人工染色体の独特な構造と相関する。セグメント化の領域（複数もある)の、人工染色体は、領域中に反復され（リピート領域として言及する）かつ類似のグロス構造を有する1または2以上の核酸ユニットから卓越的に作成される。核酸ユニットのリピートは、類似のサイズであり、いくつかの共通核酸配列、例えば染色体セグメントの属副に関係する複製部位および/またはいくつかの異種核酸を共有する傾向がある。反復核酸ユニットのサイズは、変化し、典型的には約100kbより大きく、約500kbより大きく、約1Mbより大きく、約10Mbより大きい傾向がある。典型的には、核酸ユニットのリピートは、核酸組成中で実質的に類似であり、そしてほとんど同一であることができる。共通核酸配列は、ユークロマチンかつヘテロクロマチン核酸を示す配列を含むことができる。増幅に基づく人工染色体の組成は、実質的に完全染色体がセグメント化外観を呈し、または完全染色体より小さく作成される1または2以上のみの部分がセグメント化してみえるようであることができる。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１１】
ここに提供する植物人工染色体の組成は、変化し得る。例えば、ここに提供するいくつかの人工的染色体では、リピート領域は、ヘテロクロマチンDNAから卓越的に作成することができる（すなわちリピート領域は、他の型のDNA例えばユークロマチンよりもより多いヘテロクロマチンDNAを含む）。ここに提供する他の人工染色体では、リピート領域は卓越的に、ユークロマチンDNAから作成することができ（すなわちリピート領域は、他の型のDNA、例えばヘテロクロマチンDNAよりもより多いユークロマチンDNAを含む）、またはヘテロクロマチンおよびユークロマチンDNA、例えば約50%ないし約60%の他の型の核酸および約50%ないし60%の他の型の核酸ヘテロクロマチンおよびユークロマチンDNAの実質的に均等で作成することができる。リピート領域は、こうして、完全にヘテロクロマチン製であることができ（一方なお1または2以上の異種遺伝子を含む）、または例えば領域が

約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または90%より大きいユークロマチンDNAを含む領域のようなユークロマチンDNAの増加量を含むことができる。リピート領域のリピート核酸ユニット内の共通核酸配列は、ユークロマチン核酸を示すDNAおよびヘテロクロマチン核酸を示すDNAを含むことができる。完全人工染色体がリピート領域から卓越的に作成できるから（例えば染色体の組成は、リピート領域が、染色体の約50%より大きい、または60%より大きいように作成する）、それはこうして、ヘテロクロマチンまたはユークロマチンの卓越するように作成されるべき、または例えば他の型の核酸の約40%ないし約50%、および他の型の核酸の約50%ないし約60%のヘテロクロマチンおよびユークロマチンの実質的に等量な量から作成されるべき、人工染色体が可能である。ここに提供する植物人工染色体は、単離され、細胞または小胞内に含まれることができる。リピート領域中のリピート核酸ユニット内の共通核酸配列はユークロマチン核酸を示すDNAおよびヘテロクロマチンを示すDNAを含むことができる。完全人工染色体は、反復領域に卓越的に作成でき（例えば染色体の組成は、約50%より大きい、または染色体の約60%より大きいリピート領域である）、それはこうして、ヘテロクロマチンまたはユークロマチンの卓越的に作成すべき、または例えば他の型の核酸の約50%ないし60%のヘテロクロマチンおよびユークロマチンの実質的に等量な量で作成されるべき、人工染色体について可能である。ここに提供する植物人工染色体は、単離し、細胞または小胞内に含むことができる。

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１２】
またここに、植物細胞および動物細胞を含む、ここに記載の植物人工染色体を含む細胞を提供する。植物人工染色体を含む細胞中に含まれるのは、1または2以上の植物染色体を含む任意の細胞である。たとえば、植物組織、器官、種子、花粉または全植物体内の、培養における、植物プロトプラスト、を含む植物細胞が含まれる。植物人工染色体を含む植物細胞は、単子葉および双子葉を含む、任意の型の植物からであることができる。例えば、植物細胞は、シロイヌナズナ属植物(Arabidopsis)、タバコ属植物(Nicotiana)、ナス属植物(Solanum)、トマト属植物(Lycopersicon)、ニンジン属植物(Daucus)、ムギ属植物(Hordeum)、トウモロコシ(Zea mays)、アブラナ属植物(Brassica)、コムギ属植物(Triticum)、ヒマワリ属植物(Helianthus)、イネ属植物(Oryza)、ダイズ属植物(Glycine)(ダイズ)、ワタ属植物(gossypium)(ワタ)由来であることができる。また植物ACを含む哺乳動物および他の動物細胞を企図する。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１７】
ここに提供する植物人工染色体を生産する方法のさらなる実施態様において、1または2以上の植物染色体を含む細胞内に導入される核酸は、核酸を含む細胞の同定のための核酸を含む。そのような核酸は、蛍光タンパク質、例えば緑色、青色または赤色蛍光タンパク質をコードする核酸、および選択マーカー例えばフォスフィノスリシン、アンモニウムグルホシネート、グリホサート、カナマイシン、ハイグロマイシン、ジヒドロフォレートまたはスルフォニルウレアへの抵抗性を付与するタンパク質をコードする核酸を含む。

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２０
【補正方法】変更

【補正の内容】
【００２０】
人工染色体のリピート領域は、トランスジェニック植物を生産する方法で使用でき、これはヘテロクロマチンおよびユークロマチンＤＮＡの実質的に均等な量で作成でき、またはユークロマチンＤＮＡの卓越的に作成できる。人工染色体は、ヘテロクロマチンまたはユークロマチンＤＮＡの卓越的に作成でき、またはヘテロクロマチンおよびユークロマチンの実質的に均等量で作成できる。そのような人工染色体であって、植物染色体を含むものは、単子葉および双子葉を含む任意の種の植物からの植物染色体を含むことができる。例えば、シロイヌナズナ属植物(Arabidopsis)、タバコ属植物、ヒマワリ属植物(Helianthus)、ナス属植物(Solanum)、トマト属植物(Lycopersicon)、ニンジン属植物(Daucus)、ムギ属植物(Hordeum)、トウモロコシ属植物(Zea)、アブラナ属植物(Brassica)、コムギ属植物(Triticum)、ライムギ、コムギ、ラディッシュ、マングビーンまたはイネ属植物(Oryza)からであることができる。人工染色体は、ここに記載の方法を使用して作成できる。
【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２２】
そのような人工染色体が、ここに提供するトランスジェニック植物の生産方法で導入できる植物細胞は、限定しないがArabidopsis、タバコ、ヒマワリ属植物、ナス属植物、トマト属植物、ニンジン属植物、ムギ属植物、トウモロコシ属植物(Zea)、アブラナ属植物、コムギ属植物、ライムギ、コムギ、ラディッシュ、マングビーン、 Capsicum、lentilおよびイネ属植物を含む植物細胞の任意の種であることができる。植物細胞、および植物胚、カルス、組織、茎頂、器官、種子、実生、花粉、花粉管または全植物体を含む、使用される植物に発達できる任意の細胞は、使用できる。
【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２３】
人工染色体は、限定しないが、化学的、物理的および電気的方法およびその組み合わせを含む、植物細胞内に核酸を移入するための任意の方法を使用してトランスジェニック植物を生産する方法で植物細胞内に導入できる。例えば、人工染色体は、フソゲン、例えばポリエチレングリコール(PEG)、燐酸カルシウムおよび/または脂質の不存在または存在下で直接接触によって植物細胞内に移入でき、またはこれらは、脂質構造(例えばリポソーム）に、含ませ、またはプロトプラストまたはミクロセルに含ませ、ついでトランスジェニック植物の生産方法における、人工染色体の、細胞内への導入のための植物細胞と融合を可能とする（フソゲン例えばPEGの存在または不存在下で）。人工染色体を、人工染色体への細胞の暴露の前、中および/または後に、電気的パルス（例えばエレクトロポレーション）および/または超音波（例えばソノポレーション）の対象の植物細胞に移入することができる。電気的パルスおよび/または超音波の子葉は、任意の他の剤、例えばPEGおよび/または脂質と組み合わせることができ、植物細胞内に核酸を移入するとき使用する。人工染色体はまた、マイクロピペットまたはニードルによって植物細胞内に物理的にインジェクトすることができ、または染色体で被覆したマイクロプロジェクタイルで細胞のボンバードメントによって植物細胞内に導入する。植物細胞内への核酸の移入を容易化するために、レシピエント細胞または組織を、機械的傷つけの対象とできる。
【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】００２８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２８】
アクロセントリック植物染色体を生産する方法の別の実施態様は、植物染色体のペリセントリック異種染色質内に部位特異的組み換え部位を含む第一核酸を導入する、第一および第二組み換え部位が染色体の同じアーム上に位置する染色体の遠位末端内に部位特異的組み換え部位を含む第二核酸を導入する、染色体の第一および第二組み換え部位の核酸を組み換える、およびアクロセントリックである植物染色体を選択する工程を含む。
【手続補正１３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３０】
アクロセントリック植物染色体を生産する方法では、１または両方のこれらの組み換え部位は、染色体の短アーム上に位置する。例えば、植物のひとつは、染色体の短アーム上に位置するペリセントリックヘテロクロマチン内にまたは隣接する組み換え部位を含む染色体を含む。選択工程は、第一および第二トランスジェニック植物を選択することをさらに含み、その結果２染色体の上の組み換え部位は、同じ配向である。
【手続補正１４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３２】
当業者に既知の任意の部位特異的レコンビナーゼ系を、ここでの使用のため企図する。レコンビナーゼによる組み換えを指示する１または複数の部位を、そのACesに（または他のＡＣｓ）内に導入し、次いでコグネート部位に連結された異種遺伝子を、プラットフォームACesを生産する。得られたACesを、典型的にはベクター上で、コグネートレコンビナーゼをコードする核酸、およびACes染色体内への挿入のための適当な組み換え部位に連結された所望の異種核酸をコードする核酸と、導入する。核酸をコードするレコンビナーゼを、ACesを含むAC内に、または異種核酸からの同じまたは違うベクター上に導入する。
【手続補正１５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３３】
ここでの方法のために、部位特異的組み換えを触媒する任意のレコンビナーゼ酵素を使用し、第一および第二部位特異的組み換え部位の間の組み換えを容易化することができる。種々のレコンビナーゼおよびそのための付着/組み換え部位は、当業者に利用可能および/または既知である。これらは限定しないが：Escherichia coliファージP1からのCREレコンビナーゼを使用するCre//Iox組み換え系、Saccharomyces cerevisiaeの２μエピソームからのFLPレコンビナーゼを使用するコウボのFLP/FRT系、ファージMu、Cin、Gin、Hin、αδTn3のGinレコンビナーゼを含むレソルヴァーセ；E. coliのPinレコンビナーゼ、Kluyveromyces drosophilariumおよびKluyveromyces waltiiからのZygosaccharomyces rouxiiのｐSR1プラスミドのR/RS系、および他の系を含む。またファージラムダインテグラーゼおよびコグネートatt部位を含むE.coliファージラムダインテグラーゼ系を企図する（また共係属出願米国出願番号10/161,403参照）。

【手続補正１６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３４】
アクロセントリック植物染色体を生産するこれらの方法のいずれかにおいて、部位特異的組み換え部位を含む核酸はまた、選択マーカーをコードする核酸を含むことができる。該方法使用される核酸は、選択マーカーの発現が所望の組み換え事象のときのみに起こるように設計できる。
ここに提供する方法によって生産されるアクロセントリック植物染色体は、任意の組成であることができる。例えば、アクロセントリック染色体の短アームのDNAは、5%より少ないまたは1%より少ないユークロマチンDNAを含むことができ、またはユークロマチンDNAを含まないことができる。アクロセントリック染色体の短アームがユークロマチンDNAを含まないアクロセントリック植物人工染色体を提供する。
【手続補正１７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３７】
1または2以上のリピート領域を含む単離植物人工染色体を提供する。これらのACsでは、1または2以上の核酸ユニットを、リピート領域中にリピートする；核酸ユニットのリピートは、共通核酸配列を有する；およびヌクレオチドの共通配列は、ユークロマチンおよびヘテロクロマチン性核酸を示す配列を含む。人工染色体は、核酸を植物細胞内に導入する；および1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む植物細胞を選択する、工程を含む方法によって生産できる。核酸ユニットのリピートは、共通核酸配列を有する；および共通核酸配列は、ユークロマチンおよびヘテロクロマチン性核酸を示す配列を含む。
【手続補正１８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４０】
また、種々のベクターを提供する。これらには、任意のプロモーターと連関していない選択可能マーカーをコードする核酸を含むベクターがあり、ここで該選択可能マーカーは、動物細胞に通常は毒性である剤の存在下、動物細胞の成長を可能とする；かつここで該剤は、植物細胞に毒性でない；組み換えのための認識部位；および植物染色体の領域の増幅を容易化する、または植物染色体の増幅可能領域へベクターをターゲティング化するヌクレオチドの配列である。そのようなベクターの例は、pAgllaおよびpAgllbである。
【手続補正１９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４５】
これらのベクターにおいて、増幅可能領域は、ヘテロクロマチン性核酸を含むことができる；増幅可能領域はrDNAを含むことができる。植物染色体の領域の増幅を容易化する、または植物染色体の増幅可能領域にベクターをターゲティング化するヌクレオチドの例示

的配列は、増幅を容易化するまたはターゲティングを実施化するrDNAの遺伝子間スペーサー領域の十分な部分を含む任意のものである。そのような十分部分は、遺伝子間スペーサー領域および/または他のrDNA領域からの、少なくとも14、20、30、50、100、150、300、500、1 kB、2 kB、3 kB、5 kB、10 kBまたはより多い連続ヌクレオチドであることができる。例示的選択可能マーカーは、ゼオマイシン（zeomycin）への抵抗性を付与する産物をコードする。ベクター中のタンパク質は、植物細胞に通常は毒性である剤、例えばハイグロマイシンまたはホスヒノスリシンへの抵抗性の存在下植物細胞の成長を可能と選択マーカーであるタンパク質を含む。他のそのようなタンパク質は、限定しないが、蛍光タンパク質、例えば緑色、青色、赤色蛍光タンパク質を含む。例示的認識部位は、att部位を含む。包含のための例示的プロモーター は、限定しないが、ノパリンシンターゼ(NOS)またはCaMV35Sを含む。

【手続補正２０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４７】

これらのベクターを使用する方法を提供する。方法は、いずれかのベクターを細胞、例えば少なくとも1植物染色体を含む細胞内への導入の工程を含む。そのようなベクターは、例えば、任意のプロモーターに作動可能に連関されてない選択可能マーカーをコードする核酸を含むベクターであり、ここで該選択可能マーカーは、動物細胞に通常は毒性であるが、植物細胞に毒性でない剤の存在下動物細胞の成長を可能とする；組み換えのための認識部位；および植物プロモーターに作動可能に連結されたタンパク質をコードする核酸。この方法では、細胞は動物、例えば哺乳動物、レコンビナーゼの存在下ベクター中の組み換え部位と組みかえ、それによって任意のプロモーターと作動可能に連関されていない選択可能マーカーおよび植物プロモーターに作動可能に連結されたタンパク質をコードする核酸を、プラットフォームACes内に取り込ませ、得られたプラットフォームACesを生産する。プラットフォームACesは、組み換えると、ベクターでは作動可能にプロモーターと連関されていない、選択可能マーカーに作動可能に連結されるプロモーターを含むことができる。方法はさらに、得られたプラットフォームACesを、植物細胞内に移入することをさらに含むことができ、プラットフォームAcesを含む植物細胞を生産する。方法は所望によりさらに、植物プロモーターに作動可能に連結される核酸によってコードされたタンパク質が発現されるような条件下でプラットフォームAcesを含む植物細胞を培養することを含む。

【手続補正２１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４９】

さらなる方法では、ベクターを植物細胞内に導入する。そのようなベクターは例えば、任意のプロモーターと作動可能に連結されていない選択可能マーカーをコードする核酸を含むベクターであることができ、ここで該選択可能マーカーは、動物細胞に通常毒性であるが、植物細胞に毒性でない剤の存在下動物細胞の成長を可能とする；組み換えのための組み換え部位；および植物染色体の領域の増殖を容易化する、または植物染色体の増幅可能領域へベクターをターゲティング化するヌクレオチドの配列。植物細胞を培養し、そして1または2以上のリピート領域を含む人工染色体を含む植物細胞を選択する。この方法では、ベクターの十分部分を、植物細胞の染色体内に組み込み、染色体DNAの増幅という結果となる。得られた選択された人工染色体を1または2以上の核酸ユニットがリピート領域においてリピートされるものであることができる；核酸ユニットのリピート領域は、共通

核酸配列を有する；およびリピート領域は、ユークロマチンおよびヘテロクロマチン性核酸の実質的に均等な量を含む。方法で生産した得られた人工染色体は、所望により単離できる。

【手続補正２２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５８】
ここで使用するように、人工染色体は、核酸分子であって、典型的にはDNAであって、細胞の内生染色体に沿って安定的に複製および分離する、そしてそこに含まれる異種遺伝子を適応させおよび発現する能力を有する。哺乳動物人工染色体（MAC）は、活性哺乳動物セントロメアを有する染色体をいう。植物人工染色体（PAC)、昆虫人工染色体および鳥類人工染色体は、それぞれ植物、昆虫および鳥類細胞で機能するセントロメアを含む染色体をいう。ヒト人工染色体(HAC)は、ヒト細胞で機能するセントロメアを含む染色体をいう。例示的人工染色体のために、例えば、米国特許番号 6,025,155; 6,077,697; 5,288,625; 5,712,134; 5,695,967; 5,869,294; 5,891,691 および 5,721,118 および 公開国際PCT出願番号 WO 97/40183 および WO 98/08964参照。

【手続補正２３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６０】
ここで使用するように、増幅に基づく人工染色体は、例えば異種核酸の、ヘテロクロマチン、例えば染色体のペリセントリックヘテロクロマチン内への導入によって開始し得るような増幅事象によって開始し得るものによって天然または内生染色体に由来する人工染色体である。そのような事象の結果として、セグメント化またはリピートパターンを呈する染色体および/またはそのフラグメントが生じる。ゆえに、増幅に基づく人工染色体は、非天然または単離染色体であって天然存在染色体中に典型的には観察されない整列されたセグメント化を呈する、および天然に存在する染色体から区別する基礎でありうるものをいう。増幅に基づく人工染色体はまた、可視化されるとき、それらの典型的により小さいサイズおよびしばしばセグメント化外観によって天然に存在する染色体から区別できる。セグメント化外観は、ここに記載の種々の染色体分析技法および当業界既知方法を使用して可視化でき、これらの人口染色体の独特な構造と相関する。1または2以上のセントロメアを含むことに加えて、増幅に基づく人工染色体は、セグメント化の領域に渡り、卓越的に、1または2以上の核酸ユニットから作成され、また''アンプリコン''として言及され、それは領域においてリピートされおよび類似のグロス構造を有する。こうして、セグメント化の領域は、リピート領域として言及し得る。アンプリコンのリピートは、類似のサイズでおよびいくつかの共通核酸配列を共有し得る。例えば、アンプリコンのそれぞれのリピートは、染色体セグメントの増幅および/または人工染色体の当初生産で利用したいくつかの異種核酸に関係する複製部位を含みうる。典型的には、リピーティングユニットは、実質的に核酸組成で類似であえり、そしてほとんど同一でありうる。共通核酸配列は、ユークロマチンおよびヘテロクロマチン性核酸を示す配列を含みうる。アンプリコンサイズは、変化するが、典型的には約100kbより大きい、約500kbより大きい、約1Mbより大きい約5Mbより大きいまたは約10Mbより大きい傾向がある。増幅に基づく人工染色体の組成は、実質的に完全な染色体がセグメント化外観を停止、または完全染色体より小さく作成された1または2以上の部分のみがセグメント化されたようにみえるようなものであり得る。増幅に基づく人工染色体はまた、人工染色体形成の過程の増幅を経験した染色体領域に依存して異なることができる。得られた染色体の構造は、内生染色体への修飾を含む、

異種核酸が導入される開始事象および/または条件に依存して変化できる。例えば、ここに提供する人工染色体のいくつかにおいて、セグメント化の領域は卓越的に、ヘテロクロマチン性DNAから作成し得る。ここに提供する他の人工染色体において、セグメント化の領域は、卓越的にユークロマチン性DNAから作成し得、またはヘテロクロマチンおよびユークロマチン性DNAの類似の量から作成し得る。ここに提供する他の人工染色体では、セグメント化の領域は、卓越的にユークロマチン性DNAから作成し得、または類似の量のヘテロクロマチン性およびユークロマチン性DNAから作成し得る。セグメント化の領域はこうして、完全にヘテロクロマチン性であり得（一方なお1または2以上異種核酸配列を含む）、またはユークロマチンの増加の量を含み、その結果例えば領域は約10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90% または 90% より多いユークロマチン性 DNAを含む。完全人工染色体は、セグメント化の領域から卓越的に作成し得るから、こうして、人工染色体のためにヘテロクロマチンまたはユークロマチンから卓越的に作成し得、またはヘテロクロマチンおよびユークロマチンの実質的に均等量、例えば核酸の他の型の 約40% ないし約50%の核酸の1の型および約50%ないし約60%から作成すべきである。

【手続補正２４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６２】

ここで使用するように、アンプリコンはリピート性核酸ユニットである。ここに記載の人工染色体のいくつかにおいて、アンプリコンは、メガレプリコンの逆転リピートのセットを含みうる。メガレプリコンは、より高度のオーダーの複製ユニットを示す。例えば、卓越的にヘテロクロマチン性の人工染色体、特にここに記載の真核染色体のいくつかを参照して、メガレプリコンは、タンデムDNAブロックのセット（例えば～７．５Mb DNA ブロック）であってそれぞれが非サテライトDNAによってフランキングされるサテライトDNAを含み、または実質的にrDNAから作成し得る。メガレプリコン内に含まれるのは、一次的複製部位であり、メガレプリケーターとして言及され、これは例えばヘテロクロマチン、ペリセントリックヘテロクロマチン、ｒDNMおよび/またはおそらくセントロメアを含む、染色体のセグメントの複製を構成および容易化することに関係し得る、メガレプリケーターとして言及する。メガレプリコン内には、より小さい(例えば50-300kb）二次レプリコンでありうる。ここに使用するように、増幅可能は、染色体に言及して使用するとき、特にここに提供する人工染色体を生成する方法は、増幅しがちの染色体の領域に言及する。増幅は典型的に、複製中、そして組み換えに関係する他の細胞事象が発生する（例えばDNA修復）。そのような領域に含まれるのは、タンデムリピートを含む染色体の領域例えばサテライトDNA、rDNAおよび他のそのような配列である。

【手続補正２５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６３】

ここに提供する人工染色体系には、卓越的にヘテロクロマチン性であるもの [サテライト人工染色体として以前言及された (SATACs); 参照せよ、例えば、米国特許番号 6,077,697 および 6,025,155 および 公開 国際PCT出願番号 WO 97/40183],ミニ染色体（ mini chromosomes）であってde novoセントロメアを含むもの、リピーティング核酸ユニットの1または2以上の領域を含む人工染色体（ここで該リピート領域はユークロマチンおよびヘテロクロマチン性核酸の実質的に均等量を含む）、およびインビトロアセンブル人工染色体である。ここで特に興味深いのは、植物で異種核酸を導入および発現する人工染色体である。これらは植物から由来するセントロメアを有する人工染色体、およびまた、他の生

物に由来するが植物で機能し得るセントロメアを有する人工染色体を含む。それぞれの型の人工染色体の、構築、単離および標的細胞への送達は、ここに提供する。
【手続補正２６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７０】
細胞内に核酸を導入した後、卓越的にヘテロクロマチン性人工染色体を含む細胞を選択する。そのような細胞は、種々の手法を使用して同定し得る。例えば、これらの染色体のヘテロクロマチン性DNAのリピーティングユニットは、Gおよび/またはCバンディングおよび/またはイン シトゥー(in situ)ハイブリダイゼーション(FISH)技法での蛍光によって確認し得る。そのような分析に先立ち、分析すべき細胞を、選択可能マーカー、例えばレポータータンパク質の存在に基づいて細胞をソートすることによって、または選択性条件下で細胞を成長（培養）することによって、人工染色体を含む細胞で富化する。増幅された核酸を含む細胞の選択はまた、PCRおよびサザンブロッティングのような技法の使用によって容易化し得、増幅された領域で細胞系を同定する。また細胞内への核酸の導入後、マルチセントリック、典型的にはジセントリックの染色体、以前マルチセントリック（典型的にジセントリック)染色体および/または種々のヘテロクロマチン性構造を選択し、および所望のヘテロクロマチン性構造を生産することが可能である。所望の構造の生成のための条件は、限定しないが、選択性条件下のさらなる成長、追加的核酸分子の導入および/または選択性条件下の成長および脱安定化剤での処理および他のそのような方法（ 国際PCT出願番号 WO 97/40183 および 米国特許番号 6,025,155 および 6,077,697参照)を含む.
【手続補正２７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７２】
ここで使用するように、''選択可能マーカー'' は、他の細胞からある細胞を区別するため使用できる組成である。例えば、選択可能マーカーは、その他でないいくつかの細胞内に導入された容易に検出されるタンパク質をコードする核酸でありうる。発現されたタンパク質の、細胞内の検出は、核酸を含まない細胞からそれらを区別することによってマーカー核酸を含む細胞の同定を容易化する。こうして例えば、選択可能マーカーは蛍光タンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)、またはβガラクトシダーゼ（またはこれらのタンパク質のいずれかをコードする核酸）でありうる。選択可能マーカー例えばこれらは、選択剤の存在下生存および/または増殖のため要求されず、またレポータータンパク質として言及し得る。他の選択可能マーカー、例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子は、剤、例えば抗生物質のような薬物であて、マーカーを含まない細胞の増殖を阻害するものへ抵抗性にそれらをする細胞上の特性を付与することによって、これらを含む細胞の単離および同定を提供する。
【手続補正２８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７４】
所望の特定の異種核酸を含む人工染色体を生成するため、人工染色体の生産を開始するため細胞内に導入される核酸中の所望の核酸を含むことが可能である。こうして、例えば

、所望の核酸は、選択可能マーカーをコードする核酸および/または染色体のヘテロクロマチン性領域へターゲティングする核酸といっしょに細胞内に導入し得る。例えば、所望の核酸は、ターゲティング核酸に連結し得る。代替的に、所望の異種核酸を、人工染色体の当初生成後のより遅いときに人工染色体内に導入できる。

【手続補正２９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８１】
attBと命名された組み換え部位は、2つの9塩基対コアタイプInt結合部位および7塩基対オーバーラップ領域を含む近似的に33塩基対配列である；attP（配列番号48)は、コアタイプInt結合部位およびアームタイプInt結合部位ならびに付属タンパク質IHF、FIS、およびXisのための部位を含む近似的に240塩基対配列である（例えば、Landy (1993) Current Opinion in Biotechnology 3:699-707、例えば、配列番号 32 および 48参照)。

【手続補正３０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８８】
このDNAセグメントの相互交換は、もしDNA分子の1または両方が環状であるならば、組み込み事象という結果となることができる。DNAセグメントは、一本または二本鎖デオキシリボ核酸（DNA)をいい、それは任意の源から由来し得る。lox部位は、非対称ヌクレオチド配列であるから、同じDNA分子上の2つのlox部位は、互いについて同じまたは反対方向を有することができる。同じ方向のlox部位間の組み換えは、2つのlox部位の間に位置するDNAセグメントの欠失、およびもとのDNA分子の得られた末端間の接続という結果となる。欠失したDNAセグメントは、DNAの環状分子を形成する。もとのDNA分子および得られた環状分子それぞれは、単一lox部位を含む。同じDNA分子上の反対方向のlox部位間の組み換えは、2つのlox部位間に位置するDNAセグメントのヌクレオチド配列の逆転という結果となる。加えて、2つの異なるDNA分子上に位置するlox部位に近いDNAセグメントの相互交換が発生できる。これらの組み換え事象のすべては、cre遺伝子の遺伝子産物によって触媒される。こうして、Cre-loxシステムを使用し、DNAを特異的に欠失、逆転、または挿入できる。正確な事象は、loxDNA配列の方向によって制御され、シスでは、lox配列はCreレコンビナーゼを、配列によってフランキングされるDNAを欠失（直接方向のlox配列）または逆転（反対方向のlox配列）に方向づけ、一方トランスではlox配列は、相同組み換え事象を方向づけ、組み換え体DNAの挿入という結果となる。

【手続補正３１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８９】
ここで使用するように、植物は、植物界にあるとして分類学的に分類される生物を言う。そのような生物は真核生物を含み、それは光合成を実施できる葉緑体を含む。植物は、単細胞または多細胞であることができそして、多重組織および/または器官を含みうる。植物は有性的および/または無性的に複製し得、そして習性において多年または一年生である。植物は、陸生または水生環境を含む種々の生息地で存在すると見出すことができる。用語''植物''は、前植物体、植物細胞、植物プロトプラスト、植物カルス、植物種子、植物器官、植物組織およびその他の前植物体の一部を含みうる。

【手続補正３２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９０】
ここで使用するように、植物に言及しての再生様式は、植物が後代を生産する任意またはすべての方法を言及する。再生様式は限定しないが、有性および無性生殖を含む、植物は、1または多重の再生様式によって後代を生産し得る。有性生殖は、ハプロタイプ配偶体に由来する細胞のユニオンを含むことができ（例えば種子植物での胚珠から生産される卵、および花粉から生産される精子）、二倍体胞子体を形成する。胞子体は、異なる植物からまたは同じ植物の配偶体から形成し得る（例えば自家受精によって）。無性生殖は、減数分裂および合体を含まない性的生活周期の修飾によって生産されるとき、起こることができる。例えば、繊管束植物が無性的に生殖するとき、これらは栄養生殖、例えば芽形成、分枝および分けつによって、またはそれらを生産した胞子体に遺伝的に同一な胞子または種子を生産することによってなし得る。
【手続補正３３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９５】
ここで使用するように、形質転換およびトランスフェクションは、細胞内に核酸を導入するプロセスを相互交換可能に言及する。用語トランスフェクションおよび形質転換は、任意のコード配列が実際に発現されるか否かにかかわらず、宿主によって、外生核酸、例えば発現ベクターから取り上げること（taking up）を意味する。細胞内に核酸を導入する多くの方法が、当業者に既知であり、例えば、アグロバクテリウム介在形質転換、プロトプラスト毛形質転換（ポリエチレングリコール（PEG)介在形質転換、エレクトロポレーション、プロトプラスト融合、およびミクロセル融合を含む）、脂質介在送達、リポソーム、エレクトロポレーション、パーティクルボンバードメント、およびシリコンカルバジドウィスカー介在形質転換（silicon carbide whisker-mediated transformation）（例えば Paszkowski et al. (1984) EMBO J. 3:2717-2722; Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:169-177; Reich et al. (1986) Biotechnology 4:1001-1004; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73; 米国特許番号 6,143,949; Paszkowski et al. (1989) in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J and Vasil, L.K. Academic Publishers, San Diego, California, p. 52-68; および Frame et al. (1994) Plant J. 6:941-948参照)、燐酸カルシウムを使用する直接取り込み [$CaPO_4$;、例えば、Wigler et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:1373-1376参照]、ポリエチレングリコール [PEG]-介在DNA取り込み、リポフェクチン [例えば、Strauss (1996) Meth. Mol. Biol. 54:307-327参照], ミクロセル融合 [Lambert (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:5907-5911; 米国特許番号 5,396,767, Sawford et al. (1987) Somatic Cell Mol. Genet. 13:279-284; Dhar et al. (1984) Somatic Cell Mol. Genet. 10:547-559; および McNeill-Killary et al. (1995) Meth. Enzymol. 254:133-152参照]、脂質-介在キャリアーシステム [例えば、Teifel et al. (1995) Biotechniques 19:79-80; Albrecht et al. (1996) Ann. Hematol. 72:73-79; Holmen et al. (1995) In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 31:347-351; Remy et al. (1994) Bioconjug. Chem. 5:647-654; Le Bolch et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36:6681-6684; Loeffler et al. (1993) Meth. Enzymol. 217:599-618参照]または他の好適な方法による。首尾よいトランスフェクションは、一般にトランスフェクト性細胞内の異種核酸の存在の検出例えば異種核酸の任意の可視化または宿主細胞内のベクタ

ーの操作の任意の指摘によって認識される。
【手続補正３４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９６】
ここで使用するように、インジェクトは、細胞内への核酸の（小さいシリンジ、ニードルまたはピペットの使用）マイクロインジェクションを意味する 。
ここで使用するように、遺伝子治療は、ある種の細胞内への核酸の移入または挿入に関係し、これはまた、標的細胞として言及し、疾患、障害、及び／または悪変条件を予防、治療、訂正、制御または調節することに関係する産物を生産する。
【手続補正３５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０３】
ここで使用するように、発現は、核酸の転写及び／または翻訳を言及する。例えば、RNA分子、例えばメッセンジャーRNA(mRNA)分子内への遺伝子の転写であることができる。発現はさらに、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質内へのRNA分子の翻訳を含みうる。もし核酸が、ゲノムDNAに由来するならば、発現は、、もし適当な真核宿主細胞または生物が選択されるならば、mRNAのスプライシングを含みうる。アンチセンス構築物について、発現は、アンチセンスDNAの転写を言及し得る。
【手続補正３６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１１３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１１３】
ここで使用するように、すべてのアッセイおよび手法、例えばハイブリダイゼーション反応および抗体－抗原反応は、特に特定しない限り、当業者によって標準的条件として認識される条件下で実行する。
【手続補正３７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１２６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１２６】
ほ場作物植物は、マツヨイグサ、meadow foam、トウモロコシ、トウモロコシ、ホップ、ホホバ、ピーナッツ、イネ、サンフラワー、小穀類(small grains)(オオムギ、オーツ、ライムギ、コムギ、および他)モロコシ属、タバコ、カッポク、マメ科植物(インゲンマメ、レンズマメ、エンドウ、ダイズ）、油料植物(キャノーラ、ナタネ、アブラナ、ケシ、オリーブ、ヒマワリ、ココナッツ、トウゴマ、カカオ、ラッカセイ)、繊維植物(コットン、フラックス、アサ、ジュート)、クスノキ科(シナモン、カンフル(camphor)、およびコーヒー、サトウキビ、チャおよび天然ゴム植物のような植物を含む。植物の他の例には、花卉、サボテン、多肉植物および観賞植物のような花壇用花卉、ならびに森林(広葉樹および常緑植物)、果実、観賞植物およびナッツがなる木のような木、低木、藻類、蘚類、およびウキクサが含まれる。
【手続補正３８】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１３１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１３１】
細胞、特に植物細胞中への異種核酸の移入および発現のモニターに使用し得るレポーター分子をコードする核酸には、限定されるものではないが、β－ガラクトシダーゼ(ＧＵＳ)または種々の色素生産性基質が知られている酵素(Novel and Novel (1973) Mol. Gen. Genet. 120:319-335; Jefferson et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8447-8451; US Patent No. 5,268,463; Clontech Laboratories, Palo Alto, CAより商業上利用可能である)であるuidA遺伝子産物をコードする核酸、植物組織中の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－配座遺伝子由来ＤＮＡ(例えばDellaporta et al. (1988) In ''Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium'' 11:263-282参照)、種々の色素生産性基質が知られている酵素(例えば、PADAC、色素性産生セファロスポリン)であるβ－ラクタマーゼ(Sutcliffe (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3737-3741)をコードする核酸、色素生産性カテコールを変換し得るカテコールジオキシゲナーゼをコードするxy/E 遺伝子(例えばZukowsky et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:1101-1105参照)由来のＤＮＡ；α－アミラーゼをコードする核酸(例えば、Ikuta et al. (1990) Bio/technol. 8:241-242参照)、チロシンをＤＯＰＡおよびドーパキノン(dopaquinone)へ酸化し次いで縮合し容易に検出できる化合物メラニンを形成することができる酵素、チロシナーゼをコードする核酸(例えば、Katz et al. (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-2714参照)、色素生産性基質が存在する酵素、β－ガラクトシダーゼをコードする核酸、生体ルミネセンス検出可能なルシフェラーゼ(lux)遺伝子(例えば、Ow et al. (1986) Science 234:856-859参照)をコードする核酸、カルシウム感受性生体ルミネセンス検出において使用し得るエクオリン(例えば、Prasher et al. (1985) Biochem. Biophy. Res. Commun. 126:1259-1268参照)をコードする核酸、緑色蛍光タンパク質(GFP)(例えば、Sheen et al. (1995) Plant J. 8:777-784; Haselhoff et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:2122-2127; Hasseloff and Amos (1995) Trends Genet 11:328-329; Reichel et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep. 16:267-271; Prasher et al. (1992) Gene 111:229-233; Chalfie et al. (1994) Science 263:802; PCT Application Publication Nos. WO97/41228 および WO 95/07463参照; およびClontech Laboratories, Palo Alto, CAより商業上利用可能である)をコードする核酸、赤色または青色蛍光タンパク質(それぞれRFPまたはBFP)、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)をコードする核酸が含まれる。
【手続補正３９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５１】
Agrobacterium-仲介形質転換は、典型的に、目的の異種核酸を保有するバイナリーベクターの、適当なAgrobacterium株への移入を含み、それは、共常在性Tiプラスミドまたは染色体のいずれかにおいて宿主Agrobacterium株により保有するvir遺伝子の相補性に依存し得る(例えば、Uknes et al. (1993) Plant Cell 5:159-169参照)。Agrobacteriumへの組換えバイナリーベクターの移入は、組換えバイナリーベクターを保有するEscherichia coli、および組換えバイナリーベクターを標的Agrobacterium株に移動させ得るプラスミドを保有するヘルパーE. coli株を用いるトリペアレンタルメイティング手順により行われる。他に、組換えバイナリーベクターは、DNA形質転換によりAgrobacteriumに移入され得る(例えば、Hofgen & Willmitzer (1988) Nuc. Acids. Res. 16:9877参照)。

【手続補正４０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１６６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１６６】
粒子ボンバードメントを用いるA188-誘導化トウモロコシ系の形質転換の技術は、Gordon-Kamm et al. [(1990) Plant Cell 2:603-618) および Fromm et al. [(1990) Biotechnology 8:833-839)に記載されている。イネの形質転換はまた、粒子ボンバードメントにより行われ得る(例えば、Christou et al. (1991) Biotechnology 9:957-962参照)。粒子ボンバードメントはまた、コムギの形質転換に使用され得る(例えば、C型長期間再生可能カルスの細胞の形質転換では、Vasil et al. (1992) Biotechnology 10:667-674; および未成熟胚および未成熟胚誘導化カルスの粒子ボンバードメントを用いるコムギの形質転換では、Weeks et al. (1993) Plant Physiol. 102:1077-1084参照)。ボンバードメント法を用いるトランスジェニックオオムギの作成は、例えば、Koprek et al. [(1996) Plant Sci. 119:79-91)により記載されている。
【手続補正４１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７２】
核酸はまた、植物組織を水和することにより吸収され得、これにより、植物細胞中への核酸取り込みのための他の方法が提供される(例えば、Simon (1974) New Phytologist 37:377-420参照)。例えば、核酸は、吸収により穀類およびマメ科植物の種子胚中に取り込まれ得る(例えば、Toepfer et al. (1989) The Plant Cell 1:133-139参照)。
【手続補正４２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１９３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１９３】
しかし、遺伝子発現は、ソーセージ染色体のヘテロクロマチン環境で可能であり得る。異種遺伝子発現のレベルは、選択マーカー遺伝子のサブフラグメントとのノーザンハイブリダイゼーションにより決定され得る。異種核酸中に含まれるレポーター遺伝子もまた、ソーセージまたは他のヘテロクロマチンまたは卓越ヘテロクロマチン染色体中の遺伝子発現の評価に使用するための容易に検出可能な産物を提供する。レポーター(および選択マーカー)遺伝子を有するソーセージ染色体含有細胞のサブクローンから単離したDNAのサザンハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションの強度とソーセージ染色体の長さとの間の近い関係を示し得る。
【手続補正４３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２０４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２０４】
人工染色体は、任意の適当な手順を用い内生染色体からソートされ得、典型的には、中期染色体を単離すること、人工染色体を内生染色体から識別すること、および人工染色体を内生染色体から分離することを含む。その手順は、一般的に、動物細胞およびプロトプラストのための以下のベーシックのステップを含む：(１)好ましくは1×10^{6}オーダー

の人工染色体を生ずる十分な数の細胞(典型的には約２×１０^{7} 有糸分裂細胞)の培養、(２)コルヒチンのような有糸分裂停止(arrest)試薬を用いる、有糸分裂、好ましくは中期の段階の細胞の細胞周期の停止、(３)特に植物細胞の細胞壁分解による細胞の処理および／または破裂(disruption)に対する細胞の感受性を増大する、低張性緩衝液中の細胞の膨張、(４)放出染色体の安定化のための単離緩衝液の存在下で細胞を破裂させるための物理的力の適用、(５)遊離染色体の安定化のための単離緩衝液の存在下での染色体の分散、(６)内生染色体からの人工染色体の分離および(７)適当な緩衝液中の単離人工染色体の保存(および望ましいならばシッピング)。例えば、異なる増殖特性および必要条件を有する異なる細胞型を適応させること、および停止試薬で有糸分裂ブロックの持続時間を最適化し、染色体収率およびデブリスのレベルの望ましいバランスを得ることは、経験的に決定され得る(実施例参照)。

【手続補正４４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２１４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２１４】
セントロメア、テロメアおよび複製のオリジンのような本質的コンポーネントを合わせ、人工染色体、特に、植物中で機能し、植物染色体から誘導されたコンポーネントを含み得る人工染色体を生ずることを含むインビトロアセンブリ法を本明細書で提供する。また、当該方法により作成される人工染色体を提供する。当該方法および染色体の好ましい実施態様は、メガレプリケイター(megareplicator)を含む。当該メガレプリケイターは、rDNA、例えば哺乳類または植物rDNAを含み得る。インビトロアセンブル化人工染色体は、任意の量のヘテロクロマチンおよび／またはユークロマチン核酸を含み得る。例えば、インビトロアセンブル人工染色体は、実質的に全てヘテロクロマチンであり得るが、またタンパク質コード化DNAを含むかまたは増加した量のユークロマチンDNAを含み得、それによって、例えば、それは、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または約90%よりも多いユークロマチンDNAを含み得る。

【手続補正４５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２１６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２１６】
例えば、卓越ヘテロクロマチンである繰り返し核酸単位の領域を含む植物人工染色体は、本質的染色体コンポーネントおよび繰り返し領域を合わせることによりアセンブルされ得るか、またはインビトロアセンブル化人工染色体内に含まれるヘテロクロマチンDNAの増幅を介するインビトロアセンブル化人工染色体から作成され得る。インビトロアセンブル化人工染色体内に含まれるヘテロクロマチンDNAの増幅を介するその染色体の作成のため、核酸は、インビトロアセンブル化人工染色体を含む細胞中に導入され、生ずる細胞は、卓越ヘテロクロマチンである繰り返し核酸単位の１つまたはそれより多い領域を含む人工染色体を含むように選択される。インビトロアセンブル化人工染色体は、染色体DNA中への核酸の組込みに関し当該染色体の増幅を促進するメガレプリケイターを含むか、またはメガレプリケイター含有DNAは、インビトロアセンブル化人工染色体中に組み込まれる核酸中に含まれるか、いずれかである。

【手続補正４６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２２０
【補正方法】変更
【補正の内容】

【０２２０】
mM2C1細胞系のミクロ-メガ染色体のような本明細書で提供する特定のAC(それらは、染色体コンポーネントの単離および同定において出発物質としての役割をするのに特徴的に適するようにする)の更なる特徴は、単一特定細胞系内での各メガ染色体のセントロメアが同定されるという事実を含む。異種セントロメア源により始まるその能力(異なるセントロメリック配列を有する異なる染色体の混合物とは対照的に)は、セントロメアDNAのクローニングを非常に促進する。ミクロ-メガ染色体のような、精製したメガ染色体特にトランケートしたメガ染色体を適当な制限エンドヌクレアーゼで消化することおよび当該フラグメントを商業的利用可能で十分既知のYACベクター(例えば、Burke et al. (1987) Science 236:806-812参照)、BACベクター(例えば、Shizuya et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 8794-8797 bacterial artificial chromosomes which have a capacity of incorporating 0.9 - 1 Mb of DNA参照)またはPACベクター(300kbのDNAを組み込む能力を有し、そしてバクテリオファージパッケージングによる以外にエレクトロポレーションによりE. coli宿主細胞へ送達されるP1プラスミド誘導体であるP1人工染色体ベクター; 例えば、Ioannou et al. (1994) Nature Genetics 6:84-89; Pierce et al. (1992) Meth. Enzymol. 216:549-574; Pierce et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:2056-2060; U.S. Patent No. 5,300,431 および International PCT application No. WO 92/14819参照)中へクローニングすることにより、わずか50クローンでミクロ-メガ染色体全体を示すことが可能である。
【手続補正４７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２２５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２２５】
ｂ．テロメア
人工染色体のアセンブルに使用され得るテロメアは、1 kB 合成テロメア(例えば、PCT Application Publication No. WO 97/40183参照)を含む。二重合成テロメア構成物であって、逆方向に連続する卓越選択マーカー遺伝子に連結する1 kB合成テロメアを含む当該構成物は、容易な操作に使用され得る。その二重構成物は、一連のTTAGGGリピート、マーカー遺伝子の3'および逆配列、すなわち、GGGATTの一連のリピート、マーカー遺伝子の5'、を含み、以下のようなものである:
(GGGATT)n---卓越マーカー遺伝子---$(TTAGGG)_n$。適当に方向付けられたフラグメントのみが選択されるため、逆位マーカーの使用により、平滑末端ライゲーションのような挿入のための容易な手段が提供される。
【手続補正４８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２３４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２３４】
これらのインビトロのアセンブリ法の特定の実施態様では、部位特異的組換え部位は、アセンブリDNA中に含まれるか、または最初のアセンブリ後、植物インビトロアセンブル人工染色体のような、アセンブル化染色体中に追加され得る。インビトロアセンブル化人工染色体中の組換え部位の存在は、異種核酸がまた相補的組換え部位を含むならば、染色体中への異種核酸のレコンビナーゼ-触媒化導入を促進する。その組換えシステムには、限定されるものではないが、Cre/lox (例えば、Dale and Ow (1995) Gene 91:79-85参照)、FLP/FRT (例えば、Nigel et al. (1995) The Plant Journal 8:637-652参照)、R/RS (例えば、Onouchi et al. (1991) Nuc. Acids Res. 19:6373-6378参照)、Gin/gix (例えば、Maeser and Kahman (1991) Mol. Gen. Genet. 230:170-176参照) および int/attが含

まれる。染色体中へのatt組換え部位の導入、およびこれとの関係で天然および人工染色体を作成し得るラムダファージインテグラーゼレコンビナーゼの使用は、Perkins et al.によるMay 30, 2001出願の標題''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS''のcopending U.S. provisional application Serial No. 60/294,758、Perkins et al.によるMarch 21, 2002出願の標題''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS''のU.S. provisional application Serial No. 60/366,891、Perkins et al.によるMay 30, 2002出願の標題''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS''のU.S. patent application Serial No. 10/161,403、およびPerkins et al.によるMay 30, 2002出願の標題''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS"のPCT International Application No. PCT/US02/17452に記載されており、それらは何れも引用により本明細書にすべて含める。そのため、インビトロアセンブル化人工染色体、特に、att部位のような１つまたはそれより多い組換え部位を含む植物染色体誘導化コンポーネントを含むそのような染色体もまた本明細書で意図されている。

【手続補正４９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２３５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２３５】
E.rDNAおよびヘテロクロマチンの隣接領域を含む、植物アクロセントリック染色体および植物染色体の生産方法

アクロセントリックヒトおよびマウス染色体であって、短いアームはペリセントリックヘテロクロマチン、rDNAアレイおよびテロメアのみを含むものを、サテライトDNAに基づく人工染色体（SATAC、またACesという）のデノボ形成で使用できる。ここで提供する植物人工染色体を生産する方法のいくつかの実施態様では、異種核酸を、不等長のアーム（例えばアクロセントリック染色体の短いアーム内に）を有する、及び／又はrDNAおよびヘテロクロマチンの隣接領域を含む、植物染色体例えばペリセントリックヘテロクロマチンまたはサテライトDNA内に導入するのが望ましくありうる。そのような方法で特に興味深いのは、ペリセントリックヘテロクロマチンまたはサテライトDNAに隣接してまたは特にrDNAおよびペリセントリックヘテロクロマチンの間のユークロマチン性DNAがない染色体の短いアーム上に位置するrDNAを含む植物アクロセントリック染色体である。植物人工染色体の生成における当初組成物としてそのような構造を利用することは、卓越的にヘテロクロマチン性である植物人工染色体の生成を容易化し得る。例えば、異種核酸を、そのようなアクロセントリック植物染色体を含む細胞内へ導入し、その結果核酸が染色体の短いアームのペリセントリックヘテロクロマチンおよび／またはrDNA内に組み込むことは、卓越的にヘテロクロマチン性の植物人工染色体の形成につながるヘテロクロマチンの増幅（可能性として''メガレプリケーター''DNA配列を介して、rDNAアレイに存在し得るような、また核内構成領域（NOR）として知られる）に付随し得る。

【手続補正５０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２３８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２３８】
ここにさらに提供するのは、ヘテロクロマチン、特にペリセントリックヘテロクロマチンまたはサテライトDNA、およびrDNAであって、2領域間にユークロマチンがほとんどないしまったくないものの隣接領域を含む植物染色体である。そのような植物染色体への言及によって、''ほとんどないしまったくない''は、もしあれば、rDNAおよびヘテロクロマチン（例えばペリセントリックヘテロクロマチン及び／またはサテライトDNA）の間に位置する、ユークロマチン性DNAの量を意味し、一般にユークロマチンとして散在的におよび認識可能に染色せず及び／またはタンパク質コード遺伝子を含まない。こうして、これら

の染色体では、ヘテロクロマチン（例えばペリセントリックヘテロクロマチン及び／またはサテライトDNA）およびrDNAの間に、ヘテロクロマチンよりも少なく、実質的にクロマチンのない。ここに提供するrDNAおよびヘテロクロマチン（例えばペリセントリックヘテロクロマチン）の隣接領域を含む植物染色体は、アクロセントリック染色体でありうる。これらの植物染色体の特定の実施態様では、rDNAおよびヘテロクロマチン、特にペリセントリックヘテロクロマチンの隣接領域は、染色体の短いアーム上に含まれる。

【手続補正５１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２４２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２４２】
核酸を、逐次的または同時的に細胞内に導入し得る。核酸はまた、特定の染色体および/または特定の染色体配列にターゲティングし得る。そのようなターゲティングは、染色体の特定配列に相同な核酸配列中に含めることによって達成し得る。

【手続補正５２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２４５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２４５】
att組み換え部位の、染色体内への導入は、および天然染色体の改変を許容するそれと結合したラムダファージインテグラーゼレコンビナーゼの使用は、米国仮出願一連番号60/294,758のPerkins et al.による名称 ''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS'' 出願日2001年5月30日の米国仮出願一連番号60/366,891のPerkins et al.による名称 ''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS''の出願日2002年3月21日の米国特許出願番号10/161,403のPerkins et al.による名称 ''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS''の出願日2002年5月30日の代理人整理番号24601-420、およびPCT国際出願番号PCT/US02/17452の、Perkins et al.による名称 ''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS'' 出願日2002年5月30日代理人整理番号24601-420PCであって、それぞれ引用により全体をここに含めるものに記載される。これらのシステム、並びに他の既知の技法を、DNAを特異的に切除または逆転し、（例えば染色体内組み換え）またはDNAの領域を交換し（例えば染色体間組み換え）またはDNAを挿入するために（例えば組み換え部位および挿入されるべきDNAの相同配列間の組み換えを経由して）使用することができる。正確な事象は組み換え部位DNA配列の方向によって制御される。

【手続補正５３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２４８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２４８】
アクロセントリック植物染色体を生産するこれらの方法をまた実行し、その結果部位特異的組み換え部位を含む核酸を、植物染色体を含む細胞内に導入し、ここでそれは、細胞の植物染色体のペリセントリックヘテロクロマチンおよび/またはサテライトDNA内にまたは接近して組み込み、そして相補的部位特異的組み換え部位を含む核酸は、細胞内に導入され、ここでそれは同じ染色体の同じアームの遠位末端内に組み込む。この実施態様では、部位を認識するレコンビナーゼの存在下、直接（すなわち同じまたは頭から尾まで）方向で部位間の組み換えは、ペリセントリックヘテロクロマチン（および/またはサテライトDNA）と染色体アームの遠位部分の間の染色体内組み換えの結果となることができ、それによって、これら2領域間のDNAを切除し、そしてそれら間のDNAの量を減少させ、アクロセントリック植物染色体を生成する。

【手続補正５４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２４９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２４９】
rDNAおよびヘテロクロマチン、例えばペリセントリックヘテロクロマチンおよび/またはサテライトDNAの隣接領域を含む植物染色体を生産するためここに提供する方法の特定の実施態様では、部位特異的組み換えのための相補的レコンビナーゼ組み換え部位を含む核酸を、1または2以上の植物染色体を含む細胞内に導入し、ここで部位は、細胞の1の植物染色体のヘテロクロマチン内に組み込む。さらなる実施態様では、部位特異的組み換えのための相補的レコンビナーゼ認識部位を含む核酸を、1または2以上の植物染色体を含む細胞内に導入し、ここで部位の1つは、細胞の植物染色体の、rDNAまたは核内向性領域（NOR)組み込む。これらの実施態様では、部位を認識するレコンビナーゼの存在下部位間の組み換えは、ヘテロクロマチン領域、例えばペリセントリックヘテロクロマチン（および/またはサテライトDNA）、およびrDNAの間のDNAの欠失、ヘテロクロマチンまたは植物染色体のrDNAを含むDNAの逆位または1染色体アームのヘテロクロマチンおよび他の染色体のrDNA間の相互移入という結果となりうる。これらの組み換え事象のそれぞれは、染色体DNAを編成するように供することができ、その結果ヘテロクロマチン性DNA、例えばペリセントリックヘテロクロマチンおよび/またはサテライトDNAの領域が、植物染色体上のrDNAの領域に隣接する。
【手続補正５５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２５１】
ヘテロクロマチン性DNAおよびrDNAの隣接領域を含む植物染色体を生産する方法はまた実行し、その結果部位特異的組み換え部位を含む核酸を、植物染色体を含む細胞内に導入し、ここでそれは植物染色体のヘテロクロマチン、例えばペリセントリックヘテロクロマチンおよび/またはサテライトDNA内に組み込み、そして相補的部位特異的組み換え部位を含む核酸を、細胞内に導入し、ここでそれは同じ染色体のrDNA内に組み込む。この実施態様では、部位を認識するレコンビナーゼの存在下直接方向での部位間の組み込みは、ヘテロクロマチン、例えばペリセントリックヘテロ尾クロマチン（および/またはサテライトDNA)、およびrDNAの間の染色体内組み換えという結果となり、それによってこれらの2領域間のユークロマチン性DNAを含むDNAを切除する。レコンビナーゼの存在下の間接（すなわち頭から頭へ）方向の部位の組み換えは、部位間のDNAの逆位という結果となり得、それによってrDNAを有する染色体上の、ペリセントリックヘテロクロマチン（および/またはサテライトDNA）とrDNAの間に位置する、DNA例えばユークロマチンを置換する。こうして、得られ得た植物染色体では、rDNAはペリセントリックヘテロクロマチン（および/またはサテライトDNA）に隣接して位置し、そしてペリセントリックヘテロクロマチン（および/またはサテライトDNA)およびrDNAの間に存在するDNAは、rDNAによって以前占有された位置のrDNAに対して遠位に位置する。
【手続補正５６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２５４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２５４】
アクロセントリックであるおよび/またはヘテロクロマチンおよびrDNAの隣接領域を含

む植物染色体を生産するための前記方法のそれぞれにおいて、2またはそれ以上の組み換え部位を含む核酸を、同時または逐次的に、ここに記載または当業界既知核酸移入方法を使用して細胞内に導入し得る。核酸を、植物染色体内にランダムに組み込み得、または核酸の配列および染色体内の配列間の相同的組み換えによって、植物染色体上の特定領域または部位内への組み込みのためターゲティングし得る。レコンビナーゼ活性は、そこでの発現のため細胞内に適当なレコンビナーゼをコードする核酸の導入によって提供し得る。レコンビナーゼをコードする核酸を、組み換え部位をコードする核酸の導入の前、中、または後に細胞内に導入し得る。

【手続補正５７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２５５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２５５】
移入される核酸を含む細胞の同定を容易化するためおよび/またはここで組み換え事象が起こり、選択マーカーをコードする核酸を細胞内に導入し得る。例えば、組み換え部位を含む核酸の1または両方はまた、核酸の組み込みが染色体のアーム上の2つの直接的に方向付けられた組み換え部位間のマーカーDNAを染色体内に配置するように、方向付けられるプロモーターに作動可能に連結される選択マーカー（例えば抵抗性コードマーカーまたはレポーター分子）をコードするDNAを含みうる。核酸を含む細胞はこうして、選択剤に抵抗性であり、またはレポーター分子を検出可能に発現するだろう。適当なレコンビナーゼに対する細胞の暴露は、2組み換え部位間のDNAを切除する組み換え事象という結果となることができ、それは選択マーカーをコードするDNAを含む。こうして、組み換えは、レポーター分子の喪失または選択剤に対する減少抵抗性として検出し得る。レコンビナーゼに対する暴露後、組み換え部位を含む核酸が移入される細胞を、例えばFISH分析および他の染色体可視化技法を使用して、アクロセントリック植物染色体の存在について分析し得る。

【手続補正５８】
【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】
アクロセントリックであるおよび/またはヘテロクロマチンおよびrDNAの隣接領域を含む植物染色体を生産するためのここで提供する他の方法では、組み換え事象または染色体の形成につながる事象は、相補的部位特異的組み換え部位を含む染色体を含むトランスジェニック植物を交雑することによって起こる。こうして、これらの方法の1実施態様では、選択マーカーをコードする核酸に隣接する組み換え部位を含む核酸を、第一植物細胞内に導入し、そして第一トランスジェニック植物を第一植物細胞から生成する。植物細胞で機能性であるプロモーターおよび作動性連結のレコンビナーゼコード領域を含む核酸を、第二トランスジェニック植物が生成する第二植物細胞内に導入する。第一及び第二トランスジェニック植物を、交雑し、選択マーカーをコードする核酸を含む細胞について選択する剤に抵抗性の1または2以上の植物を取得し、そしてアクロセントリックであるおよび/またはヘテロクロマチンおよびrDNAの隣接領域を含む植物染色体を含む細胞を含む抵抗性植物を選択する。

【手続補正５９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２５７
【補正方法】変更
【補正の内容】

【０２５７】
この方法の例では、部位特異的組み換え部位を含む核酸を、Nicotiana tabacumの細胞内に導入する。カナマイシン抵抗性遺伝子 (Kan^R)を有するAgrobacterium tumefaciensで葉外食体を感染することによって別個に導入する。カナマイシン抵抗性トランスジェニック植物を、感染葉外植体から生成する。あるトランスジェニック植物は、lox部位特異的組み換え配列によって置換されたプロモーターのないハイグロマイシン抵抗性遺伝子をコードする核酸を含み(lox-cre)、他の植物は、lox配列およびcreDANレコンビナーゼコード領域に連結されたカリフラワーモザイク35Sプロモーターを含む(35S-lox-cre)。得られた Kan^R トランスジェニック植物を交雑する (参照せよ、例えば、protocols of Qin et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:1706-1710, 1994)。適当なDNA組み換え事象が起こった植物を、ハイグロマイシン抵抗性によって同定する。
【手続補正６０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２６１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２６１】
追加的に、核酸特にDNA分子の、人工染色体への導入は、ここに記載のような部位特異的レコンビナーゼの使用によって達成できる(参照せよ、また共係属米国仮出願一連番号60/294,758のPerkins et al.による名称 ''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS'' 出願日2001年5月30日米国仮出願一連番号60/366,891のPerkins et al.による名称''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS'' 出願日2002年3月21日 米国特許出願番号10/161,403の、Perkins et al.による名称 ''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS'' 出願日2002年5月30日の代理人整理番号 24601-420、およびPCT国際出願番号PCT/US02/17452、Perkins et al.による名称 ''CHROMOSOME-BASED PLATFORMS'' 出願日2002年5月30日、代理人整理番号24601-420PC;であって、それぞれ引用によりここに全体を含める)。人工染色体を、レコンビナーゼ認識配列を含むように生産でき、同じもの内へのDNA分子の部位特異的導入を可能とする。導入されるレコンビナーゼ部位のための別の方法は、レコンビナーゼ介在遺伝子挿入の使用によって、新しい形質の部位特異的取り込みのための領域を提供することである。
【手続補正６１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２６３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２６３】
人工染色体の任意の型を使用できる。植物人工染色体(PAC)を、ここに記載のインビボおよびインビトロ方法によって調製できる。PACを、植物プロトプラスト内に調製でき、次いで他の植物種および組織、特に、他の植物プロトプラストに、ここに記載のPEGの存在または不存在下の融合によって移入できる (Draper et al. (1982) Plant Cell Physiol. 23:451-458; Krens et al. (1982) Nature 72-74)。PACを、それらが調製されたプロとプロストから単離でき、リポソーム内にカプセル化し、そして他の植物プロトプラストに送達し得る(Deshayes et al. (1985) EMBO J. 4:2731-2737)。代替的に、PACを単離し、植物プロトプラスト、植物細胞または他の植物標的に、PEG介在プロセス、燐酸カルシウム介在プロセス、エレクトロポレーション、ミクロインジェクション（パーティクルボンバードメント）、超音波処理のあるまたはない脂質介在方法、超音波処理単独、またはここに記載の当業界既知方法によって直接的に送達できる (Haim et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:161-168; Fromm et al. (1986) Nature 319:791-793; Fromm et al. (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5824-5828; Klein et al. (1987) Nature 327:70; Klein et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:8502-8505; および 国際PCT出願公開番号 WO 91/00358)。植物人工染色体はまた、プロトプラスト誘導性植物マイクロセルの

調製、そして植物人工染色体を含むミクロセルを、他の植物種の植物細胞と融合によって、他の植物種に移入できる。
【手続補正６２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２６４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２６４】
哺乳動物人工染色体(MAC)を、植物細胞に移入できる。哺乳動物人工染色体を、米国特許番号 6,025,155 および 6,077,697、および国際PCT出願番号WO97/40183に記載のインビボおよびインビトロ方法によって調製する。MACを、ミクロセルとして調製し得、そしてミクロセルを、PEGの存在下または不存在下で植物プロトプラストと融合できる (Dudits et al. (1976) Hereditas 82:121-123; Wiegland et al. (1987) J. Cell. Sci. Pt. 2 145-149)。代替的に、MACを単離し、そして植物細胞、プロトプラスト及び他の植物標的に直接的に、PEG仲介プロセス、燐酸カルシウム介在プロセス、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、超音波処理のあるまたはない脂質介在方法、超音波処理単独、または米国特許番号 6,025,155 および 6,077,697、および国際PCT出願公開番号 WO 97/40183に記載の任意の他の当業者既知方法によって送達し得る。
【手続補正６３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２６６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２６６】
それらが安定的に発現され、世代から世代に伝達可能であるような、植物内へ遺伝子を導入する能力は、革命的植物生物学を有し、そして商業的に有用な産物の生産のためのグリーンファクトリーとして並びにここに記載の他の応用のためとして植物を使用するための新しい可能性を開く。安定形質転換植物を生成するためのいくつかのアプローチがあり、そして採用アプローチは、プロジェクトの目的によって異なる。植物に人工染色体を導入するため、種々の方法を使用し得る。トランスジェニック植物、形質転換プロセスは、植物宿主細胞への外来DNA送達の方法、形質転換植物宿主細胞の成長及び分析、および形質転換植物宿主細胞からトランスジェニック植物の生成及び再生に関係する。
【手続補正６４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２６８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２６８】
非ベクター介在、または直接的遺伝子移入システムは、異種DNA、特に人工染色体の、限定しないが植物細胞及びプロトプラスト内への導入であって、生物学的ベクターを使用しないものに関係する。これらの植物宿主細胞内へ導入される人工染色体は、形質転換再生可能トランスジェニック植物の開発につながることができる。トランスジェニック植物のための直接遺伝子移入システムは、植物細胞の細胞壁および原形質膜によって引き起こされるDNA取り込みの障壁を克服するため設計される。直接遺伝子移入のためのアプローチは限定しないが、化学的、電気的、および物理的方法を含み、また人工染色体の移入を最適化するために適合できる (参照せよ、例えば、Uchimiya et al. (1989) J. of Biotech. 12: 1-20 for a review of such procedures、また、例えば、米国特許番号 5,436,392; 5,489,520; Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183; Lorz et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:178; Fromm et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:5824-5828; Uchimiya et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 204:204; Callis et al. (19

87) Genes Dev. 1:1183-2000; Callis et al. (1987) Nuc. Acids Res. 15:5823-5831; Marcotte et al. (1988) Nature 355:454 および Toriyama et al. (1988) Bio/Technology 6:1072-1074参照)。
【手続補正６５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２６９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２６９】
a. 化学的方法
人工染色体の、植物細胞、たとえばプロトプラスト内への取り込みは、ポリエチレングリコール(PEG)の不存在または存在下で達成でき、それはフソゲン(fusogen)であり、または当業者に既知のそのような方法の任意の変形によるものである[参照せよ、例えば、米国特許番号 4,684,611のSchilperoot et al.; Paskowski et al. (1984) EMBO J. 3:2717-2722; 米国特許番号 5,231,019 および5,453,367]。1アプローチでは、植物プロトプラストを、外来DNA特に人工染色体の溶液、および高細胞生存および高効率染色体取り込みを可能とする濃度のPEGとインキュベートする。プロトプラストを次いで洗浄し、培養する[Datta and Datta (1999) Meth. in Molecular Biol. 111:335-348]。代替的アプローチでは、植物プロトプラストを、直接的人工染色体取り込みのための燐酸カルシウムの存在下人工染色体とインキュベートする (Haim et al. (1985) Mol. Gen. Genet.199:161-168)。代替的に、人工染色体、特に植物人工染色体 (PAC)を、次いで植物宿主プロトプラストへのPACを移入するためPEGの存在または不存在下別の植物プロトプラストと融合される、植物プロトプラストにおいて形成する。PEGおよび外来DNAでプロトプラスト処理するためのかかる方法は、当業界周知である (Draper et al. (1982) Plant Cell Physiol. 23:451-458; Krens et al. (1982) Nature 72-74)。
【手続補正６６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２７２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２７２】
b.電気的方法
ナノモルサイズ、可逆性孔を創出する、子プロトプラストまたは植物細胞および外来DNA、特に人工染色体を含む溶液への高電圧電気パルスに関係するエレクトロポレーションは、植物細胞またはプロトプラスト内へDNAを導入する共通方法である。外生DNAを、例えば螺旋形、環状またはスーパーコイルDNA、リポソームにカプセル化された人工染色体、スフェロプラスト中のDNA、他の植物プロトプラスト中の人工染色体、塩と複合された人工染色体および他の方法のような任意の形態のプロトプラストに付加し得る。外来DNA、特に人工染色体はまた、表現型的マーカーを含み、首尾よく形質転換された植物細胞を同定できる。
【手続補正６７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２７４】
人工染色体を、エレクトロポレーションの使用によって植物細胞、特に植物種子におよび人工染色体を含む花粉を誘導する花粉に送達し得る。花粉内に人工染色体を送達するための方使用される方法は、例えば、米国特許番号 5,049,500 および Negrutiu et al. による[Biotechnology and Ecology of Pollen, Mulcahy et al. eds., (1986) Springer

Verlag, N.Y., pp. 65-69中]および Fromm et al. [(1986) Nature 319:791; including methods for introducing DNA into mature pollen using various procedures such as heat shock, PEG and electroporation]に記載される技法を含む。花粉は、発芽および卵細胞を受精し得、人工染色体を含む植物種子の形成につながる。
【手続補正６８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２７８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２７８】
外来核酸を、植物細胞、例えばトウモロコシ細胞内に、加速によって送達するための方法の例示的実施態様では（参照せよ、例えば、米国特許番号 6,023,013) Biolistics Particle Delivery System を使用し、DNAまたは細胞で被覆された粒子を、スクリーン例えばステンレススチールまたはNytexスクリーンを経由し、懸濁培養された植物（例えばトウモロコシ）細胞で覆われたフィルター表面上に加速による。スクリーンは粒子を分散させ、その結果それらは大凝集のレシピエント細胞に送達されない。プロジェクタイル装置とボンバードされるべき細胞の間の介入スクリーンは、プロジェクタイル凝集のサイズを減少させ、そして、大きすぎるプロジェクタイルによるレシピエント細胞上に負わせる損傷を減少させることによって形質転換のより高度の頻度に貢献し得る。
【手続補正６９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８１】
調節し得る物理学的パラメーターは、ギャップ距離、飛行距離、組織距離およびヘリウム圧力を含む。加えて、形質転換は、浸透圧状態、組織水和および継代段階またレシピエント細胞の細胞周期を調節することによって最適化し得る。バリスチックパーティクル加速装置は、Agracetus, Inc. (Madison, WI) and BioRad (Hercules, CA)から入手可能である。
【手続補正７０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８４】
代替的に、植物宿主細胞内への人工染色体の送達は、ここに記載の任意の方法または当業界周知方法によって実施する。例えば、ニードル様-ウィスカー（ whiskers） (US 5,302,523, 1994, US 5,464,765) を使用し、外来DNAを送達し得る。
外来DNA、特に人工染色体を移入する好適な植物標的は、限定しないが、プロトプラスト、細胞培養細胞、植物組織中の細胞、メリステム細胞、マイクロスポア、カルス、花粉、花粉管、マイクロスポア、卵細胞、胚のう、発達の種々の段階の接合子または胚、種子、実生、根、茎、葉、前植物体、藻類、または植物の増殖及び再生の可能な任意の植物部分を含む。（参照せよ、例えば、米国特許番号5,990,390; 6,037,526およびお5,990,390)。ここに記載の形質転換植物標的の成長を、組織培養、または非組織培養方法で実施でき、組織培養方法が好ましい方法である。
【手続補正７１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８５
【補正方法】変更

【補正の内容】
【０２８５】
外来DNA、特に人工染色体を導入し、そして形質転換細胞から再生されるすべての植物細胞を発現される目的のために直接的に使用し(例えば 除草剤抵抗性、昆虫/害虫抵抗性、病害抵抗性、環境／ストレス抵抗性、栄養利用性、卓越不稔、改善栄養含量、化学または生物物質の生産、非タンパク質発現配列およびライブラリーの調製及びスクリーニング）ここに記載のとおりでありまたは使用しここに記載の応用及び使用のため形質転換全植物体を生産する。植物宿主内に人工染色体の導入のための特定のプロトコル及び手段を適合または洗練し、特定植物種または品種を追求する。
【手続補正７２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８６】
染色体を、マイクロセル介在染色体移入 (MMCT) (Telenius et al., Chromosome Research 7:3-7, 1999; Ramulu et al., Methods in Molecular Biology 111: 227-242, 1999)によって細胞に移入し得る、一般に、ドナー植物培養物またはドナー哺乳動物細胞培養物を、DNA合成を阻害する（例えばヒドロキシウレア、アプヒジコリン）試薬で懸濁した培地および/または紡錘体への染色体の付着を阻害する試薬（例えばコルセミド、コルヒチン、アミプロフォスメチル、クレマート）と懸濁した培地でインキュベートする。植物細胞の細胞壁は、酵素（例えばセルラーゼ、マセロエンザイム）で消化し、プロトプラストを生産する。ドナー植物プロトプラストまたはドナー哺乳動物細胞を、サイトカラシンーB（それは細胞の細胞骨格がモノマータンパク質サブユニットに脱重合化するのを引き起こす）の存在下Precoll勾配上に負荷し、そして10^5 x gで遠心分離する。遠心分離中に、メタファーゼ染色体を、植物''ミクロプロトプラスト''または哺乳動物''ミクロセル''を形成する原形質膜を経由して押し出す。ミクロプロトプラスト／ミクロセルを、減少孔サイズ（8-3μｍ）のナイロンシーブを経由してろ過し、卓越的に1メタファーゼ染色体を含むより小さい物を単離する。マイクロプロトプラスト／マイクロセルを、ポリエチレングリコール（PEG)処理によってレシピエント植物プロトプラストまたは哺乳動物細胞に融合する。融合混合物を、適当な培地中で培養する。もし所望の染色体が、選択マーカー遺伝子を発現するならば、融合混合物を、適当な選択薬物（例えばハイグルマイシン、カナマイシン）で懸濁した適当な培地中で培養し得る。
【手続補正７３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８８】
形質転換細胞を、カルス開始のため当業界既知条件の対象とする。開始期間中発達する組織を、再生または選択培地において配置し、ここにシュートおよび根発達が起こる。プラントレットを、形質転換の決定のため分析する(国際PCT出願公開番号 WO 00/60061)。トウモロコシ、胚カルス培養を、未熟トウモロコシ胚から開始し、遺伝子でボンバードし、そして国際PCT出願公開番号 WO 00/60061に記載の方法によってプラントレット内に形質転換する。組織培養方法では、イネカルスを昆虫抵抗性のための殺虫タンパク質CryIA(b) および CryIA(c)をコードするDNAで形質転換する。共通組織培養方法をまた使用し、タバコ及びトマト（参照せよ、例えば、米国特許番号 6,136,320)、胚発生性トウモロコシカルス (米国特許番号 5,508,468; 5,538,877; 5,538,880; 5,780,708; 6,013,863; 5,554,798; 5,990,390;および5,484,956;)および他の作物種、例えば、ジャガイモ、およびタバコ (Sijmons et al. (1990) Bio/Technol 8:217-221; Tobaco(Vanderkerckhove et a

l. (1989) Bio/Technol 7:929-932 and Owen and Pen eds. Transgenic Plants: A Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins, John Wiley & Sons, Chichester, 1996)およびイネ (Zhu et al. (1994) Plant Cell Tiss Org Cult 36:197-204)を形質転換し得る。

【手続補正７４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９０】
蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)により、人工染色体に特異的なDNAプローブを使用して(例えば、マウスサテライトDNAに基づく人工染色体についてマウスマジャーサテライト DNA プローブ;またはそのような遺伝子を有する植物人工染色体についてのカナマイシン、ハイグロマイシンまたは GUS遺伝子DNAプローブ)植物細胞内への人工染色体の移入についてスクリーニングし得る。植物細胞についての標準的FISH技法は記載された (de Jong et al., Trends in Plant Science 4: 258-263, 1999)。

【手続補正７５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９１】
IdU標識化を使用し、単離人工染色体の染色体移入（マイクロセル）についての最適条件を決定できる。取り込みIdUは、染色体のもろさを増加させ、そして細胞突然変異の確立を増加する。ゆえに、細胞をトランスフェクション/融合４８時間以内に固定化し、そして種々の手法を使用して染色体取り込みについて分析する。ひとたび最適移入条件を決定すると、長期間発現実験を非標識人工染色体またはマイクロセルで実施する。

【手続補正７６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９５】
1. PAC
植物人工染色体（PACs)を、ここに記載のインビボおよびインビトロ方法によって調製する。PACを、植物プロトプラスト内で調製し、それから特に他の植物プロトプラストにおける植物標的に、ここに記載のPEGの存在または不存在下で移入させうる (Draper et al. (1982) Plant Cell Physiol. 23:451-458; Krens et al. (1982) Nature 72-74)。PACを、それらが調製されたプロトプラストから単離し、リポソーム内にカプセル化し、そして他の植物プロトプラストに送達する (Deshayes et al. (1985) EMBO J. 4:2731-2737)。代替的に、PACを単離し、植物プロトプラスト、植物細胞または他の植物標的に、PEG介在プロセス、燐酸カルシウム介在プロセス、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ソノポレーション、またはここに記載の任意の当業者既知方法によって直接的に送達する(Haim et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:161-168; Fromm et al. (1986) Nature 319:791-793; Fromm et al. (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5824-5828; Klein et al. (1987) Nature 327:70; Klein et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:8502-8505; および 国際PCT出願公開番号 WO 91/00358)。

【手続補正７７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９６

【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９６】
2．MACs
哺乳動物人工染色体（MACs)を、米国特許番号 6,025,155 および 6,077,697, および国際PCT出願番号 WO 97/40183に記載のインビボおよびインビトロ方法によって調製する。MACを、マイクロセルとして調製し、そしてマイクロセルを、PEGの存在または不存在下で植物プロトプラストと融合する (Dudits et al. (1976) Hereditas 82:121-123; Wiegland et al. (1987) J. Cell. Sci. Pt. 2 145-149)。代替的に、MACを単離し、直接的に植物細胞、プロトプラスト、及び他の植物標的に、PEG介在プロセス、燐酸カルシウム介在プロセス、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ソノポレーション、またはここに記載および米国特許番号 6,025,155 および 6,077,697, および 国際PCT出願公開番号 WO 97/40183に記載の任意の他の当業界既知方法によって送達する。
【手続補正７８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３０３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３０３】
植物で発現できるヒト生物医薬の例は、限定しないがアルブミン(Sijmons et al. (1990))、エンケファリン（enkephalins） (Vandekerckhove et al. (1989))、インターフェロン-α (Zhu et al. (1994) and GM-CSF (Ganz et al. (1996) in Transgenic Plants: A Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins, Owen and Pen Eds., John Wiley & Sons, West Sussex, England, pp. 281-297; and Sardana et al. (1998) in Methods in Biotechnology, Vol. 3: Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds, Cunningham and Porter, Eds., Humana Press, New Jersey; pp. 77-87)を含む。
【手続補正７９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３０４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３０４】
ここに提供する人工染色体を含む細胞は、有利には、タンパク質例えば生物化学経路またはマルチバレントワクチンに関係する多重タンパク質生産のためのインビトロ植物細胞に基づくシステムで使用し得る。タンパク質をコードする遺伝子を、人工染色体内に導入し、次いでそれを植物細胞内に導入する。この目的のため有用な植物細胞は、培養、でよく成長させるものであり、またはもっとも好ましくは、全植物体に再生可能な植物細胞である。植物を次いで、共通方法によって培養でき、当該異種タンパク質を含む植物材料を生産できる。異種タンパク質を、生成の対象とでき、またはその植物組織またはエキストラクトを直接的に、ワクチンか、疾患の緩和、または材料の加工、例えばパルプおよび紙加工のブリーチング、または産業材料またはフードストックの酵素的変換中のため使用できる。
【手続補正８０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３０５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３０５】
代替的に、所望の異種遺伝子を、生産細胞株または植物系統であって、人工染色体に遺

伝子をターゲティングする態様で人工染色体をすでに含むものに移入する。細胞または植物を、ここに異種タンパク質が発現される条件下で成長させる。タンパク質が、安定永続ゲノム外染色体系で高レベルで発現されるから、選択条件は要求されない。
【手続補正８１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３０７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３０７】
人工染色体を、植物細胞中の特異的分子の生産のためのプラットフォームとして改変できる。例えば、哺乳動物分子の複合体、例えば多重鎖抗体の生産は、植物種で通常は見出されないタンパク質活性のある数を要する。これらの活性を実施するために必要である遺伝子を、人工染色体内に導入することによって正確に修飾及び加工された、ヒト抗体を生産するため必要である哺乳動物活性のすべてを含む人工染色体を生産することが可能である。当該遺伝子は、例えば、植物プロモーターの制御下にそれぞれの遺伝子を配置することによって、または植物プロモーターの制御下の、マスターコントロール遺伝子、すなわち種々の遺伝子の発現を制御する遺伝子を配置することによって、修飾する。代替的に、哺乳動物転写制御因子を、植物活性プロモーターの制御下で、導入し得、植物細胞で発現し、そして当該標的タンパク質、例えば多重鎖抗体の発現を引き起こす。
【手続補正８２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３０８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３０８】
この様式では、植物人工染色体を開発し、それぞれは有益産物の特異的クラス、例えば抗体、血液凝固因子等の効率生産を支持することが可能である。こうして、あるクラス内の産物、例えばヒト抗体の生産は、ヒト抗体の生産のため特異的に改変される人工染色体内に修飾なく、特異的抗体コード配列の導入に単純に関係する。人工染色体は、ヒト抗体の妥当な発現、翻訳、および翻訳後修飾のための要求される遺伝的活性のすべてを含む。そのような人工染色体を、例えば限定しないが多くの具体的ヒト抗体の大規模生産を含む種々の応用で使用し得る。
【手続補正８３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１０】
異種タンパク質生産のための人工染色体に基づくシステムは多くの有利な特徴を有する。例えば。前記のように、異種DNAが独立的、ゲノム外人工染色体に位置するから（宿主細胞ゲノムの未知領域にランダムに挿入されるまたは一過性発現のみを提供する染色体外エレメントとして位置するのに対して）、それは安定的に活性転写単位で維持され、そして細胞分裂中の組み換えまたは排除を経由して放出の対象とならない。よって、宿主細胞の選択遺伝子を含むことは必要ではなく、こうして選択条件下の成長はまた必要ではない。さらに、人工染色体は大セグメントのDNAを取り込むことができるから、多重コピーの異種遺伝子および連結プロモーターエレメントを、これらの染色体に保持でき、それによって、外来タンパク質の高レベル発現を提供する。代替的に、遺伝子の多重コピーを、単一プロモーターエレメントに連結でき、そしていくつかの種々の遺伝子を、例えば完全代謝経路を構成するすべてのキータンパク質の発現のための単一プロモーターに融合ポリジーンコンプレックスにおいて連結できる(参照せよ、例えば、Beck von Bodman et al. (1

995) Biotechnology 13:587-591)。代替的に、単一遺伝子の多重コピーを、単一プロモーターに作動可能に連結でき、またはそれぞれまたは１またはいくつかのコピーを、異なるプロモーターまたは同じプロモーターの異なるコピーに連結できる。追加的に、人工染色体は、外来遺伝子の組み込みおよび発現のためのほとんど非限定的能力を有するから、それらを所望の末端産物をコードする遺伝子の発現のためだけでなく、宿主細胞の最適維持および代謝的作動と連関する遺伝子、例えば成長因子をコードする遺伝子、並びに望まれる異種タンパク質産物の正確な形態の急速合成を促進する遺伝子、例えば前記のような加工酵素および転写因子をコードする遺伝子の発現のため使用し得る。

【手続補正８４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１３】

人工染色体の、宿主細胞で異種タンパク質の高レベル発現を提供する能力は、例えば、哺乳動物人工染色体、ここに記載のH1D3および G3D5細胞株を含む哺乳動物細胞の分析によって実証する。これらの細胞から取得されるｍRNAのノーザンブロット分析は、細胞でのハイグロマイシン抵抗性およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現がそこに含まれるメガ染色体のアンプリコン数と相関することを明らかにする。

これらの化合物を生産するトランスジェニック植物を、ここに提供する人工染色体を使用して1または潜在的に多くの遺伝子の導入及び発現によって作成する。多くの可能性は、限定しないが、任意の生物によって現在生産される任意の生物学的化合物、例えばタンパク質、核酸、最初および中間メタボライト、炭水化物ポリマー、バイオレメディエーションでの使用のための酵素、二次植物メタボライト、例えばフラボノイドまたはビタミンを生産する経路を修飾するための酵素、医薬を生産うる、そして特定の化合物およびプラスチックのような製造産業に必要な化合物を生産し得る酵素を導入するための酵素を含む。化合物は植物によって生成され、収穫および/または加工で抽出され、そして現在認識される有用な目的例えば医薬、香気および産業酵素のため使用する。代替的に、ここに提供する方法および組成物にしたがって生産される植物を作成し、ある種の化合物、例えば有害廃棄物を代謝でき、それによってこれらの化合物のバイオレメディエーションを可能とする。

【手続補正８５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１５】

2.望まれる形質を加工するための生物の遺伝的変更

人工染色体を、生物、例えば植物を調製するため理想的に適合化し、それはある種の望まれる形質、例えば病害抵抗性、過酷な環境条件に対する抵抗し、変更成長パターンおよび改善物理的特性を保有する。植物について、特定の核酸の選択であって人工染色体を解するレシピエント細胞へ送達されるものはしばしば、形質転換の目的に依存する。作物および樹木種の形質転換の主要な目的のひとつは、いくつかの商業的に望ましい、農業的に重要な形質を、植物に付加することである。そのような形質は限定しないが、入力および出力形質例えば除草剤抵抗性または耐性、昆虫抵抗性または耐性、病害抵抗性または耐性（ウイルス、細菌、真菌またはネマトーダ）、旱魃、熱、冷、凍、過湿、塩ストレスおよび酸化的ストレスによって例示されるようなストレス耐性および/または抵抗性、増加収量、食物含量、および作成、物理的外観、有性不稔、乾燥、直立性、増殖性、デンプン量および質、油量及び質、タンパク質量および質、およびアミノ酸組成を含む。宿主植物にそのような望まれる形質を付与する1または2以上の遺伝子を取り込むのが望ましくあり得

る。
【手続補正８６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１６】
a.除草剤抵抗性
ホスヒノスリシンアセチルトランセフェラーゼ(bar および pat)、グリホサート耐性EPSPシンターゼ遺伝子、グリホサート分解酵素遺伝子gox コードグリホサートオキシオドレダクターゼ、deh (ダラポンを不活性化するデハロゲナーゼ酵素をコードする)、除草剤抵抗性(例えば、スルホニルウレアおよびイミダゾリノン)アセトラクテートシンターゼ、およびbxn遺伝子(ブロモキシニルを分解するニトリラーゼをコードする)はすべて、植物形質転換での使用のための除草剤抵抗性遺伝子の例である。barおよび pat遺伝子は、酵素、ホスヒノスリシンアセチルトランスフェラーゼをコードし(PAT)、それは除草剤ホスヒノスリシンを不活性化し、グルタミンシンターゼ酵素を阻害尾することからこの化合物を防止する。酵素5-エノールピルビルシキメート 3-ホスフェートシンターゼ (EPSPシンターゼ)は通常、除草剤N-(ホスホノメチル)グリシン (グリホサート)によって阻害される。しかし、グリホサート抵抗性EPSPシンターゼ酵素をコードする遺伝子は知れれる。dhe遺伝子は、酵素ダラポンデハロゲナーゼをコードし、除草剤ダラポンに対する抵抗性を付与する。bxn遺伝子は、ブロモキシニルを、非除草剤性分解産物に変換する特異的ニトリラーゼ酵素をコードする。
【手続補正８７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１７】
b.昆虫及び他の害虫抵抗性
昆虫抵抗性生物を調製し得、ここで昆虫誘導性病害への抵抗性または感受性の減少を、宿主生物または、病原体を破壊または減衰しまたは宿主への病原体の接近を限定する遺伝子産物（例えばある種の病原体へ毒性であるリボザイムおよびタンパク質）をコードするDNAを含む人工染色体の胚への導入によって付与する。潜在性昆虫抵抗性遺伝子であって人工染色体を解して植物内に導入できるものは、Bacillus thuringiensis結晶毒素またはBt遺伝子 (参照せよ、例えばWatrud et al. (1985) in Engineered Organisms and the Environment)を含む。Bt遺伝子は、lepidopteranまたは coleopteran害虫例えばEuropean Corn Borer (ECB)への抵抗性を提供し得る。そのようなBt毒素遺伝子は、CryIA(b) およびCryIA(c)遺伝子を含む。B. thuringiensisの他の種からのエンドトキシン遺伝子であって、これは昆虫成長または発達に影響するものを、この点で使用し得る。Bt遺伝子配列を修飾し、植物及び特に単子葉植物での増加発現をもたらし得る。合成遺伝子を調製するための手段は、当業界周知であり、例えば米国特許番号 5,500,365および 5,689,052に記載される。そのような修飾Bt毒素遺伝子の冷は、合成Bt CryIA(b)遺伝子 (参照せよ、例えば、Perlak et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:3324-3328)および合成 CryIA(c)遺伝子を含み1800bと呼ばれる (参照せよ、PCT 出願公開番号. WO95/06128)。
【手続補正８８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１８】

病害および/または昆虫抵抗性トランスジェニック植物を生成するために人工染色体による植物内に移入し得る遺伝子の型の例は、限定しないがcryIA(b) およびcryIA(c) 遺伝子を含み、それは2主要イネ昆虫害虫 (the striped stem borer and the yellow stem borer) (参照せよ、例えば、Cheng et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:2767-2772) に高度に毒性である産物をもたらし、cry3遺伝子は穀粒および豆類を含む種々の植物を攻撃するColeopteran昆虫に毒性である産物をコードし (参照せよ、例えば、米国特許番号 6,023,013)、遺伝子 (例えば、トリコテセン3-0-アセチルトランスフェエラーゼ)はトリコテセン(tricothecene)例えば植物真菌によって生産されるものに抵抗性を付与し(例えば、Fusarium) その植物は特に真菌に感受性である(例えば、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク及びトウモロコシ) (参照せよ、例えば、PCT 出願公開番号WO 00/60061)、および植物病原体の成長に悪い影響を有する抗病原体物質をもたらす多重遺伝子生合成経路に関係する遺伝子(参照せよ、例えば、米国特許番号 5,639,949)を含む。

【手続補正８９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３２４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３２４】

Tripsacum dactyloidesは、corn root wormを含むある種の昆虫に抵抗性である草の種である。 Tripsacumはこうして、昆虫に毒性であり、または昆虫に毒性の化合物の生合成に関係するタンパク質をコードする遺伝子を含みうる。そのような遺伝子は、昆虫に抵抗性を付与するのに有用であり得る。Tripsacumでの昆虫抵抗性の基礎は遺伝的であることが知られ、というのは当該抵抗性は、有性交雑によりトウモロコシに移入されたからである (Branson and Guss, 1972)。他のか穀類、単子葉または双子葉植物種は、昆虫抵抗性植物を生産するため有用である昆虫に毒性であるタンパク質をコードする遺伝子を有し得ることがさらに予期される。

【手続補正９０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３２６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３２６】

c.病害抵抗性

トランスジェニック生物、例えば植物は、病害への抵抗性を付与しまたは感受性を減少し、特に興味深い。例えば、トランスジーンは毒素または病原体、例えばウイルス、真菌、マイコトキシン生産生物、ネマトーダまたは細菌であるタンパク質をコードし得、しかし、トランスジェニック宿主へ毒性でない

多重遺伝子は、人工染色体上に導入し得るから、病害抵抗性または耐性に関係する遺伝的経路をコードする一連の遺伝子を、作物植物に導入し得る。病原体侵入すると発現される例えばしばしばおおくの遺伝子、典型的に1または2以上の''RR''または病原体関連性タンパク質を、植物細菌または真菌病原体の侵入に応答して発現させることが既知である。病原体に抵抗性を付与することに関係する1または22以上のタンパク質は、人工染色体内に含まれ得、したがって、植物細胞、特にここに記載の全トランスジェニック植物体に発現されうる。加えて、単一鎖Fv組み換え体抗体の、植物での生産は、作物植物の病原体保護の導入の可能性の範囲を拡張する(参照せよ、例えば、Tavladoraki et al. (1993) Nature 366:469-472)。

【手続補正９１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３２８
【補正方法】変更

【補正の内容】
【０３２８】
いわゆる''ペプチド抗体''、病原体発生性関連性(PR)タンパク質、毒素抵抗性、および宿主病原体相互作用に影響するタンパク質例えばモルフォロジカルをコードする遺伝子はまた、特に細菌および真菌によって引き起こされる病害への増加抵抗性を付与することによって有用であり得る。ペプチド抗体は、ポリペプチド配列であり、それは細菌および他の微生物の成長を阻害する。例えば、セプロピンおよびマガイニンと呼ばれるペプチドのクラスは多くの種の細菌および真菌の成長を阻害する。単子葉植物例えばトウモロコシでのPRタンパク質の発現は、細菌病害への抵抗性を扶養するのに有用であり得る。これらの遺伝子は、宿主植物の病原体攻撃に続いて誘導され、そしてタンパク質のリース5クラスないに分割された(Bio. Linthorst, and Cornelissen, 1990)。PRタンパク質に含まれるのは、β-1, 3-グルカナーゼ、キチナーゼおよびオスモチンおよび病害生物への植物抵抗性で機能すると信じられる他のタンパク質である。他の遺伝子が同定され、それは抗真菌特性例えばUDA (stinging nettle lectin) およびヘベイン（hevein） (Broakaert et al., 1989; Barkai-Golan et al., 1978)を有する。ある種の植物病害がファイトトキシンをの生産によって引き起こされることが既知である。これらの病害への抵抗性は、ファイトトキシンを分解またはその他不活性化することのできる酵素をコードする遺伝子の発現によって達成し得る。また宿主植物と病原体の間の相互作用を変更する遺伝子の発現は宿主植物の組織を侵入する病害生物の能力を減少するのに有用であり得、b例えば、葉キューチクルのワキシネスまたは他の形態学的特性の増加である。
【手続補正９２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３３０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３３０】
植物に水分含量、総水ポテンシャル、浸透ポテンシャル、および膨圧を好ましくもたらす遺伝子の発現は、植物の旱魃に耐える能力を増強する。ここに使用するように、用語''旱魃抵抗性''および旱魃耐性''は、通常状況と比較して、水分利用性の現象によって誘導されるストレスへの植物の増加抵抗性または耐性および低水分環境で植物が機能しおよび生存する能力に言及するために使用する。このクラス内に、マンニトール-L-フォスフェートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(Lee and Saier, 1982) およびトレハロース-6-フォスフェートシンターゼ (Kaasen et al., 1992)がある。細胞の本来のフォスファターゼのその後の作用によりまたは特異的フォスファターゼの導入及び共発現によって、これらの導入された遺伝子は、それぞれマンニトールまたはトレハロースの蓄積をもたらし、その両方は、ストレスの影響を緩和し得る保護化合物としてよく報告された。トランスジェニックタバコでのマンニトール蓄積は、確認され、予備的結果は、このメタボライトの高レベルを発現する植物は、適用浸透ストレスにたえることができるのを指摘する (Tarczynski et al., 1992, 1993)。
【手続補正９３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３３１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３３１】
同様に、酵素機能（例えば、アラノピンまたはプロピオン酸）または膜インテグリティ（例えばアラノピン）を保護する他のメタボライトの効率は、報告され（Loomis et al., 1989)、したがってこれらの化合物の生合成をコードする遺伝子の発現は、マンニトールに類似または補足する態様で旱魃抵抗性を付与し得る。浸透活性でありおよび/または旱魃および/または乾燥中のいくつかの直接的保護効果を提供する天然存在メタボライトの

他の例は、フルクトース、エリスリトール(Coxson et al., 1992)、ソルビトール、ヅルシトール (Karsten et al., 1992)、グルコシルグリセロール (Reed et al., 1984; ErdMann et al., 1992)、スクロース、スタチオース (Koster and Leopold, 1988: Blackman et al., 1992)、ラフィノース (Bernal-Lugo and Leopold, 1992)、プロリン (Rensburg et al., 1993)、グリシンベタイン、オノニトールおよびピニトール(Vernon and Bohnert, 1992)を含む。ストレスの時間中の継続キャノピー成長及び増加再生フィットネスは遺伝子例えば前記浸透活性化合物および他のそのような化合物を制御するもの導入および発現によって議論される。浸透活性ポリオール化合物の合成を促進する遺伝子は、酵素マンニトール-1-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、トレハロース-6-フォスフェートシンターゼおよびミオイノシトール0-メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含む。人工染色体は、遺伝子のマルチプリシティを有し、望まれるストレス耐性、例えばプロリンおよびケタンおよび/またはポリオールの同時的発現を提供できる。

【手続補正９４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３３３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３３３】
旱魃抵抗性を改善する多くのこれらの遺伝子は作用の相補的様式を有する。こうして、これらの遺伝子の組み合わせは、植物の旱魃抵抗性を改善することにおいて付加的および/または相乗的影響を有し得る。多くのこれらの遺伝子はまた、凍耐性（または抵抗性）を改善する：凍結および乾燥中に負わされる物理的ストレスは、性質的に類似し、そして類似様式で移入し得る。利益は、これらの遺伝子の構成的発現によって付与され得、しかしこれらの遺伝子を発現する好ましい手段は、膨圧誘導性プロモーター（例えばGuerrero et al., 1990 and Shagan et al., 1993 に記載される膨圧誘導性プロモーターであってそれは引用によりここに含める）の使用により得る。これらの遺伝子の空間および時間的発現パターンは、よりよい耐性ストレスを植物に可能とする。

【手続補正９５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３３４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３３４】
特異的形態学的形質に関係する遺伝子の発現は、有利である乾燥土壌からの増加水抽出を可能とすることが提唱される。例えば根特徴を変更する遺伝子の導入及び発現は、水取り込みを増強し得る。ストレスの時間中の再生フィットネスを増強する遺伝子の発現が顕著に有利であることを企図する。例えば、花粉流出および雌性花部分、すなわちシルクの斉一性を改善する遺伝子の発現は、有利である。加えてストレス中のカーネル落下を最小化する遺伝子の発現が、収穫されるべき穀粒の量を増加させゆえに有利であることが提唱される。

【手続補正９６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３３６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３３６】
e.植物農学的特性
例えば農業および鑑賞植物産業のような分野での生物の利用性、加工性および商業価値を強化し得る植物加工望まれる形質はまた、病害抵抗性生物の生産のための前記と同じ態様の人工染色体を使用して生成し得る。そのような例では、生物または胚に導入される人

工染色体は、生物の望まれる形質を付与するため供する遺伝子産物をコードするDNAを含む。
【手続補正９７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３３９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３３９】
直立性よび他の植物成長特性を改善する遺伝子はまた、植物内に導入し得る。より強い茎、改善された根系を付与するまたは穂脱落を防止または減少する植物の新しい遺伝子の発現は、農家にとって非常に有益である。例えば光分布および/またはインターセプトを増加させることによって光同化物の総量を増加させる遺伝子の導入及び発現はさらに、生産性の獲得を増加する。作物植物でフィトクローム遺伝子の発現は、有利であり得る。そのような遺伝子の発現は、頂芽優勢を減少させ、植物に半矮性を付与しおよび耐陰性を増加し得る(米国特許番号 5,268,526)。かかるアプローチは、ほ場の増加植物集団を可能とする。
【手続補正９８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３４２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３４２】
ある数の突然変異がトウモロコシで発見され、細胞質性雄性不稔を付与する。特にT細胞質と呼ばれる1突然変異が、サザンコーンリーフブライトへの感受性と相関する。DNA配列であってTURF-13と呼ばれるもの(Levings, 1990)は、T細胞質と相関すると同定された。形質転換を介してTURF-13の導入を介して、病害感受性から雄性不稔を分離することが可能である。育種目的のためおよび穀物生産のため雄性不稔を再生する能力は必要であるように、雄性不稔の再生をコードする遺伝子を導入し得ることが提唱される。
【手続補正９９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３４３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３４３】
h.改善栄養含量
遺伝子を植物に導入し、特定作物の栄養質または含量を改善し得る。作物の栄養組成を変更する遺伝子の導入は、飼料または食物価値を大きく向上し得る。例えば、多くの穀物のタンパク質は、ブタ、家禽およびヒトに給餌したとき飼料および食物目的のため特に最適下である。これらの種の食餌に必須であるいくつかのアミノ酸が欠乏するタンパク質は、穀物の補足の付加を要する。必須アミノ酸を限定することは、リジン、メチオニントリプトファン、トレオニン、バリン、アルギニンおよびヒスチジンを含む。いくつかのアミノ酸が、トウモロコシを食物組成のため他の入力で補う後にのみ限定的になる。これらの必須アミノ酸の種子及び穀粒中でのレベルは、限定しないが、アミノ酸の生合成を増加する、タンパク質のアミノ酸の貯蔵を増加するまたは種子または穀粒へアミノ酸の輸送を増加する遺伝子の導入を含む機構によって上昇し得る。
【手続補正１００】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３４５
【補正方法】変更
【補正の内容】

【０３４５】
作物植物の油含量を変更する遺伝子の導入はまた有益であり得る。油含量の増加は、代謝可能エネルギー含量の増加および飼料および食物での使用のための種子の密度という結果となりうる。導入される遺伝子は、脂肪酸または脂質生合成での比率限定または調節工程を除去または減少する酵素をコードし得る。そのような遺伝子は限定しないが、アセチル-CoAカルボキシラーゼ、ACP-アシルトランスフェラーゼ、β-ケトアシル-ACPシンターゼ、更に他の周知脂肪酸生合成活性をコードするものを含む。他の可能性は、酵素活性を加工しないタンパク質例えばアシル-キャリアータンパク質をコードする遺伝子である。遺伝子を導入し、それはより健康または利用性食品を提供する油中の脂肪酸存在のバランスを変更し得る。導入されるDNAはまた、脂肪酸生合成に関係する酵素の発現を阻止し、作物中の脂肪酸の比率を変更する配列をコードし得る。
【手続補正１０１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３４７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３４７】
作物改善の多くの他の例は、ここで提供する方法および組成物にしたがってそこに含まれる適当な異種遺伝子を有する人工染色体を使用して実施し得る。改善は、必ずしも獲得を含まなくてもよいが、例えばサイレージのための作物の値を改善し得る。これを達成するためのDNAの導入は、リグニン含量を変更する配列を含み得、それはウシのためのすぐれた飼料価値と連関する''brown midrib''表現型という結果となる。
【手続補正１０２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３４９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３４９】
油はウェットミリングの他の産物であり、その価値は、遺伝子の導入及び発現によって改善し得る。油特性を変更し、多分生産でのその成績およびクッキングオイルでの使用、ショートニング、ルブリカント、または他の油誘導性産物の改良または食物関連適用で使用したときの健康属性を改善する。脂肪酸はまた合成し、それは抽出すると化学的合成のための出発材料として供することができる。油特性の変化は、油に存在する脂肪酸の型、レベル、または脂質配列を変更することによって達成し得る。これは次いで、新しい脂肪酸の合成およびそれらの脂肪酸加工を触媒する酵素をコードする遺伝子の添加によって、または前駆体のレベルをおそらく減少しつつ本来の脂肪酸のレベルを増加することによって達成し得る。代替的に、DNA配列を導入し得、それは脂肪酸生合成の工程をゆっくりまたは阻止し得、前駆体脂肪酸中間体の増加という結果となる。付加し得る遺伝子は、デサチュラーゼ、エポキシダーゼ、ヒドラターゼ、デヒドラターゼおよび脂肪酸中間体に関係する反応を触媒する他の酵素を含みうる。阻止し得る触媒工程の代表例は、ステアリン酸からオレイン酸およびオレイン酸からリノレイン酸の不飽和化を含み、ステアリンおよびオレイン酸のそれぞれの蓄積という結果となる。別の例は、Ｃ８ないしＣ１２飽和脂肪酸の蓄積という結果となる伸張工程の阻止である。
【手続補正１０３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３５１】
植物で生産し得る医学的関連タンパク質の例は、ワクチンでの使用のための、ウイルス

病原体の表面抗原、例えばB型肝炎ウイルスおよび伝達可能胃腸炎ウイルススパイクタンパク質を含む。こうして生産されるタンパク質を単離し、標準ワクチン導入方法を経由してまたは経口摂取できる食品として可食トランスジェニック植物の消費を経由して、投与し得る(参照せよ、例えば、米国特許番号 6,136,320 および Mason et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:11745-11749)。 HIV、ライノウイルス、マラリアおよび狂犬病ウイルス抗原は、追加的例であり、それは植物で候補ワクチンとして発現し得る (参照せよ、例えば、Porta et al. (1994) Virol. 202:949-955; Turpen et al. (1995) Bio/Technology 13:53-57; および McGarvey et al. (1995) Bio/Technology 13:1484-1487)。抗体はまた、植物で生産し得、例えば抗原結合単一鎖Fvタンパク質 (AscFv)をコードする遺伝子融合を含み、それはハプテンオキサゾロン (Fiedler and Conrad (1995) Bio/Technology 13:1090-1093)および IgG (Ma et al. (1995) Science 268:716-719)を認識する。

【手続補正１０４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３５３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３５３】
これらの化合物を生産するトランスジェニック植物は、ここに提供する人工染色体を使用して1または潜在的に多くの遺伝子の導入及び発現によって可能とする。広範囲の可能性は、限定しないが、任意の生物学的化合物を含み、それは現在、任意の生物によって生産され、例えばタンパク質、核酸、一次代謝物および中間代謝物、炭水化物ポリマー、バイオレメディエーションでの使用のための酵素、二次植物メタボライト、例えばフラボノイドまたはビタミンを生産する経路を修飾する酵素、医薬を生産し得るおよび製造産業例えば専門化学物質およびプラクチスへの興味の化合物を生産し得る酵素を導入するための酵素を含む。化合物は、植物によって生産し得、収穫および/または加工されると、抽出され、そして任意の現在認識される有用な目的、例えば医薬、香料、およびいくつかの名前の産業酵素のため使用し得る。代替的に、ここで提供する方法および組成物によって生産される植物を、作成し得、ある種の化合物、例えば有害廃棄物を代謝し得、それによってこれらの化合物のバイオレメディエーションを可能とする。

【手続補正１０５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３５４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３５４】
j.非タンパク質発現配列
核酸を、植物に導入し得、それは植物コード遺伝子を下方調節または抑制するように設計される。下方調節を達成するある数の異なる手段は当業界で実証され、アンチセンスＲＮＡ、リボザイムおよびコサプレッションを含む。植物遺伝子を抑制するためのアンチセンスＲＮＡの使用は、例えば米国特許番号 4,801,540, 5,107,065 および 5,453,566において記載された。かかる方法では、''アンチセンス''遺伝子を構築し、それは存在植物遺伝子のｍＲＮＡに相補的であり、その結果アンチセンス遺伝子の発現が存在植物遺伝子のmRNAの翻訳を阻害する。こうして、存在遺伝子の活性は下方調節される。

【手続補正１０６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３６３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３６３】

リボザイム設計の他の別形は、所定の標的RNA上の切断部位の選択である。リボザイムを、所定の配列に、相補的塩基対相互作用によって部位にアニーリングする手段によってターゲティングし得る。相同性の2ストレッチは、このターゲティングに要する。相同性配列のこれらのストレッチは、前定義触媒リボザイム構造にフランクする。相同性配列のそれぞれのストレッチは、長さ７ないし１５ヌクレオチドで変化し得る。相同性配列を定義するための唯一の要件は、標的配列上で、それらは切断部位である特異的配列によって分離されることである。ハンマーヘッド性リボザイムのために、切断部位は、ウラシル(U)、その後にアデニン、シトシンまたはウラシル（A、CまたはU)のいずれかが続いてなる標的RNA上のジヌクレオチド配列である(Perriman et al., 1992; Thompson et al., 1995)。任意の所定のRNA中に存在するこのジヌクレオチドの頻度は、統計学的に16からの3である。したがって1000塩基の所定の標的メッセンジャーRNAのために、187ジヌクレオチド切断部位が実質的に可能である。

【手続補正１０７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３６６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３６６】
(4.) 非-RNA-発現配列

輸送可能エレメントのもの、例えばDs、Ac、またはMUのものを含むDNAエレメントを、遺伝子内に挿入し、突然変異を引き起こし得る。これらのDNAエレメントを挿入し、遺伝子を不活性化し（または活性化）、それによって特定形質に''タグ付加''し得る。この例では移動可能エレメントは、タグ付加突然変異の不安定性を生じず、というのは、エレメントの利用性は、ゲノムでの移動の能力に依存しないからである。ひとたび望まれる形質がタグ付加されると、導入されるDNA配列を使用し、例えば導入DNA配列をPCRプライマーとして、PCR遺伝子クローニング技法と使用して、対応する遺伝子をクローン化し得る(Shapiro, 1983; Dellaporta et al., 1988)。ひとたび同定すると、望まれる場合制御または調節領域を含む特定形質の完全遺伝子を単離し、クローン化し、そして望まれるように操作し得る。遺伝子タグ付加の目的のために生物内に導入されるDNAエレメントの利用性は、DNA配列に独立性であり、そしてDNA配列の任意の生物学的活性すなわちRNAへの転写またはタンパク質への翻訳に依存しない。DNAエレメントの単独機能は、遺伝子のDNA配列を破壊することである。

【手続補正１０８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３６７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３６７】

合成配列を含む非発現DNA配列は、これらの細胞および植物およびその種子の専用の''標識''として細胞内に導入し得る。宿主生物に外生である遺伝子の機能を破壊することは、標識DNAエレメントに必要でなく、このDNAの単独機能は、生物の期限を同定すべきとおりである。例えば、あるものは、植物に独特のDNA配列を導入し得、そしてこのDNAエレメントは、すべての細胞、植物およびこれらの細胞の後代を、その標識源から生じたとして同定し得る。標識DNAの包含は、あるものを専用の遺伝子源をまたはそのようなのから由来する遺伝子源を、非標識遺伝子源から区別することが提唱される。

【手続補正１０９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３６８
【補正方法】変更
【補正の内容】

【０３６８】
導入し得る他の可能なエレメントは、マトリクス付着領域エレメント(MAR)であり、例えばチキンリソザイムAエレメントであり(Stief, 1989)それは所望の発現可能遺伝子周辺に位置し得、遺伝子の全体発現の増加を実施し、そして植物ゲノムに包含すると、ある依存性効果を縮減する (Stief et al., 1989; Phi-Van et al., 1990)。配列例えばMARは、人工染色体に含まれ、遺伝子発現を増強し得る。
【手続補正１１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３６９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３６９】
3.遺伝子の評価および新しい形質の発見のためのトランスジェニックモデル
顕著に興味深いのは、新しい遺伝的組み合わせおよび新しい形質の発見の評価のための人工染色体を含む植物および植物細胞の使用である。人工染色体は、それらは顕著な量のDNAを含むという事実によって、したがって多くの遺伝子よって形質のマルチプリシティをコードする。ここに、人工染色体は、ある植物種から形成されるとき、第二植物種で評価できることが企図される。観察された得られた表現型変化は、例えば、人工染色体を含むDNA内に含まれる遺伝子の性質を指摘でき、ゆえに、新しい遺伝的活性の同定を可能とする。ユークロマチン性DNAを含むまたはユークロマチン性DNAを一部含む人工染色体は、エイリアン植物細胞環境に移入されるとき、新しい形質の有益な源として供する。例えば双子葉植物由来の人工染色体を、双子葉人工染色体を移入することによって導入できる。双子葉人工染色体は、ユークロマチン性DNAの領域を含み、発現遺伝子を含む。
【手続補正１１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３７４】
相同組み換え事象の選択を可能とするマーカー遺伝子を含むことが簡便である。マーカー遺伝子は好ましくは、適当な相同組み換え事象によって活性化されない限り、不活性である。例えば、US 5,272,071は、不活性植物遺伝子が組み換え事象によって活性化され、その結果望まれる相同組み換え事象が容易にスコアー化できるような方法を、記載する。同様に、US 5,501,967は、植物DNA内に最小に導入されるサイレント選択遺伝子の活性化によって相同組み換え事象の選択であって、外遺伝子は、適当な相同組み換え事象によって活性化されるものを開示する。これらの方法の両方を適用し、人工染色体と植物染色体の間の組み換えのため選択において含まれるべき選択プロセスを確保することができる。ひとたび相同組み換え事象が検出されると、ひとたび選択された人工染色体を単離および、レシピエント細胞例えばタバコ、トウモロコシ、コムギまたはイネに導入し、および新しく導入したDNA配列の発現を評価する。組み換え事象の選択は、細胞培養、および実生植物または種子それ自体の形成およびスクリーニングで起こることができる。
【手続補正１１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３７５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３７５】
人工染色体を含むレシピエント植物細胞での、または人工染色体を含む再生植物での表現型変化は、興味の遺伝子、例えばArabidopsisDNAによってコードされる形質によって、通常染色体環境での形質の発達制御の原因となるDNA配列の天然存在編成を含む、植物細

胞で天然に見出される条件下での、コードされる形質の性質の評価を可能とする。
【手続補正１１３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３７７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３７７】
人工染色体の大規模順序および構造は、異種植物種内の新しい利用性または新しい表現型をスクリーニングすることにおけるある数の独特の有利性を提供する。新しいDNAのサイズであって、人工染色体によって有されることができるものは、何百万のDNAの塩基対であることができ、異種植物細胞での異なるまたは新しい利用性を有し得る潜在的多くの遺伝子をあらわす。人工染色体は、遺伝子発現のための''天然''環境であり、望ましい遺伝子発現およびゲノム内にランダム挿入によって移入される遺伝子について見られるサイレンシングの問題は、観察されるべきでない。同様に、発現のための遺伝子を改変する必要はなく、および挿入遺伝子は組み換え遺伝子である必要はない。こうして、移入遺伝子は完全に、遺伝子が当初単離されるところからの種で観察されるような典型的時間及び空間様式で発現されることが期待される。これらの利用性のための有益特徴は、人工染色体を単離する能力であり、さらに、独特の遺伝的組成を有する人工染色体を他の細胞内に操作および導入するものである。
【手続補正１１４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３７９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３７９】
多くの部位特異的レコンビナーゼは、文献に記載された (Kilby et al., Trends in Genetics, 9(12): 413-418, 1993)。これらのうちに: Zygosaccharomyes rouxiiのpSR1プラスミドによってコードされるとして同定さえる活性、ファージP1からのSaccharomyces cerevisiaeおよび Cre-loxからの２μm環状プラスミドをコードするFLPがある。
【手続補正１１５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３８１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３８１】
この特定の方法は、人工染色体内への染色体DNAの正確部位特異的挿入に関係する。この正確は、当業界で実証された。例えばFukushige and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7905-7909, 1992) は、哺乳動物細胞の染色体の前定義遺伝子座内にDNAを導入するのを首尾よく実施し得るCre-lox相同組み換えシステムを実証した。この実証では、コード領域の5'末端のlox配列を含むよう修飾されたプロモーターレス抗生物質抵抗性遺伝子を、CHO細胞に導入した。細胞を、lox配列をふくみCreレコンビナーゼ遺伝子を一過性に発現するプロモーターを含むプラスミドでのエレクトロポレーションによって再移入した。使用条件下で、Cre酵素の発現は、染色体位置プロモーターレス抗生物質抵抗性遺伝子に位置するLox部位および導入プロモーター配列のLox部位の間の相同組み換えを触媒し、機能性抗生物質遺伝子の形成につながった。著者は、導入配列、分析した56中54の系統の効率的及び正確ターゲティングが、lox配列間の、Cre触媒性部位特異的相同組み換えのために、予測単一コピー挿入に対応したことを実証した。
【手続補正１１６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３８３

【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３８３】
レコンビナーゼ認識配列に連結されたプロモーターレスマーカー遺伝子または選択マーカー遺伝子は、植物細胞の染色体内に最初に挿入され、これを使用してプラットホーム染色体を改変できる。プロモーターを、人工染色体内で組み換えるとプロモーターがマーカーまたは選択マーカー遺伝子の発現を制御するのを可能とする方向で、レコンビナーゼ認識部位に連結する。植物染色体のレコンビナーゼ認識部位と導入植物染色体内のレコンビナーゼ認識部位の間で部位特異的組み換え事象があると、組み換え人工染色体と由来する細胞、活性マーカーまたは選択マーカー活性を含む人工染色体は、細胞の同定および/または選択を可能とする。
【手続補正１１７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３８４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３８４】
人工染色体を他の植物種に移入し、新しい組み合わせの機能性を試験する。配列のそのような内部染色体移入を実施する能力は、当業界で実証された。例えば異なる染色体の2染色分体の間の染色体組み換え事象を引き起こすべきCre-loxレコンビナーゼシステムの使用は、示された。
任意の数の組み換えシステムを使用し得る(本明細書に記載の日と同日の米国仮出願番号10/161,403を参照せよ)。そのようなシステムは限定しないがファージラムダのInt/attおよびGin/gixシステムのような細菌に由来するシステムを含む。
【手続補正１１８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３８５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３８５】
例えば人工染色体内へのDNAの導入のための1レコンビナーゼシステム、および第二植物種の天然存在染色体内への人工染色体内に含まれる新しく導入されたDNAのその後の移入のための第二レコンビナーゼシステムの導入を含む、1より多い組み換えシステムを使用し得る。使用する特異的組み換えシステムの選択は、企図される修飾の性質に依存する。
人工染色体および特に部位特異的組み換えにより導入される植物染色体DNAを含む人工染色体を単離し、染色体を他の細胞特に植物細胞内に再導入する能力を有することによって、これらの新しい組み合わせを、遺伝子を最初に単離し修飾する必要なく異なる作物種において評価でき、または同じ組み合わせ単離および植物での遺伝子の組み合わせ試験を達成するための遺伝子移入を実行し得る。部位特異的レコンビナーゼおよび人工染色体の使用はまた、他の組み換えDNAベクターおよび操作および研究のためのシステムへの植物染色体領域の簡便な回収を可能とする。
【手続補正１１９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３８７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３８７】
植物形質に関連する遺伝子を発見するためここに提供する方法の更なる実施態様では、そこに評価のため宿主細胞へ植物DNAを移入するため使用される人工染色体は、人工染色体が生産されるプロセスの結果として、植物DNAの大領域、特に植物ユークロマチンを含

む。特に、人工染色体は、限定しないが以下のものを含む増幅に基づく人工染色体であり得る： (1)ジセントリック染色体の破損から生じるミニ染色体、(2)リピーティング核酸ユニットの１または２以上を含む人工染色体、ここでリピーティング領域は、実質的に均等量のユークロマチンおよびヘテロクロマチン核酸を含む、(3)リピーティング核酸ユニットの１または２以上の領域を含む人工染色体、ここでリピート領域は卓越的にユークロマチン性DNAから作成され、または約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または90%より多いユークロマチン性DNAを含む、(4)リピーティング核酸ユニットの１または２以上の領域を含む人工染色体、ここで人工染色体は、実質的に均等量のヘテロクロマチンおよびユークロマチンから作成される、(5)ユークロマチンおよびヘテロクロマチン性核酸を示す共通核酸配列を有するリピーティング核酸ユニットの1または2以上領域を含む人工染色体および(6)植物染色体のユークロマチン含有アームの一部または全部を含むソーセージ様構造。

【手続補正１２０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３９０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３９０】
懸濁培養の確立

Arabidopsis thaliana cv. Columbia RLD and Landsburg I erecta'の根カルスから由来する細胞懸濁培養を使用した。カルスを3% スクロース、0.5mg/l ナフタレン酢酸(NAA), 0.05 mg/l カイネチン (Sigma Aldrich Canada)で補足したMS基本培地 (Murashige and Skoog (1962) Physiol. Plant 15:473-497)を含むカルス誘導培地上の3週齢実生の根から誘導した。細胞懸濁培養を、120rpmの振とうで22℃で液体カルス誘導培地中でカルスから成長させた。それらを7日ごとに継代した。

プロトプラストの生成

【手続補正１２１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３９１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３９１】

1グラムの4-5 日齢の懸濁培養物を、35 g/l $CaCl_2$・$2H_20$ 中の1% セルラーゼ''Onozuka ''R-10 および 0.25% Macerozyme R-10 を含む6ml酵素溶液中でインキュベートし(Hartmann et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:741 -754) 、15時間70rpmで振とうしつつ暗黒で22℃でインキュベートした。プロトプラスト混合物を、100μmナイロンメッシュシーブを経由して注ぎ、250xgで5分間遠心分離した。プロトプラストを、35g/l $CaCl_2$・$2H_20$で洗浄し、144 g/l スクロースおよび 1 mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)を有する、B5 培地を含む10mlフローティングメディウム中に懸濁した(Gamborg et al. (1968) Exp. Cell Res. 50:151-158)。プロトプラストを、10分間80xgで遠心分離し、インターフェースで収集し、トランスフェクションのため直ちに使用した。

【手続補正１２２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３９４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３９４】
実施例4
アブラナ属植物胚軸プロトプラストの生成

Brassica napus, B. oleracea, B. juncea および B. carinata の遺伝子型を使用し、

プロトプラストを生成し得る。Brassica napusの種子を、表面滅菌した（2分間 70% エタノール次いで20分間 2.4% 次亜塩素酸ナトリウムで100miあたり1滴のTween 20を含むもの）。種子を滅菌蒸留水で完全にすすぎ、そしてオートクレーブした発芽培地上で無菌的に成長させた（半分濃度の基本Murashige and Skoog's培地(MS)，1% スクロース、0.8% アガー、pH 5.8)。特に指摘しない限り、プロトプラスト生成手法は、無菌的に実施し、溶液及び培地はろ過滅菌した。代替的に、プロトプラスト生成し、種々のプロトコル修飾を使用して種々のエクスプラントより首尾よく培養できる（例えば、Kao et al. (1991) Plant Science 75:63-72; Kao et al. (1990) Plant Cell Rep. 9:311-315; Kao and Seguin-Swartz (1987) Plant Cell Tiss. Org. Cult. 10:79-90; Kao (1977) Mol. Gen. Genet. 150:225-230）。

【手続補正１２３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３９５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３９５】
胚軸プロトプラストの生成

胚軸を、暗黒で無菌的に暗黒でまたは使用２，３時間に光暴露なしで成長させた４または５日齢の実生から切除した。エクスプラントを、2-5mm断片に横断的に切断し、ペトリ皿で、暗黒で14-18時間アジテーションなしで、次いでロータリーシェーカーで（約50rpm)で15-30分間のアジテーションで酵素溶液中でインキュベートした（Kao's mediumの塩、ビタミンおよび有機酸(Kao (1977) Mol. Gen. Genet. 150:225-230)，0.4 g/l $CaCl_2$・$2H_2O$，13% スクロース、1% セルラーゼ'Onozuka R10'，0.1% Pectolyase Y23，pH 5.6)。

【手続補正１２４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３９８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３９８】
5-8日培養後、68.4g/lのかわりに55.8g/lのグルコースのほかは前記の培地を含む1-1.5 mlのフィーダー培地を、それぞれのさらに添加し、皿をより明るい蛍光灯光下に置いた(50 $\mu Em^{-2} s^{-1}$)。約14日に、1-2 mlの培地をそれぞれの皿から除去し、基本B5培地(Gamborg et al. (1968) Exp. Cell Res. 50:151-158)、3% スクロース、3.8%グルコース，0.5 mg/l BA，0.5 mg/l NAA，および 0.5 mg/l 2,4-D，pH 5.7を含む2-3 mlのフィーダー培地を添加した。約21日に、もしマイクロコロニーがまだ形成されてないならば、培養に3.8%のかわりに2.2%のグルコースを有するほか最終フィーダー培地を供給することができる。プロトプラスト培養物を必要なときに新しいフィーダー培地を添加し、穏やかにペトリ皿を攪拌し、細胞を定着させ、上清のほとんどを除去し、皿に新鮮培地を添加することによって洗浄できる。

【手続補正１２５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３９９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３９９】
3-5週に、マイクロコロニーを最終フィーダー培地と増殖培地の1:1混合物を含む培地で固定化し、それはフィーダー培地の成分と、0.9%グルコースおよび1.6%アガロースを含み、最終混合物中の濃度0.8%とする。培養を前記のように明るい蛍光灯(80-100 $\mu Em^{-2} s^{-1}$)下でインキュベートした。10日ないし2週間で、緑色コロニーを、再生培地上に配置した。

【手続補正１２６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４００
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４００】
実施例5
植物人工染色体形成の誘導のため有用な形質転換ベクターの調製
植物人工染色体(PACs)を、核酸、例えばDNAを導入することによって生成でき、それは増幅誘導DNAおよび/またはターゲティングDNA、例えばrDNAまたはλDNAを、植物細胞に含ませ、細胞を成長させ、次いで核酸の導入に先立ち細胞中に存在する任意の染色体のそれと異なる構造を有する染色体を含む得られた細胞中から同定できる。PACの構造は、染色体DNA、例えばセグメント化、リピート領域含有およびヘテロクロマチン構造の増幅を反映する。またPAC例えば1より多いセントロメアおよび/またはそのフラグメントを含む染色体の前駆体である構造を含む細胞を選択し、それらを培養および/または操作し、最終的に細胞内にPACを生成することが可能である。
【手続補正１２７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４０１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４０１】
PACを生成する方法では、核酸を種々の植物細胞内に導入できる。核酸は、ターゲティングDNAおよび/または植物発現可能DNAであって1または多重の選択マーカー(例えば、ビアロフォス(bar)抵抗性をコードするＤＮＡ)またはスコア可能DNA (例えばGFPをコードするDNA)を含むことができる。ターゲティングDNAの例は限定しないが、N. tabacum rDNA遺伝子間スペーサー配列 (IGS)および Arabidopsis rDNA例えば 18S, 5.8S, 26S rDNA および/または遺伝子間スペーサー配列を含むことができる。DNAを、種々の方法を使用して導入でき、限定しないがアグロバクテリウム介在方法。PEG介在DNA取り込み、およびエレクトロポレーションであって、例えば標準的手法Hartmann et al [(1998) Plant Molecular Biology 36:741]に従うものを含む。そのようなDNAが導入される細胞を、選択条件下で成長させ、次いで選択培地に移動する。細胞またはプロトプラストを、選択剤を含むプレート上に配置し、例えば個々のカルスに成長できる。抵抗性カルスは、スコア可能マーカー発現についてスコアできる。抵抗性培養物の中期スプレッドを調製し、特異的プローブを使用しFISH分析によって中期染色体を試験し、染色体の領域の増幅を検出できる。機能セントロメアまたは人工染色体中間体構造を有する人工染色体を有する細胞は限定しないがジセントリック染色体、以前ジセントリック染色体、ミニ染色体、ヘテロクロマチン構造（例えばソーセージ染色体）および安定事項複製人工染色体中間体で前記のようなものを含み、これらを同定および培養する。特に、自己複製人工染色体を含む細胞を同定する。
【手続補正１２８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４０８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４０８】
c.pAg1の生成
pAg1を生成するために、pBSCaMV35SHygをHindIII/PstIで消化しHindIII/PstI-消化p3300attBZeoにライゲートした。こうしてpAg1は、別個のCaMV 35Sプロモーターの制御下のホスヒノスリシンおよびハイグロマイシン抵抗性を付与するDNAを有するpCambia 3300バッ

クボーン、attB-プロモーターレスゼオマイシン抵抗性コード化DNA組み換えカセットおよび追加的マーカー、例えばGFPをコードするDNAを付加するための独特な部位を含む。attB部位は、植物または動物、例えば哺乳動物への新しいDNA配列、例えば人工染色体の付加を容易化し、PACの生産においてpAg1ベクターまたはその誘導体を使用する結果として形成されるPACを含む。attB部位は、相同att部位のレコンビナーゼ介在挿入のための簡便な部位を提供する。

【手続補正１２９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４１２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４１２】
増幅後、フラグメントをpGEM-T Easy内にクローン化しpIGS-Iを与えた。

マウスサテライトDNA (Msat1 fragment; GenBank Accession No. V00846;および 配列番号 12) のフラグメントを、以下のプライマーを使用してpSAT-1からPCRによって増幅した:

MSAT-F1
5'- AAT ACC GCG GAA GCT TGA CCT GGA ATA TCG C -3'(配列番号 13) および
MSAT-Ri
5'-ATA ACC GCG GAG TCC TTC AGT GTG CA T- 3' (配列番号 14)

この増幅は、SacIIおよび HindIII部位をPCRフラグメントの5'末端におよび SacII部位を3' 末端に付加した。このフラグメントを次いでpIGS-1のSacII部位内にクローン化し、pMIGS-1を与え、真核染色体特異的DNAおよびFISHによる検出に簡便なDNA配列を提供する。

NOS-プロモーター:GUS:NOSターミネーター融合を含む機能性マーカーを次いで構築し、NOSプロモーター (GenBank Accession No. U09365; 配列番号 15)、E. coli β-グルクロニダーゼコード配列(GUS遺伝子から; GenBank Accession No. S69414;および配列番号 16)、およびノパリンシンターゼターミネーター配列 (GenBank Accession No. U09365; 配列番号 18)を含むものである。pGEM-T-NOS 中のNOSプロモーターを、pBlueScript (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.)中のプロモーターレスGUS遺伝子に、NotI/SpeIを使用して付加し、pNGN-1を形成し、それはGUS遺伝子について反対方向のNOSプロモーターを有する。

【手続補正１３０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４１６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４１６】
実施例6
植物細胞のアグロバクテリウム介在形質転換

植物細胞を、標準手法にしたがってアグロバクテリウム介在形質転換によって形質転換した(参照せよ、例えば、Horsch et al. (1988) Plant Molecular Biology Manual, A5:1-9, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Belgium)。簡単には、アグロバクテリウム菌株GV 3101/pMP90 (Koncz and Schell (1986) Molecular and General Genetics 204:383-396参照)を、pAgIIa およびpAgIIb (実施例5参照)で、熱ショックによって形質転換し、そして形質転換後のpAgIIaおよび pAgIIbのプラスミドインテグリティを、HindIII消化パターンによって確認した。pAgIIa/pMP90またはpAgIIb/pMP90を、25 μg/ml カナマイシンおよび25 μg/ml ゲンタマイシンを含む、5 ml AB培地で(Horsch et al. (1988) Plant Molecular Biology Manual, A5:1-9, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Belgium) 28℃2日間培養した。

【手続補正１３１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４１８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４１８】
形質転換した葉ディスクおよび根セグメントを次いで、アグロバクテリウムの排除のため20mg/lハイグロマイシンおよび300mg/ハイグロマイシンおよび300mg/l Timentinを含む、それぞれMS104またはCIM0.5/0.05の選択培地に移した。選択培地を、2週間ごとに交換し、緑色シュートを再生した。植物を、標準組織化学および蛍光アッセイによってGUSをコードするDNAの発現についておよび定量的PCRによって挿入DNAの増幅の証拠について分析した。多くの植物を取得し、それは高レベルのGUSを発現し、そして多重コピーのGUS遺伝子を、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH)およびPCR分析によって観察した。こうして挿入DNAを含む染色体領域の増幅を観察した。当業者は、GUS発現または任意の他の遺伝子の発現が、当業界周知方法によって評価できることを認識する。
【手続補正１３２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４２７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４２７】
実施例9
アブラナ属植物プロトプラストのトランスフェクションおよび培養
63μmナイロンシーブのろ過および遠心分離後の最終洗浄工程後のアブラナ属植物プロトプラスト（実施例4参照)を収集し、実施例8に記載のようにDNAトランスフェクションについて使用した。アグロバクテリウムによるDNA取り込みまたは形質転換後のアブラナ属植物プロトプラスト培養を、液体培地でまたは固定化半固体培地でハイグロマイシンまたはグルホシネートのいずれかで選択できる。ハイグロマイシンの有効な濃度は、10ないし40mg/lで2ないし4週間または連続的日であり、一方グルホシネートアンモニウムについてのそれは、2ないし60mg/lで5日ないし2週間である。選択は、成長を抑制し得、そして類似培地への追加的移動を要し得る。
【手続補正１３３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３２】
FISHを使用し、染色体上で特異的DNAを検出する。特にここに記載の相同DNAの導入の結果として増幅を経験した植物染色体の領域を検出し、または植物細胞での人工染色体形成を検出する。異種DNAが導入された、Arabidopsisおよびタバコ植物細胞のFISH染色体スプレッドは、コルヒチンまたは類似の細胞周期アレスティングエージェントおよび種々のDNAプローブ（例えばrDNAプローブ、ラムダDNAプローブ、選択マーカープローブ)を使用して生成する。細胞を染色体の増幅領域特にrDNA領域の増幅の存在について分析し、増幅を示すこれらの細胞をさらに、培養し、人工染色体の形成について分析する。
【手続補正１３４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３３】

植物細胞の染色体を異種DNAの導入の対象とし、人工染色体を生成する成長をまた、走査電子顕微鏡によって分析できる。走査電子顕微鏡のための有糸分裂染色体の調製を、当業界既知方法を使用して実施し得る(参照せよ、例えば、Sumner (1991) Chromosome 100: 410-418)。染色体を例えばHitachi S-800 場放射走査電子顕微鏡であって加速圧12kVであるものをで観察できる。

【手続補正１３５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３４】
実施例14
増幅の検出および染色体のIduラベリングによる人工染色体形成

植物細胞の染色体の構造を、ヨードデオキシウリジン（IdU)または他のヌクレオチドアナログでの染色体のラベリングおよびIdU特異的抗体を使用して分析でき、染色体構造を可視化することができる。異種DNAの導入後に選択された植物細胞を、標準プロトコルに従うIdUでラベリングする (Fujishige and Taniguchi (1998) Chromosome Research 6:611-619; Yanpaisan et al. (1998) Biotechnology and Bioengineering, 58:515-528; Trick and Bates (1996) Plant Cell Reports, 15:986-990; Binarova et al. (1993) Theoretical and Applied Genetics, 87:9-16; Wang et al. (1991) Journal of Plant Physiology, 138:200-203)。培養の植物細胞を典型的には懸濁培養を使用する。一連のサブカルチャーを開始し、そしてIdUラベリングを前記のように実施する。培養のダブリング時間に依存して、細胞を1週間までにわたりIdUを取り込ませる。ラベルした染色体を、植物細胞において（Fujishige and Taniguchi (1998) Chromosome Research 6:611-619; Binarova et al. (1993) Theoretical and Applied Genetics 87:9-16)および哺乳動物細胞において (Gratzner and Leif (1981) Cytometry 1:385-393) 当業界周知技法を使用して検出できる。IdUでラベルした染色体を免疫細胞化学的技法によって検出する。抗IdUフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-コンジュゲート性B44 クローン抗体(Becton Dickinson)を使用し、DNAにおいてIdU-DNA adductを結合し、そして蛍光顕微鏡によって検出する (490 nm 励起, 519 nm 放射)。ラベルした染色体の分析は、増幅したDNA領域の存在および人工染色体の形成を明らかにする。

【手続補正１３６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３５】
実施例15
プロトプラストからの中期染色体の単離

人工染色体は、ひとたび植物細胞で検出されると、他の生物、特に他の植物種に移入し得る。いくつかの手法を使用し、有糸分裂アレスト植物細胞からの中期染色体を単離し得、限定しないがポリアミンに基づくバッファーシステム (Cram et al. (1990) Methods in Cell Biology 33:377-3821)、修飾ヘキシレングリコールバッファーシステム (Hadlaczky et al. (1982) Chromosoma 86:643-65)、硫酸マグネシウムバッファーシステム (Van den Engh et al. (1988) Cytometry 9:266--270 and Van den Engh et al. (1984) Cytometry 5:108)、酢酸固定バッファーシステム(Stoehr et al. (1982) Histochemistry 74:57-61)、およびハイポトニックKClおよびプロピジウムイオジドを利用する技法 (Cram et al. (1994) XVII meeting of the International Society for Analytical Cytology, October 16-21, Tutorial IV Chromosome Analysis and Sorting with Commercial Flow Cytometers; Cram et al. (1990) Methods in Cell Biology 33:376; de Jong et al. (199

9) Cytometry 35:129-133)を含む。
【手続補正１３７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３７】
実施例16
植物細胞内への人工染色体の移入：双子葉植物内への哺乳動物人工染色体の移入
植物細胞内への哺乳動物人工染色体（MACs)の送達のある方法は、マウスMACを含むマイクロセルの形成および$CaPO_4$-介在取り込みおよびこれらのマイクロセルの植物細胞とのPEG-介在融合である。この例では、マイクロセルおよび植物プロトプラスト例えば限定しないがタバコおよびArabidopsisプロトプラストを、混合し（一連の25:1, 10:1, 5:1,または 2:1 マイクロセル:プロトプラスト比率)そして融合を観察した。マイクロセルの形成のためのプロトコルは、当業界既知であり例えば、米国特許番号 5,240,840, 4,806,476および5,298,429および、Fournier Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1981) 78:6349-6353においておよびLambert et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1991) 88: 5907-5912に記載される。マウスマイクロセルを、限定しないがArabidopsisおよびタバコプロトプラストを含む植物プロトプラストとの融合に先立ちIduまたは特異的色素でのIVIAC染色で標識し、限定しないがプロピジウムイオジド、またはDAPIであり、プロトプラストのIVIACの存在の検出を容易化する。
【手続補正１３８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４４３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４４３】
マイクロセルのDAPI染色(例えば１μg/mlの最終濃度までのマイクロセルへのDAPIの添加によるDAPIとマイクロセルのプレインキュベーションによる)は、融合の可視化およびタバコプロトプラストへの染色体の移入を可能とした。融合したプロトプラストを回収し、１または２以上の世代成長させた。融合したプロトプラストを、ある数の方法でMACの存在について分析でき、ここに記載のものを含む。融合したタバコ細胞核を、実施例11に従ってマイクロセルと融合させたタバコプロトプラストから単離し、実施例13にしたがってマウスメジャーサテライトDNA（配列番号12)を使用して、FISH分析の対象とした。多くの核が、マウス染色体に取り込まれたと見出された。
【手続補正１３９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４４９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４４９】
増幅および得られたフラグメントの精製後、attP部位をpSV40193のSmaI部位にクローン化し、attP部位の方向を、DNA配列分析によって決定した（プラスミド pSV40193attP)。プロマイシン抵抗性をコードする遺伝子（Puro)を、プラスミドpPUR (Clontech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA)をAgeI/BamHIで消化し次いでクレノーでオーバーハングを充填しその後pSV40193attPのattP部位の下流のAscIにクローン化し、プラスミドpSV40193attPsensePURを生成した（図7; 配列番号:26))。
プラスミド pSV40193attPsensePUR をScaIで消化し、プラスミド pFK161とマウスLMtk-細胞にコトランスフェクトし、プラットフォーム人工染色体をここに記載のように同定および単離した。簡単には、プロマイシン抵抗性コロニーを単離しその後、蛍光in situハ

イブリダイゼーション(FISH)（マウスメジャーおよびマイナーDNAリピート配列、プロマイシン遺伝子およびプローブとしてテロメア配列を使用して）およびそれらの蛍光活性化細胞ソーティッド（FACS)により人工染色体形成について試験した。この分類から、サブクローンを人工染色体を含んで単離し、B19-38と命名した。B19-38サブクローンのFISH分析は、MAC上のテロメアおよびマウスマイナーの存在を実証した。DOT PCRはMAC上の非特徴把握ユークロマチン領域の不存在を明らかにした。多重部位特異的組み換え部位を含む例示的MACプラットフォームを生成する方法は図5に要約する。このMAC染色体をその後、以下に記載のようなラムダインテグラーゼ介在部位特異的組み換えを使用して標的遺伝子発現核酸を含むよう改変した。

【手続補正１４０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４５４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４５４】

例えば、植物人工染色体を、プラスミドpAg2を使用して前記実施例6-15で記載のように調製し（実施例5; 配列番号：6）それはプラスミド pSV40193attPsensePur（実施例19.A.に前記)からのSV40attPsensePurコード領域を含むよう修飾されたものであった。こうして、得られた植物由来シャトル人工染色体は、植物細胞でホスヒノスリシンに対する抵抗性を付与するbar遺伝子からのDNA、植物細胞でハイグロマイシンへの抵抗性を付与するハイグロマイシン抵抗性遺伝子からのDNA、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーターの制御下の両方の抵抗性コードDNA、attB-プロモーターレスゼオマイシン抵抗性コードDNA、および哺乳動物SV40プロモーターの制御下プロマイシンへの抵抗性を付与するDNAを含む。よって、植物または哺乳動物細胞のいずれかのシャトルPACの存在は、例えばハイグロマイシン（植物)またはプロマイシン（哺乳動物）での処理によって選択できる。