

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-504332

(P2017-504332A)

(43) 公表日 平成29年2月9日 (2017. 2. 9)

|               |       |           |         |       |             |           |
|---------------|-------|-----------|---------|-------|-------------|-----------|
| (51) Int. Cl. |       | F I       |         |       | テーマコード (参考) |           |
| C 1 2 N       | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N | 15/00 | Z N A A     | 2 B O 3 O |
| C 1 2 N       | 5/14  | (2006.01) | C 1 2 N | 5/14  |             | 4 B O 6 5 |
| A O 1 H       | 5/00  | (2006.01) | A O 1 H | 5/00  | A           |           |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁)

(21) 出願番号 特願2016-546997 (P2016-546997)  
 (86) (22) 出願日 平成27年1月16日 (2015. 1. 16)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月23日 (2016. 8. 23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/011831  
 (87) 国際公開番号 W02015/109241  
 (87) 国際公開日 平成27年7月23日 (2015. 7. 23)  
 (31) 優先権主張番号 61/928, 852  
 (32) 優先日 平成26年1月17日 (2014. 1. 17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501035309  
 ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー  
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462  
 68, インディアナポリス, ジオンス  
 ヴィレ ロード, 9330  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100095360  
 弁理士 片山 英二  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74) 代理人 100126354  
 弁理士 藤田 尚

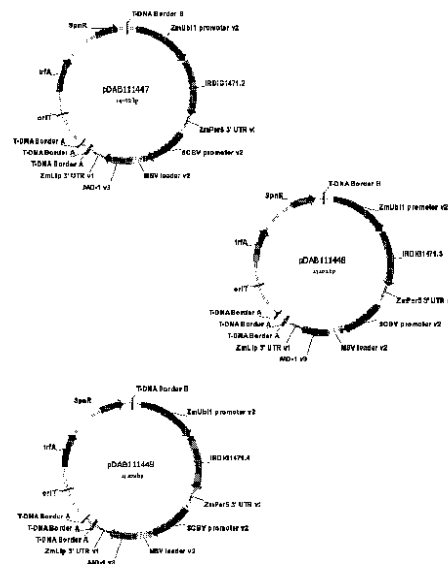
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物におけるタンパク質発現増加

## (57) 【要約】

本開示は、標的植物での発現に特によく適している、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドに関わる。

Fig. 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

植物の細胞において目的の異種ポリペプチドを発現させる系であって、前記植物以外の生物のゲノムからの前記目的のポリペプチドをコードする基準ポリヌクレオチドと、

前記目的のポリペプチドをコードする配列であって、前記植物のコドンの偏向に従って低頻度であるすべてのコドンを除くようにコドン最適化された配列、

A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C A および C A T A A A からなる群から選択される少なくとも 1 つのポリアデニル化配列

を含む配列を有する合成ポリヌクレオチドと

を含み、前記ポリアデニル化配列が、前記基準ポリヌクレオチドの場合と同じ数で同じ場所に存在し、

前記合成ポリヌクレオチドの配列が、前記基準ポリヌクレオチドの場合とは異なる数でまたは異なる場所に、A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C A および C A T A A A からなる群から選択されるいずれのポリアデニル化配列も含まない、系。

## 【請求項 2】

前記合成ポリヌクレオチドが、A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C A および C A T A A A からなる群のもの以外のいずれのポリアデニル化配列も含まない、請求項 1 に記載の系。

## 【請求項 3】

前記目的のポリペプチドが、殺虫性タンパク質、除草剤耐性タンパク質、ストレス耐性関連タンパク質、および油プロファイル修飾タンパク質からなる群から選択されるタンパク質である、請求項 1 に記載の系。

## 【請求項 4】

前記目的のポリペプチドが、殺虫性タンパク質である、請求項 3 に記載の系。

## 【請求項 5】

前記目的のポリペプチドが、アリアルオキシアルカノエートジオキシゲナーゼ 1 (A A D 1) タンパク質である、請求項 3 に記載の系。

## 【請求項 6】

前記植物が、ダイズまたはトウモロコシ植物である、請求項 1 に記載の系。

## 【請求項 7】

前記合成ポリヌクレオチドが、5' 非翻訳配列および 3' 非翻訳領域を含み、前記 5' 非翻訳配列が、前記目的のポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結された植物プロモーターを含み、3' 非翻訳配列が、転写終結配列を含む、請求項 1 に記載の系。

## 【請求項 8】

前記合成ポリヌクレオチドが、植物転写単位である、請求項 1 に記載の系。

## 【請求項 9】

前記合成ポリヌクレオチドが、植物発現ベクターの中にある、請求項 8 に記載の系。

## 【請求項 10】

請求項 1 に記載の合成ポリヌクレオチドを含有する遺伝子導入植物。

## 【請求項 11】

請求項 16 に記載の遺伝子導入植物からの植物材料であって、検出可能なレベルの前記目的の異種ポリペプチドを含む植物材料。

## 【請求項 12】

配列番号 1、配列番号 4 および配列番号 5 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記植物がダイズまたはトウモロコシである、請求項 12 に記載のポリヌクレオチドを含む植物細胞、植物組織、植物材料または植物。

【請求項 14】

目的のポリペプチドを植物細胞に導入する方法であって、  
請求項 1 に記載の系を用意するステップと、  
前記植物の細胞を前記合成ポリヌクレオチドで形質転換するステップと  
を含む、方法。

10

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法によって生産される植物細胞。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の植物細胞から植物を再生させることを含む、植物において目的のポリペプチドを発現させる方法。

【請求項 17】

目的のポリペプチドを植物に導入する方法であって、  
請求項 1 に記載の系を用意するステップと、  
前記植物を前記合成ポリヌクレオチドで形質転換するステップと  
を含む、方法。

20

【請求項 18】

前記植物を形質転換するステップが、前記植物の細胞を形質転換すること、および前記形質転換された細胞から前記植物を再生させることを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の方法によって生産される植物。

【請求項 20】

前記基準ポリヌクレオチドの場合と同じ数で同じ場所に前記ポリアデニル化配列を含まない合成ポリヌクレオチドで形質転換されている同じ種の植物より多い量の前記目的の異種ポリペプチドを含む、請求項 19 に記載の植物。

【請求項 21】

30

前記目的のポリペプチドが、殺虫性タンパク質、除草剤耐性タンパク質、ストレス耐性関連タンパク質、および油プロファイル修飾タンパク質からなる群から選択されるタンパク質である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

有害生物を防除する方法であって、請求項 21 に記載の方法によって生産された植物から子実を得るステップを含み、前記目的のポリペプチドが殺虫性タンパク質である、方法。

【請求項 23】

有害生物を防除する方法であって、請求項 21 に記載の方法によって生産された植物から種子を得るステップを含み、前記目的のポリペプチドが殺虫性タンパク質である、方法。

40

【請求項 24】

前記種子を発芽させるステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

粗挽き粉、細粉、タンパク質濃縮物および油からなる群から選択される商品生産物である、請求項 19 に記載の遺伝子導入植物に由来する組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

50

本出願は、2014年1月17日に出願された「植物におけるタンパク質発現増加 (INCREASED PROTEIN EXPRESSION IN PLANTS)」についての米国特許仮出願第61/928,852号の出願日の利益を主張する。

#### 【0002】

本開示は、植物細胞におけるポリヌクレオチドの発現を改善するための方法および組成物に関する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドのタンパク質コード領域は、ネイティブ遺伝子における特定のポリアデニル化配列を同時に保存しつつ、宿主生物からのコドン使用頻度の偏向を反映するように修飾される。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

遺伝コードは、3ヌクレオチドの単位（「コドン」）からなる。可能性のあるコドンは64あり、各々が20のアミノ酸の1つまたは転写の終わり（すなわち「終止コドン」）を規定する。したがって、少なくとも一部のコドンは冗長である。生物の圧倒的多数によって用いられているコード系では、2つのアミノ酸が単一コドンによってコードされるが、他のすべてのアミノ酸は2、3、4または6コドンによってコードされ、終止コドンは3つある。2、3または4つコドンを有するアミノ酸は、第3のヌクレオチド位置のコドンが互いに異なる。6コドンを有する3つは、このパターンに従う4コドンの1ブロックと、第3の位置が同じく互いに異なる2コドンの追加の1セットとを有する。6コドンによって表される2つのアミノ酸（ArgおよびLeu）は、第2のヌクレオチド位置の変化が互いに異なるブロックによって各々表される。セリン（Ser）のコドン表現は、2つのコドンブロックが非常に小さい点で独特である。2コドンによって表されるアミノ酸は、第3の位置が、両方の場合、プリン（A、G）またはピリミジン（C、T）のいずれかである。

#### 【0004】

遺伝コードの縮重は、基準ポリヌクレオチドのポリペプチド産物をコードする別のポリヌクレオチドを構築する機会をもたらす。例えば、コドン縮重によって、原DNAコード配列に使用されているものとは異なるコドンを使用して目的のタンパク質をコードする合成DNA配列を作製することが可能になる。特定のアミノ酸に関して、所与の生物は可能性のあるコドンを同等に使用しない。生物各々がコドン使用頻度の偏向を有する。コドン使用頻度の偏向のパターンは、生物およびその近縁種についてゲノム全体にわたって異なる。例えば、ストレプトマイセス属種（*Streptomyces* spp.）の場合、高頻度のコドンとしては、一般に、第3のヌクレオチド位置のGまたはCが挙げられる。低頻度のコドンとしては、一般に、第3の場所のAまたはTが挙げられる。他の生物では、AまたはTが第3の位置において優先的である。特定の種内に、独自のコドンの偏向を有する別個の遺伝子カテゴリーが存在し得る。例えば大腸菌（*E. coli*）には、およそ3つの遺伝子クラスがあり、各々が特有のコドン使用頻度の特徴を有する。1つのクラスは、大量に発現される重要なタンパク質に富み、第2のクラスは、比較的低レベルで発現されるタンパク質を含み、第3のクラスは、他の種から最近獲得された可能性が高いタンパク質を含む。

#### 【0005】

遺伝子導入植物において異種タンパク質の所望の発現レベルを達成するために、ネイティブ（野生型または原と呼ばれることもある）DNAコード配列を、様々な方法で、例えばコドン使用頻度が宿主植物種のコドン使用頻度とより厳密にマッチするように、および／またはそのためコード配列のG+C含有量が宿主植物種のコード配列に典型的に見られるG+Cレベルとより厳密にマッチするように、および／またはmRNAを不安定化する特定の配列が除去されるように改変することは、有益であることが判明した。例えば、植物におけるバチルス・チューリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）（Bt）結晶タンパク質昆虫毒の発現が、これらのアプローチの1つまたは複数を使用して改善されている。例えば、米国特許第5,380,301号、同第5,625,136号、同第6,218,188号、同第6,340,593号、同第6,673,990号および同第7,741,118を参照されたい。

10

20

30

40

50

## 【0006】

殆どの合成遺伝子設計戦略における方法は、合成遺伝子のコドン組成をその合成遺伝子が発現されることになる宿主の遺伝子のコドン組成とマッチさせようとする。例えば、米国特許出願公開第2007/0292918号A1を参照されたい。そのような戦略は、一部の状況では、宿主における合成遺伝子の発現増加をもたらすこともある。例えば、酵母におけるコドン最適化は、例えば、アミノアシル-tRNAの制限およびATに富む配列での転写終結の効果を最小にするため、異種遺伝子転写物の翻訳を有意に改善することがある。例えば、Daly and Hearn (2004) J. Mol. Recognition 18:119-38を参照されたい。

## 【0007】

しかし、何がしかのコドン最適化の必要性に対する当技術分野における一般的な見解の一致にもかかわらず、最適化に用いるべき一般戦略に関しては実施者の意見が食い違う。一部に好まれる1つの戦略は、異種遺伝子の設計中に発現宿主種における高頻度コドンの使用を最大にすることである。他の者に好まれる第2の戦略は、特定のコドン文脈に最大値を課すこと、したがって、発現宿主において高頻度に出現するコドンペアの使用を最大化することである。第3の戦略は、新たな種における新たなコード配列のコドン使用頻度を起源種における基準コード配列のコドン使用頻度に似させることである。この第3の戦略は、転写物RNA分子の適正な二次構造を確実なものにするために低頻度コドンについての可能性のある必要条件に関する認識を重視する。加えて、異種配列における同じ頻度で出現するコドンの単純な反復使用は、結局は低頻度コドンの選択と同じ効果を有することが予想され、例えば、対応するtRNAの過剰使用は、tRNAの利用可能性を制限することになる。宿主生物での発現のために遺伝子配列のコドンを最適化しようとする者は、特定の方法論に達するためにこれらの戦略とそれらの根底にある課題とのバランスをとらなければならない。

## 【0008】

異種発現タンパク質をコードするヌクレオチド配列の最適化プロセスは、発現収率を改善するための重要なステップであり得る。しかし、可能性のあるいくつかの問題が特定の遺伝子の発現についての最適化の有用性を制限する。例えば、最適化された転写物の二次構造がその転写物の翻訳を制限することがある。Griswold et al. (2003) Protein Expression and Purification 27: 134-42。加えて、異種発現の合成配列において避けることが望ましいいくつかの配列モチーフがあり、それらの配列モチーフには、T7プロモーターの制御下にある遺伝子についての大腸菌(E. coli)におけるクラスIおよびII転写終結部位；シャイン(Shine)・ダルガーノ(Dalgarno)様配列；潜在的スプライスシグナル；リボソームフレームシフトおよび休止を促進する配列；ならびにポリアデニル化シグナルが含まれる。Welch et al. (2010) J. R. Soc. Interface 6:S467-76。特に、植物における合成遺伝子の発現増進を可能にするためにアデニル化ポリシグナル化配列を低減させるべきであるというのが当技術分野における理解である。米国特許第7,741,118号。

## 【発明の概要】

## 【0009】

当技術分野における理解(例えば米国特許第7,741,118号参照)に反して、本発明者らは、ポリアデニル化シグナル配列(例えば、AATAAA、AATAAT、AACCA、ATATAA、AATCAA、ATACTA、ATAAAA、ATGAAA、AAGCAT、ATTAAAT、ATACAT、AAAAATA、ATTAAA、AATTA、AATACAおよびCATAAA)の数の低減が、植物における合成遺伝子の発現増進を可能にするために必要でなく、十分なものでもないことを最近発見した。本明細書における実施形態は、これらのポリアデニル化配列がネイティブ配列における出現に関して合成コード配列で保存されることを遺伝子最適化プロセスに利用して異種タンパク質発現を増加させることができるという驚くべき、予想外の結果を実際に用いる。

## 【0010】

本明細書における実施形態は、目的の少なくとも1つのポリペプチドをコードする合成核酸を含む。実施形態において、目的の少なくとも1つポリペプチドをコードする合成核酸は、宿主（例えば、植物細胞、植物組織および植物）における核酸からの目的のポリペプチドの発現を一般に増加させる特異的遺伝子設計パラメータの制約に従って設計される。合成核酸配列は、基準核酸配列から、例えば宿主生物における核酸配列の異種発現を最適化するように設計されることもある。

#### 【0011】

いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドをコードする合成核酸が、宿主細胞における異種ポリペプチドの発現のために工学的に操作され、ポリペプチドは、宿主細胞のもの以外の種における遺伝子操作されていない細胞において生産され、その細胞における基準ポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態において、合成核酸は、宿主細胞での発現のために、例えば、基準ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、宿主生物における優先（例えば最優先）コドンであるコドンの実質的にすべてを該配列内に有するように改変することによって、コドン最適化される。いくつかの実施形態では、コドン最適化合成核酸に関するさらなる分析および工学的操作が、例えば、望ましくない核酸モチーフ（例えば、核酸モチーフから転写されるRNA分子において望ましくない二次構造を形成する核酸モチーフ）の不在を確認するために、制限酵素認識部位の不在を確認するために、ならびに／またはコドンおよび配列多様性を確かめるために、行われることもある。

#### 【0012】

いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドをコードする合成核酸は、異種細胞での発現のためにコドン最適化されているコード配列と、A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C AおよびC A T A A Aからなる群から選択される少なくとも1つのポリアデニル化配列とを含み、少なくとも1つのポリアデニル化配列は、コード配列の対応する場所に、基準ポリヌクレオチドにおけるがごとく存在する。特定の実施形態において、合成核酸は、基準ポリヌクレオチドに出現するのと同数の前述のポリアデニル化配列を含む。特定の実施形態において、合成核酸は、基準ポリヌクレオチドに出現するのと同数の前述のポリアデニル化配列を含み、ポリアデニル化配列は、各々がコード配列のそれらの対応する場所に、基準ポリヌクレオチドにおけるがごとく存在する。

#### 【0013】

いくつかの実施形態は、目的のポリペプチドをコードする合成核酸を作製する方法であって、A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C AおよびC A T A A Aからなる群から選択される少なくとも1つのポリアデニル化配列を含む、遺伝子操作されていない細胞における基準ポリヌクレオチドによってコードされている目的のポリペプチドのアミノ酸配列を用意するステップと、基準ポリヌクレオチドにおけるがごとく合成核酸のコード配列の対応する場所に存在する少なくとも1つのポリアデニル化配列を含有する、目的のポリペプチドをコードする合成核酸を生産するステップとを含む方法を含む。特定の実施形態において、合成核酸は、該合成核酸が基準ポリヌクレオチドに出現するのと同数の上述のポリアデニル化配列を含み、ポリアデニル化配列が、各々、合成核酸のコード配列のそれらの対応する場所に、基準ポリヌクレオチドにおけるがごとく存在するように生産される。

#### 【0014】

他の実施形態は、上述の合成核酸の少なくとも1つを含むベクター（例えば、植物形質転換ベクター）を含む。特定の実施形態は、異種細胞での発現のためにコドン最適化されているコード配列と、A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、

A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C AおよびC A T A A Aからなる群から選択される少なくとも1つのポリアデニル化配列とを含む、目的のポリペプチドをコードする合成核酸を含む転写単位を含むベクターであって、少なくとも1つのポリアデニル化配列が、基準ポリヌクレオチドにおけるがごとくコード配列の対応する場所に存在する、ベクターを含む。いくつかの例では、そのようなベクターは、例えば、限定ではないが、5'非翻訳配列（例えば、植物プロモーターを含むもの）；合成DNA配列；および3'非翻訳領域（例えば、転写終結シグナルを含むもの）を含むことがある。

#### 【0015】

特定の実施形態は、目的のポリペプチド（例えば、目的の異種ポリペプチド）を発現する植物、植物部位、植物器官、植物種子および／または植物細胞を生成する方法を含む。特定の実施形態による方法は、異種細胞での発現のためにコドン最適化されているコード配列と、A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C AおよびC A T A A Aからなる群から選択される少なくとも1つのポリアデニル化配列とを含む、目的のポリペプチドをコードする少なくとも1つの合成核酸で植物、植物部位、植物器官、植物種子および／または植物細胞を形質転換するステップであって、少なくとも1つのポリアデニル化配列が、基準ポリヌクレオチドにおけるがごとくコード配列の対応する場所に存在する、ステップと、核酸を発現させて、核酸によってコードされた目的のポリペプチドを生産するステップとを含む。例では、前述の合成核酸で形質転換された植物、植物部位、植物器官、植物種子および／または植物細胞は、基準ポリヌクレオチドで形質転換された同じ種の植物、植物部位、植物器官、植物種子および／または植物細胞より大量に目的のポリペプチドを発現することがある。

#### 【0016】

いくつかの実施形態は、目的のポリペプチドをコードする合成核酸が、異種細胞での発現のためにコドン最適化されているコード配列と、A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C AおよびC A T A A Aからなる群から選択される少なくとも1つのポリアデニル化配列とを含む、目的のポリペプチドをコードする合成核酸を含む植物、植物部位、植物器官、植物種子および／または植物細胞であって、少なくとも1つのポリアデニル化配列が、遺伝子修飾されていない生物における目的のネイティブポリペプチドをコードする基準ポリヌクレオチドにおけるがごとくコード配列の対応する場所に存在する、植物、植物部位、植物器官、植物種子および／または植物細胞を含む。

#### 【0017】

他の実施形態は、植物において望ましい発現表現型を得る方法を含む。いくつかの実施形態による方法は、異種細胞での発現のためにコドン最適化されているコード配列と、A A T A A A、A A T A A T、A A C C A A、A T A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C AおよびC A T A A Aからなる群から選択される少なくとも1つのポリアデニル化配列とを含む、目的のポリペプチドをコードする少なくとも1つの合成核酸で植物、植物部位、植物器官、植物種子および／または植物細胞を形質転換するステップであって、少なくとも1つのポリアデニル化配列が、基準ポリヌクレオチドにおけるがごとくコード配列の対応する場所に存在し、目的のポリペプチドが、部位、植物器官、植物種子および／または植物細胞において発現され、それによってその表現型を付与する、または向上させるステップを含む。特定の実施形態において得られるまたは向上されることがある表現型の例としては、例えば、限定ではないが、有害生物抵抗性および／または防除、除草剤耐性、修飾された油特性、ならびにストレス耐性が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0018】

例えば、いくつかの実施形態における方法は、昆虫毒（例えば、バチルス・チューリンゲンシス（*Bacillus thuringiensis*）Cryタンパク質）をコードする少なくとも1つの合成ポリヌクレオチドを植物細胞において発現させることによって植物、子実および／または種子における有害生物を防除すること；合成ポリヌクレオチドから昆虫毒を発現する遺伝子導入植物から得られる子実から粗挽き粉または細粉を用意することによって粗挽き粉または細粉における有害生物を防除すること；除草剤耐性ポリペプチド（例えば、アリアルオキシアルカノエートジオキシゲナーゼ（AAD1）、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼおよび5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ）をコードする少なくとも1つの合成ポリヌクレオチドを植物において発現させることによって植物における除草剤耐性を増加させること；植物における油プロファイル修飾するポリペプチド（例えば、脂肪酸デサチュラーゼ）をコードする少なくとも1つの合成ポリヌクレオチドを植物において発現させることによって植物における油プロファイル修飾すること；ならびにストレス耐性遺伝子の産物（例えば、ストレス関連タンパク質（SAP1）および／または1-Cysペルオキシレドキシシン（Per1）タンパク質）をコードする合成ポリヌクレオチドを植物において発現させることによって植物におけるストレス耐性（例えば、水および／または熱ストレス耐性）を増加させることを含む。特定の実施形態は、形質転換マーカータンパク質（例えば、GFPおよび／またはβ-グルクロニダーゼ）をコードする合成ポリヌクレオチドを植物において発現させることによって、植物にレポーター遺伝子を導入する方法を含む。

10

20

## 【0019】

いくつかの実施形態には、異種細胞での発現のためにコドン最適化されているコード配列と、AATAAA、AATAAT、AACCAA、ATATAA、AATCAA、ATACTA、ATAAAA、ATGAAA、AAGCAT、ATTAAAT、ATACAT、AAAAAT、ATTAAA、AATTAAT、AATACAおよびCATAAAからなる群から選択される少なくとも1つのポリアデニル化配列とを含む、目的のポリペプチドをコードする合成核酸を含有する遺伝子導入植物またはそれらの部位もしくは材料から生産される組成物（例えば商品生産物）であって、少なくとも1つのポリアデニル化配列が、基準ポリヌクレオチドにおけるがごとくコード配列の対応する場所に存在する、組成物も含まれる。特定の実施形態において、組成物は、粗挽き粉、細粉、タンパク質濃縮物および油を含む群から選択される商品生産物である。

30

## 【0020】

上述の特徴および他の特徴は、添付の図に関連して進行する、いくつかの実施形態についての下記の詳細な説明からより明らかになるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0021】

【図1】Cry1Abトウモロコシ形質転換に使用した3つの例示的バイナリープラスミドの描画を含む図である。すべてのプラスミドは、cry1Abポリヌクレオチドを除いて、同一である。

【図2】Cry1Ab形質転換に使用した構築物によって推定された形質転換頻度を含む図である。pDAB109812は、陰性対照であり、このプラスミドは、Cry1AbではなくYFPを含有するが、調節エレメントおよび選択可能マーカーカセットに関しては同一である。

40

【図3】JMP統計分析ソフトウェアを使用することによって各バックグラウンドについて得たT<sub>0</sub>形質転換事象の統計分析の要約を含む図である。平均は、バックグラウンド各々の緑色ひし形の中心線である。

【図4】V5生育期で収穫したトウモロコシ葉組織からのウエスタンブロットの画像を含む図である。レーンの内容は、レーン1＝陰性対照、レーン2＝BioRad MWM、20μL、レーン3＝107645[1]－021.001AJ.016、レーン4＝107645[1]－021.001AJ.021、レーン5＝107645[1]－02

50

1. 001 AJ. 006、レーン6=111447 [1] - 002. 001、レーン7=111447 [1] - 003. 001、レーン8=111447 [1] - 033. 001、レーン9=111448 [1] - 030. 001、レーン10=111448 [1] - 013. 001、レーン11=111448 [1] - 032. 001、レーン12=111449 [1] - 020. 001、レーン13=111449 [1] - 009. 001、レーン14=111449 [1] - 018. 001、およびレーン15=精製細菌Cry1Ab標準物質(1ng)である。107645事象は、昆虫バイオアッセイにおいて活性であると判定された完全長Cry1Abを含有するT<sub>1</sub>事象である。

【図5】構築物によるアメリカタバコガ幼虫(CEW)損傷率のチューキー(Tukey)・クラマー(Kramer)一元配置分析の要約を含む図である。対照材料、109812(YFP)、B104(非形質転換対照)、およびHX1(HERCULEX(登録商標))をCry1Ab事象とともに評価した。Cry1Abを含有する3つのバックグラウンドすべてが、CEWに対するHERCULEX(登録商標)の防護と同等の防護をもたらした。

【図6】構築物によるアワノメイガ(ECB)損傷率のチューキー・クラマー一元配置分析の要約を含む図である。対照材料、109812(YFP)、B104(非形質転換対照)、およびHX1(HERCULEX(登録商標))をCry1Ab事象とともに評価した。Cry1Abを含有する3つのバックグラウンドすべてが、ECBに対するHERCULEX(登録商標)の防護と同等の防護をもたらした。

【図7】構築物によるCry1Fa抵抗性アワノメイガ(rECB)損傷率のチューキー・クラマー一元配置分析の要約を含む図である。対照材料、109812(YFP)、B104(非形質転換対照)、およびHX1(HERCULEX(登録商標))をCry1Ab事象とともに評価した。Cry1Abを含有する3つのバックグラウンドすべてがrECBに対する防護をもたらした。

【図8-1】Cry1Faトウモロコシ形質転換実験に使用した12のバイナリープラスミドのマップを含む図である。pDAB110842を除くすべてのプラスミドは、Cry1Faをコードするポリヌクレオチド以外、同一である。バイナリープラスミドpDAB110842は、ZmUbi1プロモーターv6およびAtuORF25/26 3' UTR v1を含む、HERCULEX(登録商標)製品に最も類似している遺伝子カセットを有する。

【図8-2】Cry1Faトウモロコシ形質転換実験に使用した12のバイナリープラスミドのマップを含む図である。pDAB110842を除くすべてのプラスミドは、Cry1Faをコードするポリヌクレオチド以外、同一である。バイナリープラスミドpDAB110842は、ZmUbi1プロモーターv6およびAtuORF25/26 3' UTR v1を含む、HERCULEX(登録商標)製品に最も類似している遺伝子カセットを有する。

【図8-3】Cry1Faトウモロコシ形質転換実験に使用した12のバイナリープラスミドのマップを含む図である。pDAB110842を除くすべてのプラスミドは、Cry1Faをコードするポリヌクレオチド以外、同一である。バイナリープラスミドpDAB110842は、ZmUbi1プロモーターv6およびAtuORF25/26 3' UTR v1を含む、HERCULEX(登録商標)製品に最も類似している遺伝子カセットを有する。

【図8-4】Cry1Faトウモロコシ形質転換実験に使用した12のバイナリープラスミドのマップを含む図である。pDAB110842を除くすべてのプラスミドは、Cry1Faをコードするポリヌクレオチド以外、同一である。バイナリープラスミドpDAB110842は、ZmUbi1プロモーターv6およびAtuORF25/26 3' UTR v1を含む、HERCULEX(登録商標)製品に最も類似している遺伝子カセットを有する。

【図8-5】Cry1Faトウモロコシ形質転換実験に使用した12のバイナリープラスミドのマップを含む図である。pDAB110842を除くすべてのプラスミドは、Cry1Faをコードするポリヌクレオチド以外、同一である。バイナリープラスミドpDA

10

20

30

40

50

B110842は、ZmUbi1プロモーターv6およびAtuORF25/26 3' UTR v1を含む、HERCULEX（登録商標）製品に最も類似している遺伝子カセットを有する。

【図8-6】Cry1Faトウモロコシ形質転換実験に使用した12のバイナリープラスミドのマップを含む図である。pDAB110842を除くすべてのプラスミドは、Cry1Faをコードするポリヌクレオチド以外、同一である。バイナリープラスミドpDAB110842は、ZmUbi1プロモーターv6およびAtuORF25/26 3' UTR v1を含む、HERCULEX（登録商標）製品に最も類似している遺伝子カセットを有する。

【図9】pDAB111436およびpDAB11437バックグラウンドからの植物が陰性濃学的表現型を明示したことを示す画像を含む図である。茎および葉材料の赤変、ならびに葉および茎組織の重度の萎縮が検出された。

【図10】JMP統計ソフトウェアを使用する各バックグラウンドについてのT<sub>0</sub>事象の統計分析の要約を含む図である。製品であるHERCULEX（登録商標）は、これらの温室条件下、60 ng/cm<sup>2</sup>でCry1Faを発現すると判定された。平均は、バックグラウンド各々の緑色ひし形の中心線である。40 ng/cm<sup>2</sup>のすぐ下に描かれている線は、すべてのバックグラウンドにわたってのすべての事象についての総平均である。

【図11】V5生育期で収穫したトウモロコシ葉組織からのウエスタンブロットの画像を含む図である。レーンの内容は、次の通りである：レーン1＝陰性対照、レーン2＝BioRad MWM、20 μL、レーン3＝111434 [1] - 010.001、レーン4＝111434 [1] - 004.001、レーン5＝111434 [1] - 013.001、レーン6＝111435 [1] - 003.001、レーン7＝111435 [1] - 006.001、レーン8＝111435 [1] - 012.001、レーン9＝細菌精製Cry1Fa標準物質（2 ng）、およびレーン10＝精製細菌Cry1Fa標準物質（20 ng）である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

配列表

添付の配列表に収載されている核酸配列は、37 C. F. R. § 1.822において定義されている、ヌクレオチド塩基の標準文字略語を使用して示されている。各核酸配列の1本の鎖のみが示されているが、表示されている鎖への何らかの言及によって相補鎖が含まれると解される。添付の配列表において、

配列番号1は、本明細書中のいくつかの箇所でIRDIG. 1471. 2と呼ばれるポリヌクレオチド配列を示す：

【0023】

10

20

30

【化 1 - 1】

ATGGATAACAACCCGAACATCAACGAGTGCATCCCGTACAACTGC  
CTGAGCAACCCGGAGGTGGAGGTGCTGGGCGGCGAGAGGATCGAGACCG  
GCTACACCCCGATCGACATCAGCCTGTCCCTGACCCAGTTCCTGCTGTCCG  
AGTTCGTGCCTGGCGCTGGCTTCGTGCTGGGACTCGTGGATATAATCTGGG  
GAATCTTTGGCCCGTCCCAGTGGGACGCCTTCCTGGTGCAGATCGAGCAG  
CTAATTAACCAAAGGATCGAGGAGTTCGCGAGGAACCAAGCCATTTTCGAG  
GCTGGAGGGCCTGTCCAACCTGTACCAAATCTACGCGGAGAGCTTCCGCG  
AGTGGGAGGGCGGACCCGACCAACCCGGCCCTGAGGGAGGAGATGAGGAT  
ACAGTTCAACGACATGAACTCCGCGCTGACCACCGCCATCCCGCTGTTCG  
CCGTGCAGAACTACCAAGTGCCGCTGCTGTCCGTGTACGTGCAAGCCGCG  
AACCTGCACCTGAGCGTGCTGAGGGACGTGAGCGTCTTTGGCCAGAGGTG  
GGGCTTCGACGCGGCGACCATCAACAGCAGATACAACGACCTGACCAGAC  
TGATCGGCAACTACACCGACTACGCCGTGAGGTGGTACAACACCGGCCTG  
GAGAGGGTGTGGGGCCCGGACTCAAGGGACTGGGTGAGATACAATCAAT  
TCAGAAGGGAATTAACCCTGACCGTGCTGGACATCGTGGCCCTGTTCCCG  
AACTACGACTCAAGGAGATACCCGATCAGAACCGTGTCCAATTAACCAG  
AGAAATCTACACCAACCCGGTGCTGGAGAACTTCGACGGCAGCTTCAGAG  
GCAGCGCCCAAGGCATCGAGAGGAGCATCAGATCCCCGCACCTGATGGAC

10

20

【 0 0 2 4】

## 【化 1 - 2】

ATCCTGAACTCCATCACCATCTACACCGACGCGCACAGAGGCTACTACTA  
CTGGAGCGGCCACCAAATAATGGCCTCCCCGGTGGGCTTCTCCGGCCCCGG  
AGTTCACCTTCCCGCTGTACGGCACAATGGGCAACGCGGCCCCGCAGCAG  
AGGATCGTGGCGCAGCTGGGCCAAGGCGTGTACAGAACCCTCAGCTCCAC  
CCTGTACAGAAGGCCGTTCAACATCGGCATCAATAATCAACAGCTGAGCG  
TGCTGGACGGCACCGAGTTCGCATACGGCACCTCCTCCAACCTGCCGAGC  
GCCGTGTACAGAAAGTCCGGCACCGTGGACTCCCTGGATGAAATCCCCGCC  
GCAGAACAAACGCTGCCGCCGAGGCAAGGCTTCAGCCACAGACTGAGC  
CACGTGAGCATGTTTCAGATCCGGCTTCTCAAACCTCCAGCGTGAGCATCATC  
AGAGCGCCGATGTTTCAGCTGGATACATAGGAGCGCGGAGTTCAATAATAT  
AATCCCCAGCTCTCAGATCACCCAGATCCCGCTGACCAAGTCCACCAACC  
TGGGCTCCGGCACCGAGCGTGGTGAAGGGACCGGGCTTTACCGGCGGGCGAC  
ATCCTGAGGAGGACCTCCCCGGGCCAAATCTCCACCCTGAGGGTGAACAT  
CACCGCCCCGCTGAGCCAGAGATACAGAGTGAGGATCAGATACGCGTCCA  
CCACCAACCTTCAGTTCCATACATCCATCGACGGGAGGCCGATTAATCAA  
GGCAACTTCTCCGCGACCATGTCCAGCGGCTCCAACCTCCAGAGCGGCAG  
CTTCAGAACCGTGGGCTTCACCACCCCGTTCAACTTCTCAAACGGCAGCA  
GCGTGTTACCCTGAGCGCCACGTGTTCAACTCCGGCAACGAGGTGTAC  
ATCGACAGAATCGAGTTCGTGCCGGCAGAAAGTGACCTTCGAGGCCGAGTA  
CGACCTGGAGAGGTGA

10

20

配列番号 2 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 1 4 7 1 . 3 と呼ばれるポ  
リヌクレオチド配列を示す：

30

【 0 0 2 5】

## 【化 2 - 1】

ATGGACAACAACCCTAACATCAATGAGTGCATACCATACAACTGTC  
TTAGCAACCCAGAAGTTGAGGTTCTGGGTGGGGAGAGGATAGAGACTGG  
ATACACTCCAATAGACATTTGCTGTCACTGACGCAATTCCTTCTGTCTGA  
GTTTCGTTTCCTGGTGCTGGATTTCGTGCTGGGCTTGGTGGATATAATTTGGGG  
AATCTTTGGACCGTCCCAGTGGGATGCCTTTCTTGTTTCAGATTGAGCAGCT  
AATTAACCAAAGAATTGAGGAGTTTGCACGCAACCAAGCCATATCCAGAC  
TTGAAGGCCTTTCGAACTTGTATCAAATCTACGCAGAGAGCTTCAGAGAG  
TGGGAGGCAGACCCGACGAATCCAGCCCTCAGAGAGGAGATGAGGATTC  
AGTTCAACGACATGAACTCAGCACTGACTACTGCCATTCCCCTCTTTGCCG  
TCCAGAACTATCAAGTGCCACTGCTGTCCGTCTACGTTCAAGCAGCGAATC  
TGCACCTCAGCGTCTTGAGAGACGTCTCGGTCTTTGGCCAGCGCTGGGGTT

40

【 0 0 2 6】

【化 2 - 2】

TTGATGCAGCGACGATCAATAGCAGATACAATGACCTCACAAGGCTGATT  
GGAAACTACACCGATTACGCAGTTCGCTGGTACAATACGGGTCTCGAACG  
GGTCTGGGGACCCGACTCACGCGACTGGGTGAGATACAATCAATTCAGAC  
GCGAATTAACTTTGACCGTTCTGGACATAGTCGCACTCTTTCCGAACTACG  
ACAGCAGAAGATATCCGATTAGGACGGTTTCCCAATTAACCAGAGAAATC  
TATACCAATCCCGTGCTCGAAAACTTTGACGGCAGCTTTAGGGGAAGCGC  
TCAAGGCATTGAGAGGAGCATCAGATCCCCACATCTCATGGACATTCTGA  
ACTCAATCACGATCTACACTGATGCACATAGGGGTACTACTATTGGAGC  
GGTCATCAAATAATGGCCTCGCCAGTGGGGTTTTTCGGGTCCGGAGTTTAC  
ATTCCCCTGTACGGGACAATGGGAAATGCAGCACCGCAACAGCGGATCG  
TTGCTCAGCTGGGTCAAGGGGTGTACAGAACGCTCTCATCGACGCTGTAT  
CGGAGACCTTCAACATAGGCATCAATAATCAACAACCTCTCAGTCTTGGA  
CGGCACCGAGTTCGCGTATGGGACATCCTCCAACCTCCCGTCTGCCGTGTA  
TCGCAAGTCCGGAACAGTCGATTGCTGGATGAAATTCCTCCACAGAACA  
ACAACGTGCCTCCAAGACAAGGCTTCTCTCACAGATTGAGCCATGTGAGC  
ATGTTCCGCTCTGGCTTCTCCAACCTCCTCAGTGTGATCATTAGGGCACCG  
ATGTTCTCTTGATACATCGGAGCGCAGAGTTCAATAATATAATCCCGTCA  
AGCCAGATCACGCAGATCCCCTGACCAAGTCCACCAATCTCGGCTCTGG  
GACAAGCGTTGTGAAGGGTCCTGGCTTCACTGGTGGGGATATCCTGCGGA  
GGACTTCTCCTGGCCAGATTTCAACCCTCAGAGTCAACATCACCGCACCCC  
TTTACAGCGCTATCGGGTTCGCATACGCTACGCTTCCACGACCAATCTGC  
AATTCCATACATCCATCGACGGGAGGCCTATTAATCAAGGCAACTTCTCA  
GCGACTATGTCTCGGGTCTAACCTTCAGTCTGGCAGCTTCAGAACGGTG  
GGGTTCACCACTCCATTCAACTTCTCGAACGGGTCAAGCGTGTTACCTTG  
AGCGCTCACGTGTTCAATTCCGGAAACGAAGTGTACATCGACCGCATAGA  
GTTTCGTGCCAGCAGAAGTTACATTCTGAAGCCGAGTACGAT  
CTTGAGAGGTGA

10

20

30

配列番号 3 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 1 4 7 1 . 4 と呼ばれるポ  
リヌクレオチド配列を示す：

【 0 0 2 7】

【化 3 - 1】

ATGGATAACAACCCGAACATCAATGAGTGCATCCCGTATAACTGTC  
TCAGTAACCCTGAAGTGGAGGTCTTAGGTGGCGAACGCATCGAACTGGT  
TACACCCCAATCGACATTAGCTTGTGCTTGACGCAGTTCCTCTTGTCGAG  
TTCGTGCCCCGGTGCGGGTTTTCGTGCTGGGGCTAGTTGATATAATCTGGGGA

40

【 0 0 2 8】

【化 3 - 2】

ATCTTTGGTCCCTCTCAGTGGGACGCCTTTCTTGTGCAAATTGAGCAGCTA  
ATTAACCAAAGAATAGAAGAGTTCGCGAGGAACCAAGCCATTTCCAGACT  
GGAGGGACTAAGCAACCTTTATCAAATCTACGCGGAGTCTTTTAGGGAGT  
GGGAGGCAGATCCTACGAACCCGGCACTGCGCGAAGAGATGCGTATTCAG  
TTCAACGACATGAACAGTGCCCTTACAACCGCTATTCCCCTTTTCGCAGTT  
CAAAATTACCAAGTTCCCCTTCTCTCAGTGTACGTTCAAGCCGCAAATTTA  
CACCTAAGCGTTCTCCGCGATGTGTACAGTGTTCGGCCAGAGGTGGGGATTT  
GATGCCGCCACTATCAATAGTCGTTATAATGATCTGACGAGGCTTATCGGC  
AACTATACCGACTATGCTGTCCGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGGGT  
CTGGGGTCCGGATTCCCGAGACTGGGTGCGCTACAATCAATTCCGCCGCG  
AATTAACCCTCACTGTCCTCGACATCGTGGCGCTGTTCCCGAACTACGACA  
GTAGGAGATACCCAATCCGCACAGTTTCCCAATTAACGCGGGAAATTTAC  
ACCAACCCAGTCCCTGGAGAATTTTGACGGGAGCTTCCGAGGCTCGGCTCA  
AGGCATAGAACGCAGCATTAGGTCGCCACACTTGATGGATATCCTTAACA  
GCATCACCATCTACACGGATGCCCATAGGGGTTACTACTACTGGTCGGGG  
CATCAAATAATGGCTTCTCCTGTCTGGGTTTTCGGGGCCAGAGTTCACCTTC  
CCGCTCTACGGCACTATGGGAAATGCCGCGCCACAACAACGTATCGTCGC  
TCAACTAGGTCAAGGCGTGTACCGGACACTGTCTGCTCCACTCTCTATCGGCG  
GCCTTTCAATATAGGGATCAATAATCAACAGTTGTCTGTGCTGGACGGGA  
CAGAGTTTGCTTACGGAACCTCAAGCAACTTGCCATCCGCTGTATACAGA  
AAAAGCGGCACGGTGGACTCGCTGGATGAAATCCCGCCCCAGAATAACA  
ACGTGCCCCCTCGGCAAGGCTTCAGTCATCGACTGAGCCACGTTAGCATG  
TTCCGTTCCGGCTTCAGCAACTCCTCCGTAAGTATCATAAGAGCACCTATG  
TTCAGCTGGATACATCGTTCCGCCGAGTTCAATAATATAATTCCTCCTCT  
CAAATCACACAGATCCCTCTGACAAAGTCTACTAATCTTGGCTCTGGGACT  
TCTGTCTGTTAAGGGGCCTGGCTTTACGGGCGGCGATATTCTGCGGAGAAC  
TTCACCTGGCCAGATTTCCACCCTGCGCGTGAATATCACCGCGCCATTGTC  
ACAACGTTACCGCGTGC GGATTCGCTACGCTTCTACCACAAACCTCCAGTT  
CCATACATCTATTGACGGCAGACCCATTAATCAAGGGAATTTCTCCGCCAC  
GATGTCGTCCGGCTCCAATCTCCAGTCCGGAAGTTTCCGCACCGTAGGTTT  
TACTACCCCGTTCAACTTTTCAAACGGCTCAAGTGTGTTTACGCTGTCCGC  
TCATGTGTTCAACTCTGGCAATGAGGTTTACATCGACCGGATTGAGTTTCGT  
CCCGGCAGAAGTCACCTTCGAAGCCGAGTACGATCTTGAGAGGTGA

10

20

30

40

配列番号 4 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 3 4 と呼ばれるポリヌクレオチド配列を示す：

【 0 0 2 9 】

【化 4 - 1】

ATGGAGAATAATATCCAGAATCAATGCGTGCCGTACAACCTGCCTGA  
ATAATCCGGAGGTGGAGATATTAAACGAGGAGAGGAGCACCGGGAGGCT  
GCCGCTGGACATCTCCCTGTCCCTGACCCGCTTCCTGCTGTCCGAGTTCGT  
CCCGGGCGTGGGCGTGGCGTTCGGCCTGTTTCGACCTGATCTGGGGCTTCAT  
CACCCCGAGCGACTGGAGCCTGTTCCCTGCTTCAGATCGAGCAGCTGATCG  
AGCAGAGGATCGAGACCCTGGAGAGGAACCGCGCGATCACCACCCTGAG  
GGGCTTGGCGGACAGCTATGAAATCTACATCGAGGCGCTGAGGGAGTGG  
GAGGCCAACCCGAATAATGCTCAATTAAGGGAGGACGTGAGGATACGCTT  
CGCGAATACAGACGACGCGCTGATCACC GCAATCAATAATTTACCCCTGA  
CCTCCTTCGAGATCCCGCTGCTGAGCGTGTACGTCCAAGCGGCGAACCTG  
CACCTGTCCCTGCTGAGGGACGCCGTGAGCTTTGGCCAAGGCTGGGGCCT  
GGACATCGCGACCGTGAATAATCACTACAACAGATTAATCAACCTGATCC  
ACCGCTACACCAAGCACTGCCTGGACACCTACAATCAAGGCCTGGAGAAC  
CTGAGGGGGACCAACACCCGCCAGTGGGCGAGGTTCAACCAGTTTAGGAG  
GGACCTGACCCTGACCGTGCTGGACATCGTGGCCCTGTTCCCGAACTACG  
ACGTGAGGACCTACCCGATCCAGACCAGCTCCCAATTAACCCGCGAAATC  
TACACCTCCAGCGTGATCGAGGACAGCCCGGTGTCCGCGAACATCCCGAA  
CGGCTTCAACCGCGCGGAGTTCGGCGTGAGGCCGCCGCACCTGATGGACT  
TCATGAACAGCCTGTTTCGTGACCGCCGAGACCGTGAGGTCCCAGACCGTG  
TGGGGAGGCCACCTGGTGTCTCACGCAACACCGCCGGCAACCGCATCAA  
CTTCCCGTCCTACGGCGTGTTC AACCCGGGCGGCGCCATCTGGATCGCCGA  
CGAGGACCCGAGGCGGTTCTACCGCACCCCTGAGCGACCCGGTGTTTCGTGA  
GGGGCGGCTTTGGCAACCCGCACTACGTGCTGGGCCTGAGGGGCGTGGCC  
TTCCAGCAGACCGGCACCAACCACCCGCACTTCCGCAACAGCGGCAC  
CATCGACAGCCTGGATGAAATCCCGCCGCAAGACA ACTCCGGCGCCCCGT  
GGAACGACTACAGCCACGTATTAAACCACGTGACCTTCGTGAGGTGGCCG  
GGCGAAATCTCCGGCAGCGACAGCTGGAGGGCACCGATGTTCTCCTGGAC  
CCATCGGTCCGCGACCCCGACCAATACAATCGACCCGGAGAGGATCACCC  
AGATCCCGCTGGTGAAGGCGCACACCCTTCAGAGCGGCACCACCGTGGTG  
AGGGGACCGGGCTTCACCGGAGGCGACATCCTGAGGAGGACCTCGGGAG  
GACCGTTCGCGTATACTATCGTGAATATAAACGGCCAGCTGCCGCAGCGC

10

20

30

40

【 0 0 3 0】

## 【化 4 - 2】

TACCGGGCACGCATCCGCTACGCCAGCACCACCAACCTGAGGATCTACGT  
GACCGTGCGGGGGAGAGGATCTTCGCGGGCCAGTTCAACAAGACAATG  
GACACCGGAGACCCGCTGACCTTCCAGAGCTTCTCCTACGCCACCATTAAT  
ACAGCGTTCACCTTCCCGATGAGCCAGTCCTCATTACCGTGGGCGCCGAC  
ACCTTCTCCAGCGGCAACGAGGTGTACATCGACCGCTTCGAGCTGATCCC  
AGTGACCGCCACCCTCGAGTGA

10

配列番号 5 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 3 5 と呼ばれるポリヌクレオチド配列を示す：

## 【 0 0 3 1 】

## 【化 5 - 1】

ATGGAGAATAATATCCAGAATCAATGCGTGCCGTACAACCTGCCTGA  
ATAATCCGGAGGTGGAGATATTAAACGAGGAGAGGAGCACCGGGAGGCT  
GCCGCTGGACATCTCCCTGTCCCTGACCCGCTTCCTGCTGTCCGAGTTCGT  
CCCTGGCGTGCGGTGGCGTTCGGCCTGTTTCGACCTGATCTGGGGCTTCAT  
CACCCCGAGCGACTGGAGCCTGTTCTGCTTCAGATCGAGCAGCTGATCG  
AGCAGAGGATCGAGACCCTGGAGAGGAACAGAGCGATCACCACCCTGAG  
AGGCCTGGCGGACAGCTATGAAATCTACATCGAGGCGCTGAGGGAGTGG  
GAGGCCAACCCGAATAATGCTCAATTAAGGGAGGACGTGAGGATACGCTT  
CGCGAATACAGACGACGCGCTGATCACC GCAATCAATAATTTACCCTGA  
CCTCCTTCGAGATCCCGCTGCTGAGCGTGTACGTCCAAGCTGCGAACCTGC  
ACCTGTCCCTGCTGAGGGACGCGTGAGCTTTGGCCAAGGCTGGGGTCTG  
GACATCGCGACCGTGAATAATCACTACAACAGATTAATCAACCTGATCCA  
CCGCTACACCAAGCACTGCCCTGGACACCTACAATCAAGGCCTGGAGAACC  
TGAGGGGACCAACACAAGGCAGTGGGCGAGGTTCAACCAGTTTAGGAG  
GGACCTGACCCTGACCGTGCTGGACATCGTGGCCCTGTTCCCGAACTACG  
ACGTGAGGACCTACCCGATCCAGACCAGCTCCCAATTAACACGCGAAATC  
TACACCTCCAGCGTGATCGAGGACTCTCCGGTGTCCGCGAACATCCCGAA  
CGGCTTCAACAGAGCGGAGTTCGGCGTGAGGCCACCGCACCTGATGGACT  
TCATGAACAGCCTGTTTCGTGACTGCCGAGACCGTGAGGTCCCAGACCGTG  
TGGGGAGGCCACCTGGTGTCTCCTCACGCAACACCGCTGGCAACCGCATCAA  
CTTCCCGTCTACGGCGTGTTCAACCCTGGTGGAGCCATCTGGATCGCCGA  
CGAGGACCCGAGGCCGTTCTACCGCACCTGAGCGACCCGGTGTTCGTGA  
GGGGTGGCTTTGGCAACCCGCACTACGTGCTGGGCCTGAGAGGCGTGGCC  
TTCCAGCAGACCGGCACCAACCACACCCGCACCTTCCGCAACAGCGGCAC  
CATCGACAGCCTGGATGAAATCCCACCGCAAGACAACCTCCGGTGCTCCGT

20

30

40

## 【 0 0 3 2 】

## 【化 5 - 2】

GGAACGACTACAGCCACGTATTAAACACGTGACCTTCGTGAGGTGGCCT  
GGCGAAATCTCCGGCAGCGACAGCTGGAGGGCACCGATGTTCTCCTGGAC  
CCATCGGTCCGCGACCCCGACCAATACAATCGACCCGGAGAGGATCACCC  
AGATCCCGCTGGTGAAGGCGCACACCCTTCAGAGCGGCACCACCGTGGTG  
AGGGGACCTGGCTTCACCGGAGGCGACATCCTGAGGAGGACCTCGGGAG  
GACCGTTCGCGTATACTATCGTGAATATAAACGGCCAGCTGCCGCAGCGC  
TACAGAGCACGCATCCGCTACGCCAGCACCACCAACCTGAGGATCTACGT  
GACCGTGGCTGGGGAGAGGATCTTCGCTGGCCAGTTCAACAAGACAATGG  
ACACCGGAGACCCGCTGACCTTCCAGAGCTTCTCCTACGCCACCATTAATA  
CAGCGTTCACCTTCCCGATGAGCCAGTCCTCATTCACCGTGGGTGCCGACA  
CCTTCTCCAGCGGCAACGAGGTGTACATCGACCGCTTCGAGCTGATCCCA  
GTGACCGCCACCCTCGAGTGA

10

配列番号 6 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 3 6 と呼ばれるポ  
リヌクレオチド配列を示す：

20

【 0 0 3 3 】

## 【化 6 - 1】

ATGGAGAATAATATCCAGAATCAATGCGTGCCGTACAACCTGCCTCA  
ATAATCCGGAGGTGGAGATATTAAACGAGGAGCGCAGCACCGGCCGCCTC  
CCGCTCGACATCTCCCTCTCCCTCACCCGCTTCCTCCTCTCCGAGTTCGTGC  
CGGGCGTGGGCGTGGCCTTCGGCCTCTTCGACCTCATCTGGGGCTTCATCA  
CCCCGTCCGACTGGTCCCTCTTCCTCCTCCAGATCGAGCAGCTCATCGAGC  
AGCGCATCGAGACCCTCGAGCGCAACCGCGCCATCACCAACCTCCGCGGC  
CTCGCCGACTCCTATGAAATCTACATCGAGGCCCTCCGCGAGTGGGAGGC  
CAACCCGAATAATGCCCAATTAAGGGAGGACGTGCGCATCCGCTTCGCCA  
ATACAGACGACGCCCTCATCACCGCAATCAATAATTTACCCCTCACCTCCT  
TCGAGATCCCGCTCCTCTCCGTGTACGTGCAGGCCGCCAACCTCCACCTCT  
CCCTCCTCCGCGACGCCGTGTCCTTCGGCCAGGGCTGGGGCCTCGACATCG  
CCACCGTGAATAATCACTACAACAGATTAATCAACCTCATCCACCGCTAC  
ACCAAGCACTGCCTCGACACCTACAATCAAGGCCTCGAGAACCTCCGCGG  
CACCAACACCCGCCAGTGGGCCCCGCTTCAACCAGTTCCGCCGCGACCTCA  
CCCTCACCGTGCTCGACATCGTGGCCCTCTTCCCGAACTACGACGTGCGCA  
CCTACCCGATCCAGACCTCCTCCCAATTAACCCGCGAGATCTACACCTCCT  
CCGTGATCGAGGACTCCCCGGTGTCCGCCAACATCCCGAACGGCTTCAAC  
CGCGCCGAGTTCGGCGTGCGCCCGCCGCACCTCATGGACTTCATGAATC  
CCTCTTCGTGACCGCCGAGACCGTGCGCTCCCAGACCGTGTGGGGCGGCC

30

40

【 0 0 3 4 】

【化 6 - 2】

ACCTCGTGTCTCCCGCAACACCGCCGGCAACCGCATCAACTTCCCGTCTT  
ACGGCGTGTTC AACCCGGGCGGCGCCATCTGGATCGCCGACGAGGACCCG  
CGCCCGTTCTACCGCACCTCTCCGACCCGGTGTTCGTGCGCGGCGGCTTC  
GGCAACCCGCACTACGTGCTCGGCCTCCGCGGCGTGGCCTTCCAGCAGAC  
CGGCACCAACCACACCCGCACCTTCCGCAACTCCGGCACCATCGACTCCC  
TCGATGAAATCCCGCCGCAGGACAACCTCCGGCGCCCCGTGGAACGACTAC  
TCCCACGTATTAAACCACGTGACCTTCGTGCGCTGGCCGGGCGAGATCTCC  
GGCTCCGACTCCTGGCGCGCGCCGATGTTCTCCTGGACCCACCGCTCCGCC  
ACCCCGACCAATACAATCGACCCGGAGCGCATCACCCAGATCCCGCTCGT  
GAAGGCCCACACCCTCCAGTCCGGCACCAACCGTGGTGCGCGGCCCGGGCT  
TCACCGGCGGGGACATCCTCCGCCGCACCTCCGGCGGCCCGTTTCGCCTATA  
CTATCGTGAATATAAACGGCCAGCTCCCGCAGAGGTACAGGGCCCGCATC  
CGCTACGCCTCCACCACCAACCTCCGCATCTACGTGACCGTGGCCGGCGA  
GCGCATCTTCGCCGGCCAGTTCAACAAGACGATGGACACCGGCGACCCGC  
TCACCTTCCAGTCCCTTCTCCTACGCCACCATTAATACAGCCTTCACCTTCCC  
GATGTCCAGTCCCTTCCCTACCGTGGGCGCCGACACCTTCTCCTCAGGCAA  
CGAGGTCTACATCGACCGCTTCGAGCTGATCCCCGTGACCGCCACCCTCG  
AGTGA

10

20

配列番号 7 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 3 7 と呼ばれるポ  
リヌクレオチド配列を示す：

【 0 0 3 5 】

【化 7 - 1】

30

ATGGAGAATAATATCCAGAATCAATGCGTGCCGTACAACTGCCTCA  
ATAATCCGGAGGTGGAGATATTAAACGAGGAGCGCAGCACCGGACGCCT  
CCCGCTCGACATCTCCCTCTCCCTACCCGCTTCCTCCTCTCCGAGTTCGTG  
CCTGGCGTGGGCGTGGCTTTCGGCCTCTTCGACCTCATCTGGGGCTTCATC  
ACCCCGTCCGACTGGTCCCTCTTCCTCCTCCAGATCGAGCAGCTCATCGAG  
CAGCGCATCGAGACCCTGGAGCGCAACAGAGCCATCACCAACCTCAGAGG  
CCTCGCCGACTCCTATGAAATCTACATCGAGGCCCTCCGCGAGTGGGAGG  
CCAACCCGAATAATGCCCAATTAAGGGAGGACGTCCGCATCCGCTTCGCC  
AATACAGACGACGCCCTCATCACCGCAATCAATAATTTACCCCTCACCTCC  
TTCGAGATCCCGCTCCTCTCCGTGTACGTGCAAGCAGCCAACCTCCACCTC  
TCCCTCCTCCGCGACGCCGTGTGCTTCGGCCAAGGCTGGGGTCTCGACATC  
GCCACCGTGAATAATCACTACAACAGATTAATCAACCTCATCCACCGCTA  
CACCAAGCACTGCCTCGACACCTACAATCAAGGCCTGGAGAACCTCAGAG

40

【 0 0 3 6 】

## 【化 7 - 2】

GCACCAACACACGCCAGTGGGCACGCTTCAACCAGTTCCGCAGAGACCTC  
ACCCTCACCGTGCTCGACATCGTGGCCCTCTTCCCGAACTACGACGTCCGC  
ACCTACCCGATCCAGACCTCCTCCCAATTAACACGCGAAATCTACACCTCC  
TCCGTGATCGAGGACTCTCCGGTGTCCGCCAACATCCCGAACGGCTTCAA  
CAGAGCCGAGTTCGGCGTGAGGCCACCGCACCTCATGGACTTCATGAACT  
CCCTCTTCGTGACAGCCGAGACCGTGGCGCTCCCAGACCGTGTGGGGTGGC  
CACCTCGTGTCTCCAGAAACACCGCTGGCAACCGCATCAACTTCCCGTCC  
TACGGCGTGTTCAACCCTGGCGGAGCCATCTGGATCGCCGACGAGGACCC  
GAGGCCGTTCTACCGCACGCTCTCCGACCCGGTGTTCGTGAGGGGAGGGT  
TCGGCAACCCGCACTACGTGCTCGGCCTCAGAGGCGTGGCCTTCCAGCAG  
ACCGGCACCAACCACACCCGCACCTTCCGCAACTCCGGCACCATCGACTC  
CCTCGATGAAATCCCACCGCAAGACAACTCCGGAGCACCGTGGAACGACT  
ACTCCACGTATTAACACCGTGACCTTCGTGCGCTGGCCTGGCGAAATCT  
CCGGCTCCGACTCCTGGAGGGCACCAGTGTTCCTGGACCCACCGCTCCG  
CCACCCCGACCAATACAATCGACCCGGAGCGCATCACCCAGATCCCGCTC  
GTGAAGGCCACACCCTCCAGTCCGGCACCAACCGTGGTGAGAGGCCCTGG  
CTTCACTGGTGGCGACATCCTCAGACGCACCTCTGGCGGACCGTTCGCCTA  
TACTATCGTGAATATAAACGGCCAGCTCCCGCAGAGATACAGAGCACGCA  
TCCGCTACGCCTCCACCACCAACCTCCGCATCTACGTGACCGTGGCTGGGG  
AGCGCATCTTCGCTGGCCAGTTCAACAAGACGATGGACACTGGCGACCCG  
CTCACCTTCCAGTCCTTCTCCTACGCCACCATTAAATACAGCCTTACCTTCC  
CGATGTCCCAGTCCTCCTTACCGTGGGAGCCGACACCTTCTCATCCGGCA  
ACGAGGTCTACATCGACCGCTTCGAGCTGATCCCCGTGACCGCCACCCTC  
GAGTGA

10

20

30

配列番号 8 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 3 8 と呼ばれるポリヌクレオチド配列を示す：

## 【 0 0 3 7 】

## 【化 8 - 1】

ATGGAGAATAATATACAGAATCAATGCGTCCCCTACAACTGCCTCA  
ATAATCCTGAAGTAGAGATATTAAACGAAGAGAGGTCGACTGGCAGATTG  
CCGTTAGACATCTCCCTGTCCCTTACACGTTTCTGTGTCTGAGTTTGTTC  
CAGGTGTGGGAGTTGCGTTTGGCCTCTTCGACCTCATCTGGGGCTTCATCA  
CTCCATCTGATTGGAGCCTCTTTCTTCTCCAGATTGAACAGTTGATTGAAC  
AAAGGATTGAGACCTTGGAAGGAATCGGGCCATCACTACCCTTCGTGGC  
TTAGCAGACAGCTATGAAATCTACATTGAAGCACTAAGAGAGTGGGAAGC

40

## 【 0 0 3 8 】

【化 8 - 2】

CAATCCTAATAATGCCCAATTAAGAGAAGATGTGCGTATACGCTTTGCTA  
ATACAGATGATGCTTTGATCACAGCAATCAATAATTTACCCTTACCAGCT  
TCGAGATCCCTCTTCTCTCGGTCTATGTTCAAGCTGCTAACCTGCACTTGTC  
ACTACTGCGCGACGCTGTGTCGTTTGGGCAAGGTTGGGGACTGGACATAG  
CTACTGTCAATAATCACTACAACAGATTAATCAATCTGATTCATCGATACA  
CGAAACATTGTTTGGATACCTACAATCAAGGATTGGAGAACCTGAGAGGT  
ACTAACACTCGCCAATGGGCCAGGTTCAATCAGTTCAGGAGAGACCTTAC  
ACTTACTGTGTTAGACATAGTTGCTCTCTTTCCGAACTACGATGTTTCGTAC  
CTATCCGATTCAAACGTCATCCCAATTAACAAGGGAGATCTACACCAGTT  
CAGTCATTGAAGACTCTCCAGTTTCTGCGAACATACCCAATGGTTTCAACA  
GGGCTGAGTTTGGAGTCAGACCACCCCATCTCATGGACTTCATGAACTCTT  
TGTTTGTGACTGCAGAGACTGTTAGATCCCAAACCTGTGTGGGGAGGACAC  
TTAGTTAGCTCACGCAACACGGCTGGCAATCGTATCAACTTTCCTAGTTAC  
GGGGTCTTCAATCCCGGGGGCGCCATCTGGATTGCAGATGAAGATCCACG  
TCCTTTCTATCGGACCTTGTCAGATCCTGTCTTCGTCCGAGGAGGCTTTGG  
CAATCCTCACTATGTACTCGGTCTTAGGGGAGTGGCCTTTCACAAACTGG  
TACGAATCACACCCGCACATTCAGGAACTCCGGGACCATTGACTCTCTAG  
ATGAAATACCACCTCAAGACAACAGCGGCGCACCTTGGAATGACTACTCC  
CATGTATTAAATCATGTTACCTTTGTGCGCTGGCCAGGTGAGATCTCAGGT  
TCCGACTCATGGAGAGCACCAATGTTCTCTTGGACGCATCGTAGCGCTACC  
CCCACAAATACAATTGATCCAGAGAGAATCACTCAGATTCCCTTGGTGAA  
GGCACACACACTTCAGTCAGGAACTACAGTTGTAAGAGGGCCGGGGTTCA  
CGGGAGGAGACATTCTTCGACGCACTAGTGGAGGACCATTTCGCGTATACT  
ATTGTCAATATAAATGGGCAACTTCCCCAAAGGTATCGTGCCAGGATACG  
CTATGCCTCTACTACCAATCTAAGAATCTACGTTACGGTTGCAGGTGAACG  
GATCTTTGCTGGTCAGTTCAACAAGACAATGGATACCGGTGATCCACTTAC  
ATTCCAATCTTTCTCCTACGCCACGATTAATACAGCGTTCACCTTTCCAAT  
GAGCCAGAGCAGTTTCACAGTAGGTGCTGATACCTTCAGTTCAGGCAACG  
AAGTGTACATTGACAGGTTTGAGTTGATTCCAGTTACTGCCACACTCGAGT  
GA

10

20

30

40

配列番号 9 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 3 9 と呼ばれるポリヌクレオチド配列を示す：

【 0 0 3 9 】

【化 9 - 1】

ATGGAGAATAATATACAGAATCAATGCGTCCCCTACAACCTGCCTCA  
ATAATCCTGAAGTCGAGATATTAACGAAGAGAGGTCCACTGGCAGATTG  
CCGTTGGACATCTCCCTGTCCCTTACACGCTTCCTGTTGTCTGAGTTTGTTT  
CTGGTGTGGGAGTTGCGTTTGGCCTCTTCGACCTCATCTGGGGATTTCATCA  
CTCCATCTGATTGGAGCCTCTTTCTTCTCCAGATTGAACAGTTGATTGAAC  
AAAGGATTGAGACCTTGGAAAGGAATAGAGCCATCACTACCCCTTAGAGGC  
CTCGCAGACAGCTATGAAATCTACATTGAAGCACTCAGAGAGTGGGAAGC  
CAATCCCAATAATGCCCCAATTAAGAGAAGATGTGCGGATACGCTTTGCTA  
ATACAGATGATGCTTTGATCACAGCAATCAATAATTTACCCCTTACCAGCT  
TCGAGATCCCTCTTCTCTCGGTCTATGTTCAAGCTGCTAACCTGCACTTGTC  
ACTCCTGCGCGACGCTGTGTGCTTTGGGCAAGGTTGGGGACTGGACATAG  
CTACTGTCAATAATCACTACAACAGATTAATCAATCTGATTTCATCGCTACA  
CGAAACACTGCTTGGATACCTACAATCAAGGATTGGAGAACCTGAGAGGC  
ACTAACACTCGCCAATGGGCGAGGTTCAATCAGTTTAGGAGAGACCTTAC  
ACTTACTGTGCTCGACATAGTTGCTCTCTTTCCGAACACGATGTTTCGCAC  
CTATCCGATTCAAACGTCATCCCAATTAACAAGGGAGATTTACACCAGCT  
CAGTCATTGAGGACTCTCCAGTTTCTGCGAACATACCCAATGGTTTCAACA  
GAGCTGAGTTTGGAGTCAGACCACCCCATCTCATGGACTTCATGAACTCTC  
TCTTTGTGACTGCCGAGACTGTTAGATCCCAAACCTGTGTGGGGAGGACAC  
CTCGTTAGCTCACGCAACACGGCTGGCAATCGCATCAACTTTCCTTCCCTAC  
GGGGTGTTCATCCTGGAGGTGCCATCTGGATTGCAGATGAAGATCCACG  
CCCTTTCTATCGGACCTTGTCAGATCCTGTGTTTCGTCAGAGGAGGCTTTGG  
CAATCCTCACTATGTCCTCGGTCTTAGGGGAGTGGCCTTTCACAAACTGG  
CACGAATCACACCCGCACATTCCGCAACTCCGGGACCATTGACTCCCTTG  
ATGAAATACCACCTCAAGACAACCTCCGGTGCGCCTTGGAATGACTACTCC  
CATGTATTAAATCATGTTACCTTTGTGCGCTGGCCTGGTGAAATCTCCGGT  
TCCGACTCATGGAGAGCACCAATGTTCTCTTGGACGCATCGCAGCGCTAC  
CCCCACAAATACAATCGATCCAGAGAGAATCACTCAGATTCCCTTGGTGA  
AGGCACACACACTTCAGTCGGGAACCTACAGTTGTCAGAGGACCTGGGTTC  
ACGGGAGGAGACATTCTTAGGCGCACCAGCGGAGGACCATTTCGCGTATAC  
TATTGTCAATATAAATGGGCAACTTCCCCAACGCTATAGAGCGAGGATAC

10

20

30

40

【 0 0 4 0】

【化 9 - 2】

GCTATGCCTCTACTACCAATCTTAGAATCTACGTTACGGTCGCTGGTGAAC  
GGATCTTTGCTGGTCAGTTCAACAAGACAATGGATACTGGTGATCCACTTA  
CATTCCAATCTTTCTCCTACGCCACGATTAATACAGCGTTCACCTTTCCAAT  
GAGCCAGAGCAGCTTCACAGTCGGTGCTGATACCTTCTCATCTGGCAACG  
AAGTGTACATTGACCGCTTTGAGTTGATTCCAGTTACTGCCACACTGGAGT  
AA

10

配列番号 10 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 4 0 と呼ばれる  
ポリヌクレオチド配列を示す：

【 0 0 4 1】

【化 10 - 1】

ATGGAGAATAATATCCAGAATCAATGCGTGCCTTACAATTGTCTCA  
ATAATCCCGAGGTGGAGATATTAAACGAGGAGAGATCCACTGGCAGACTG  
CCACTCGACATATCCTTGTCCCTTACCCGTTTCCTTTTGAGCGAATTTGTTC  
CTGGTGTGGGAGTGGCTTTTCGGACTGTTTCGATCTGATATGGGGCTTTATCA  
CTCCTTCTGATTGGAGCCTCTTCCTTCTCCAGATTGAGCAATTGATTGAGC  
AGAGAATAGAAACCTTGGAAGGAACCGTGCAATCACGACCTTGCGCGGT  
CTCGCCGATAGCTATGAAATCTACATTGAAGCACTGAGGGAGTGGGAGGC  
CAACCCCAATAATGCTCAATTAAGGGAAGATGTGCGTATTCGTTTTGCTAA  
TACAGACGACGCTCTCATCACAGCAATCAATAATTTACACTTACATCCTT  
TGAAATCCCGCTTTTGAGCGTGTACGTTCAAGCCGCCAATCTCCACCTCTC  
ACTTCTGAGGGACGCTGTCTCCTTTGGGCAAGGTTGGGGACTGGATATCG  
CTACTGTGAATAATCACTACAATAGATTAATCAACCTGATTCATAGATATA  
CGAAGCACTGCTTGGACACATACAATCAAGGACTGGAGAACCTTAGGGGA  
ACTAACACTAGGCAGTGGGCAAGGTTCAACCAGTTCAGACGTGATCTCAC  
ACTTACTGTGCTGGATATCGTTGCTCTCTTTCCGAACTACGATGTTTCGCAC  
CTACCCAATCCAGACGTCATCCCAATTAACAAGGGAAATCTACACCTCCT  
CAGTGATTGAGGACTCTCCCGTTTCTGCTAACATACCTAACGGCTTCAACC  
GCGCCGAGTTCGGAGTTAGACCGCCCCACCTTATGGACTTTATGAATAGCT  
TGTTTCGTGACTGCTGAGACTGTTAGAAGCCAAACTGTGTGGGGCGGCCAC  
TTGGTCAGCTCACGCAACACGGCTGGCAACCGTATCAACTTCCCGTCTTAC  
GGGGTCTTTAACCCTGGTGGCGCCATTTGGATTGCAGACGAGGACCCACG  
TCCTTTTTACCGCACCTGTTCAGATCCGGTTTTTCGTCAGAGGCGGATTTGG  
GAATCCTCATTATGTCCTGGGCCTTAGGGGAGTGGCTTTCCAACAGACTGG  
CACCAACCACACCCGTACGTTTCGCAATAGCGGGACCATAGATTCTCTTG  
ATGAAATCCACCTCAAGATAACAGCGGCGCACCTTGGAACGATTATTC

20

30

40

【 0 0 4 2】

## 【化 1 0 - 2】

CACGTATTAAATCACGTTACGTTTCGTCCGCTGGCCGGGTGAGATCAGCGG  
CAGCGATTCATGGAGAGCACCAATGTTCTCTTGGACGCACCGTTCAGCCA  
CCCCTACAAATACAATTGACCCGGAGAGGATTACTCAAATCCCATTGGTC  
AAAGCACATACACTTCAGTCTGGGACCACCGTGGTCAGAGGGCCTGGGT  
CACGGGAGGAGACATTCTTAGGCGCACATCCGGAGGACCCTTCGCTTATA  
CTATCGTTAATATAAATGGGCAGCTCCCCCAGCGCTATCGTGCCAGAATCC  
GTTACGCCTCTACTACAAATCTCAGAATCTACGTGACGGTTGCCGGTGAGC  
GCATCTTTGCTGGTCAGTTTAACAAGACGATGGATACTGGCGACCCACTG  
ACATTCCAATCTTTCTCATACGCAACTATTAATACAGCTTTCACATTCCCA  
ATGAGCCAGTCATCTTTCACCGTCGGTGCTGATACCTTCAGCTCTGGCAAC  
GAAGTCTATATCGACAGATTTGAGTTGATTCCAGTTACTGCAACGCTCGAG  
TGA

10

配列番号 1 1 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 4 1 と呼ばれる  
ポリヌクレオチド配列を示す：

20

## 【 0 0 4 3】

## 【化 1 1 - 1】

ATGGAGAATAATATCCAGAATCAATGCGTGCCTTACAACGTCTCA  
ATAATCCCGAGGTGGAGATATTAAACGAGGAGAGATCCACTGGCAGACTG  
CCACTCGACATATCCTTGTCCCTTACCCGCTTCCTTTTGAGCGAATTTGTTC  
CTGGTGTGGGAGTGGCTTTCGGACTGTTTCGATCTGATATGGGGCTTTATCA  
CTCCTTCTGATTGGAGCCTCTTCCTTCTCCAGATTGAGCAGTTGATTGAGC  
AGAGAATAGAAACCTTGGAAGGAATCGGGCAATCACGACCTTGAGGGG  
TCTCGCCGATAGCTATGAAATCTACATTGAAGCACTGAGGGAGTGGGAGG  
CCAACCCCAATAATGCTCAATTAAGGGAAGATGTGCGGATTCGCTTTGCT  
AATACAGACGACGCTCTCATCACAGCAATCAATAATTCACACTTACATCC  
TTTGAAATCCCGCTTTTGAGCGTGTACGTTCAAGCAGCCAATCTCCACCTC  
TCACTTCTGAGGGACGCTGTCTCCTTTGGGCAAGGTTGGGGACTGGATATC  
GCTACTGTGAATAATCACTACAATAGATTAATCAACCTGATTCATAGATAT  
ACGAAGCACTGCTTGACACATACAATCAAGGACTGGAGAACCTTAGGGG  
AACTAACACTAGGCAGTGGGCAAGGTTCAACCAGTTCAGACGCGATCTCA  
CACTTACTGTGCTGGATATCGTTGCTCTCTTCCGAACTACGATGTTGCA  
CCTACCCAATCCAGACGTCATCCCAATTAACAAGGGAAATCTACACCTCC  
TCAGTGATTGAGGACTCTCCCGTTTCTGCTAACATACCTAACGGCTTCAAC  
AGAGCCGAGTTCGGAGTTAGACCACCCACCTTATGGACTTTATGAATAG  
CTTGTTTCGTGACTGCTGAGACTGTTAGAAGCCAAACTGTGTGGGGTGGCC

30

40

## 【 0 0 4 4】

【化 1 1 - 2】

ACTTGGTCAGCTCACGCAACACGGCTGGCAACCGCATCAACTTCCCGTCTT  
ACGGGGTCTTTAACCCTGGTGGAGCCATTTGGATTGCAGACGAGGACCCA  
CGCCCTTTTTACCGCACCTGTGATCCGGTTTTTCGTCAGAGGCGGATTT  
GGGAATCCTCATTATGTCCTGGGCCTTAGGGGAGTGGCTTTCCAACAGACT  
GGCACCAACCACACCCGCACGTTTCGCAATAGCGGGACCATAGATTCTCT  
TGATGAAATCCCACCTCAAGATAACAGCGGAGCACCTTGGAACGATTATT  
CCCACGTATTAAATCACGTTACGTTTCGTCCGCTGGCCTGGTGAGATCAGCG  
GCAGCGATTTCATGGAGAGCACCAATGTTCTCTTGGACGCACCGCTCAGCC  
ACCCCTACAAATACAATCGACCCGGAGAGGATTACTCAAATCCCATTGGT  
CAAAGCACATACACTTCAGTCTGGGACCACCGTGGTCAGAGGGCCTGGGT  
TCACGGGAGGAGACATTCTTAGGGCGCACATCCGGAGGACCCTTCGCTTAT  
ACTATCGTTAATATAAATGGGCAGCTCCCCAGCGCTATAGAGCCAGAAT  
CCGCTACGCCTCTACTACAAATCTCAGAATCTACGTGACGGTTGCCGGTGA  
GCGCATCTTTGCTGGTCAGTTTAAACAAGACGATGGATACTGGCGACCCAC  
TGACATTCCAATCTTTCTCATACGCAACTATTAATACAGCTTTCACATTCCC  
AATGAGCCAGTCATCTTTCACCGTCGGTGCTGATACCTTCAGCTCTGGCAA  
CGAAGTCTATATCGACAGATTTGAGTTGATTCCAGTTACTGCAACGCTCGA  
GTGA

10

20

配列番号 1 2 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 4 2 と呼ばれる  
ポリヌクレオチド配列を示す：

【 0 0 4 5 】

【化 1 2 - 1】

30

ATGGAGAATAATATCCAGAATCAATGTGTCCCATACAACCTGCCTCA  
ATAATCCTGAAGTTGAGATATTAAACGAAGAGAGGAGCACTGGACGCCTT  
CCCCTTGACATCTCCCTCTCCCTCACAAGGTTCCCTCTTGCTGAGTTTGTT  
CTGGTGTGGGTGTGGCCTTTGGCCTCTTTGACCTCATCTGGGGATTCATCA  
CCCCATCTGATTGGAGCCTTTCCTTCTCCAGATTGAACAGTTGATTGAGC  
AGAGGATTGAGACCCTTGAAAGGAACAGAGCCATCACCACACTTAGAGG  
CCTTGCTGACAGCTATGAAATCTACATTGAAGCACTGAGGGAGTGGGAAG  
CCAATCCCAATAATGCTCAATTAAGGGAAGATGTGAGGATTCGCTTTGCC  
AATACAGATGACGCTTTGATCACAGCAATCAATAATTTACCCCTCACCAG  
CTTTGAGATCCCTTTGCTCTCAGTCTATGTTCAAGCTGCAAACCTCCACTTG  
AGCTTGCTTAGGGATGCTGTGTCGTTTCGGACAAGGTTGGGGACTTGACAT  
AGCCACTGTCAATAATCACTACAACAGATTAATCAACTTGATTTCATCGCTA  
CACCAAACATTGCTTGGACACCTACAATCAAGGATTGGAGAACCTCAGAG

40

【 0 0 4 6 】

## 【化 1 2 - 2】

GCACCAACACTCGCCAATGGGCAAGGTTCAACCAGTTTAGAAGGGATCTC  
ACACTCACTGTGCTTGACATAGTTGCTCTCTTCCCCAACTATGATGTTTCGC  
ACCTACCCAATTCAAACCAGCTCCCAATTAACAAGGGAAATCTACACCTC  
CTCAGTCATTGAGGACAGCCCAGTTTCTGCCAACATACCCAATGGTTTCAA  
TAGGGCTGAGTTTGGTGTGAGACCACCCCATCTCATGGACTTCATGAACTC  
CTTGTTTCGTGACTGCCGAGACTGTTAGGTCCCAAACGTGTGGGGAGGCC  
ACCTTGTTAGCTCCCGCAACACCGCTGGCAACCGCATCAACTTCCCATCCT  
ATGGGGTTTTCAATCCTGGTGGAGCCATCTGGATTGCAGATGAGGACCCA  
AGGCCTTTCTACAGAACCTTGTGAGATCCTGTCTTTGTCAGAGGAGGCTTT  
GGCAATCCACACTATGTTCTTGGTTTGGAGGGGAGTGGCTTTTCAGCAGACT  
GGCACC AATCACACCCGCACATTCAGAAACAGCGGCACCATTGACAGCCT  
TGATGAAATCCCACCTCAAGACAACAGCGGAGCACCTTGGAACGACTACT  
CCCATGTATTAAATCATGTCACCTTTGTGCGCTGGCCTGGTGAGATCAGCG  
GTTGAGATTCTTGGAGAGCACCAATGTTCTCATGGACCCATCGCTCTGCCA  
CACCCACAAATACAATAGATCCAGAGAGAATCACCCAGATTCCCTTGGTG  
AAGGCACACACACTTCAGTCTGGAACCACAGTTGTCAGAGGGCCTGGGTT  
CACTGGTGGAGACATTCTCAGACGCACCTCTGGAGGGCCATTTGCTTATAC  
TATTGTCAATATAAATGGGCAACTTCCCCAACGCTACAGAGCCAGAATCC  
GCTATGCTTCCACCACTA ACTTGAGAATCTATGTCACAGTTGCTGGTGAAA  
GGATCTTTGCTGGTCAGTTCAACAAGACAATGGACACTGGTGATCCATTG  
ACATTCCAGTCATTCTCCTATGCCACCATTAATACAGCCTTCACCTTTCCA  
ATGAGCCAGTCCAGCTTCACAGTGGGTGCAGATACCTTCAGCTCCGGCAA  
TGAGGTGTACATTGACCGCTTTGAGTTGATTCCAGTGACTGCCACACTCGA  
GTGA

10

20

30

配列番号 1 3 は、本明細書中のいくつかの箇所で I R D I G . 5 8 6 . 4 3 と呼ばれる  
ポリヌクレオチド配列を示す：

## 【 0 0 4 7 】

## 【化 1 3 - 1】

ATGGAGAATAATATCCAGAATCAATGCGTGCCCTACAACGTGTCTGA  
ATAATCCGGAGGTGGAGATATTAAACGAAGAGCGCTCAACGGGGAGGCT  
CCCGCTGGACATATCCCTGTCGCTTACCCGGTTCTCTTGTCAGTTTCGTT  
CCGGGTGTGGGCGTGGCGTTCGGACTCTTTGATCTCATCTGGGGCTTCATA  
ACCCCTCTGATTGGAGCCTGTTCTCCTCCAGATCGAGCAGCTGATCGAG  
CAGAGGATAGAGACATTGGAGAGGAACCGGGCAATCACACGCTTAGGG  
GACTCGCAGATAGCTATGAAATCTACATTGAAGCCCTGCGCGAGTGGGAA

40

## 【 0 0 4 8 】

【化 1 3 - 2】

GCCAACCCGAATAATGCACAATTAAGGGAGGATGTGAGGATTCGCTTTGC  
CAATACAGACGACGCTCTGATAACGGCAATCAATAATTCACACTTACCA  
GCTTTGAGATCCCCCTTCTGTGCGTCTATGTTCAAGCTGCGAACCTGCACC  
TGTCAGTCTCAGAGACGCTGTCTCGTTCGGCCAAGGCTGGGGACTGGAC  
ATCGCTACCGTGAATAATCATTACAACAGATTAATCAACCTTATTCACAGA  
TACACGAAACATTGCTTGGACACATAACAATCAAGGGCTGGAAAACCTGAG  
GGGCACTAACACTCGCCAGTGGGCCAGATTCAACCAGTTTCGGAGGGATC  
TCACCCTTACTGTGCTTGATATCGTCGCCCTTTTCCCGAACTACGATGTTCC  
GACCTACCCAATTCAGACGTCATCCCAATTAACAAGGGAAATCTACACCA  
GCTCCGTCATTGAAGATTCTCCAGTTTCCGCTAACATCCCTAACGGTTTCA  
ACCGCGCAGAGTTCGGCGTGAGGCCACCCATCTCATGGACTTCATGAAC  
TCTTTGTTTCGTCAGTCCGAGACCGTTAGAAGCCAGACGGTGTGGGGCGG  
ACACCTCGTGTCTCAGCAACACTGCTGGCAACCGGATCAACTTCCCTC  
CTACGGGGTTTTCAACCCTGGTGGAGCCATCTGGATTGCGGACGAGGACC  
CACGCCCTTTCTACCGGACCTTGTGAGACCCTGTCTTTGTGAGAGGGGT  
TCGGCAACCCGCATTATGTCCTGGGCCTCAGAGGCGTCGCGTTTCAGCAG  
ACCGGCACGAACCACACCCGGACGTTCCGGAACAGCGGGACCATCGACTC  
CCTGGATGAAATCCCACCGCAAGACAACAGCGGCGCTCCCTGGAACGACT  
ACAGCCATGTATTAAACCACGTGACCTTTGTCCGCTGGCCTGGTGAGATTT  
CGGGCAGCGACTCATGGAGGGCACCCATGTTCTCTTGGACGCACCGCTCG  
GCCACCCCTACCAATACAATCGATCCGGAGAGGATTACTCAGATCCCGCT  
CGTGAAGGCCCACACCCTTCAGTCCGGAACACTGTTGTGAGGGGTCTCTG  
GGTTTACGGGTGGCGATATTCTTAGGCGCACCTCCGGCGGACCATTCGCCT  
ATACTATTGTCAATATAAACGGGCAACTGCCCCAGAGATATAGAGCACGC  
ATCCGCTACGCCTCTACTACAAACCTGAGGATCTACGTGACGGTTGCCGGT  
GAGCGGATCTTCGCTGGCCAGTTCAACAAGACAATGGACACTGGCGACCC  
ACTCACATTCCAATCATTCTCCTACGCGACCATTAATACAGCGTTTACATT  
CCCAATGAGCCAGTCTAGCTTCACCGTGGGTGCGGACACGTTTTCGTCTGG  
GAACGAGGTCTACATCGACCGCTTTGAGTTGATCCCAGTGACCGCGACAC  
TCGAGTGA

10

20

30

40

配列番号 1 4 は、本明細書のいくつかの箇所で C r y l F t r u n c H x と呼ぶボ  
リヌクレオチド配列を示す：

【 0 0 4 9】

【化 1 4 - 1】

ATGGAGAACAACATACAGAATCAGTGCGTCCCCTACAACCTGCCTCA  
ACAATCCTGAAGTAGAGATTCTCAACGAAGAGAGGTCGACTGGCAGATTG  
CCGTTAGACATCTCCCTGTCCCTTACACGTTTCCTGTTGTCTGAGTTTGTTC  
CAGGTGTGGGAGTTGCGTTTGGCCTCTTCGACCTCATCTGGGGCTTCATCA  
CTCCATCTGATTGGAGCCTCTTTCTTCTCCAGATTGAACAGTTGATTGAAC  
AAAGGATTGAGACCTTGGAAGGAATCGGGCCATCACTACCCTTCGTGGC  
TTAGCAGACAGCTATGAGATCTACATTGAAGCACTAAGAGAGTGGGAAGC  
CAATCCTAACAATGCCCAACTGAGAGAAGATGTGCGTATACGCTTTGCTA  
ACACAGATGATGCTTTGATCACAGCCATCAACAACCTTCACCCTTACCAGCT  
TCGAGATCCCTCTTCTCTCGGTCTATGTTCAAGCTGCTAACCTGCACTTGTC  
ACTACTGCGCGACGCTGTGTTCGTTTGGGCAAGGTTGGGGACTGGACATAG  
CTACTGTCAACAATCACTACAACAGACTCATCAATCTGATTCATCGATACA  
CGAAACATTGTTTGGATACCTACAATCAGGGATTGGAGAACCTGAGAGGT  
ACTAACACTCGCCAATGGGCCAGGTTCAATCAGTTCAGGAGAGACCTTAC  
ACTTACTGTGTTAGACATAGTTGCTCTCTTCCGAACTACGATGTTTCGTAC  
CTATCCGATTCAAACGTCATCCCAACTTACAAGGGAGATCTACACCAGTTC  
AGTCATTGAAGACTCTCCAGTTTCTGCGAACATACCCAATGGTTTCAACAG  
GGCTGAGTTTGGAGTCAGACCACCCCATCTCATGGACTTCATGAACTCTTT  
GTTTGTGACTGCAGAGACTGTTAGATCCCAAACCTGTGTGGGGAGGACACT  
TAGTTAGCTCACGCAACACGGCTGGCAATCGTATCAACTTTCCTAGTTACG  
GGGTCTTCAATCCCGGGGGCGCCATCTGGATTGCAGATGAAGATCCACGT  
CCTTTCTATCGGACCTTGTCAGATCCTGTCTTCGTCCGAGGAGGCTTTGGC  
AATCCTCACTATGTACTCGGTCTTAGGGGAGTGGCCTTTCAACAAACTGGT  
ACGAATCACACCCGCACATTGAGGAACTCCGGGACCATTGACTCTCTAGA  
TGAGATACCACCTCAAGACAACAGCGGCGCACCTTGGAATGACTACTCCC  
ATGTGCTGAATCATGTTACCTTTGTGCGCTGGCCAGGTGAGATCTCAGGTT  
CCGACTCATGGAGAGCACCAATGTTCTCTTGGACGCATCGTAGCGCTACC  
CCCACAAACACCATTGATCCAGAGAGAATCACTCAGATTCCCTTGGTGAA  
GGCACACACACTTCAGTCAGGAACTACAGTTGTAAGAGGGGCCGGGGTTCA  
CGGGAGGAGACATTCTTCGACGCACTAGTGGAGGACCATTTCGCGTACACC  
ATTGTCAACATCAATGGGCAACTTCCCCAAAGGTATCGTGCCAGGATACG

10

20

30

40

【 0 0 5 0】

## 【化 1 4 - 2】

CTATGCCTCTACTACCAATCTAAGAATCTACGTTACGGTTGCAGGTGAACG  
 GATCTTTGCTGGTCAGTTCAACAAGACAATGGATACCGGTGATCCACTTAC  
 ATTCCAATCTTTCTCCTACGCCACTATCAACACCGCGTTACCTTTCCAATG  
 AGCCAGAGCAGTTTACAGTAGGTGCTGATACCTTCAGTTCAGGCAACGA  
 AGTGTACATTGACAGGTTTGAGTTGATTCCAGTTACTGCCCACTCGAGTA

A

10

配列番号 15～29 は、本明細書における特定の実施形態で用いた例示的プライマーおよびプローブを示す。

## 【0051】

発明を実施するための形態

## I. いくつかの実施形態の概要

合成遺伝子がコードされたタンパク質産物の発現増加のために該合成遺伝子を工学的に操作するための組成物および方法を、本明細書において提供する。ネイティブ遺伝子中に存在するポリアデニル化配列を含むように合成遺伝子のヌクレオチド配列を工学的に操作することによって植物細胞における異種タンパク質発現を増加させることができるという予想外の、一般に適用可能な発見を、本明細書において開示する。いくつかの実施形態において、ポリアデニル化配列は、合成遺伝子中に、ネイティブ遺伝子中に存在するのと同じ数で同じ場所に含まれる。そのような合成遺伝子は、従来のアプローチを用いて設計された合成遺伝子と比較して、V5 葉組織における平均タンパク質発現の（例えば約 0.5 倍～約 17 倍の）増加を明示することが、いくつかの例で驚くべきことに予想外に判明した。

20

## 【0052】

ポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドは、例えば、限定ではないが、優先コドン（例えば最優先コドン）での低頻度コドンの置換、既知不安定化因子の除去、二次ステムループ構造を形成すると予想される配列の除去、意図されないオープンリーディングフレームの除去、および不必要な内部制限酵素認識配列の除去を含むプロセスによって、工学的に作製することができる。本明細書における実施形態において、ポリペプチドをコードする、結果として得られるポリヌクレオチドは、同一ヌクレオチド位置に同じポリペプチドをコードするネイティブ遺伝子中に存在する少なくとも 1 つの特異的ポリアデニル化配列を含むように、例えば指定のポリアデニル化配列の場所および総数を維持するように、さらに修飾される。

30

## 【0053】

本明細書における特異的例は、殺虫性 Bt タンパク質をコードする 9 つの異なる遺伝子およびグリホサート耐性遺伝子を用いてトウモロコシで上述の発見を実証する。本明細書における特定の例では、上述の方法および組成物を用いて、作物植物（例えばトウモロコシおよびダイズ）において異種ポリペプチドを発現するように合成ポリヌクレオチドを工学的に作製する。例えば、切断型 cry1Ab 遺伝子の 3 つの配置の発現を T<sub>0</sub> 世代の遺伝子導入トウモロコシにおいて評価した。ネイティブポリアデニル化配列が保存されている cry1Ab ポリヌクレオチドの 1 つは、評価した他のポリヌクレオチドより有意に高レベルで、安定した Cry1Ab タンパク質を生産することが確認された。さらなる例として、切断型 cry1Fa 遺伝子の 12 つの配置の発現も T<sub>0</sub> 世代のトウモロコシにおいて評価した。2 つの cry1Fa ポリヌクレオチドは、評価した他のすべてのポリヌクレオチドより有意に高レベルで、安定した Cry1Fa タンパク質を生産した。

40

## 【0054】

## II. 略語

Bt バチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis)

50

アメリカタバコガ幼虫 C E W  
 E C B アワノメイガ  
 F A W ツマジロクサヨトウ  
 G F P 緑色蛍光タンパク質  
 N C B I (米国) 国立生物学情報センター  
 P C R ポリメラーゼ連鎖反応  
 r E C B C r y 1 F a 抵抗性アワノメイガ

## 【0055】

I I I. 用語

単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」の使用は、文脈による別段の明確な指示がない限り、複数の言及対象を含む。例えば、「ポリヌクレオチド(a polynucleotide)」への言及は、複数のポリヌクレオチド(polynucleotides)を含み、「基質(a substrate)」への言及は、複数のそのような基質(substrates)を含み、「変異体(a variant)」への言及は、複数のそのような変異体(variants)を含む等々。

10

## 【0056】

値の範囲が列举されている場合、その範囲の列举されている上限と下限の間の介在する各々の整数値およびそれらの各々の分数も、そのような値間の各々の部分範囲とともに、具体的に開示されている。任意の範囲の上限および下限を独立してその範囲に含めるまたは除外することができ、いずれかの制限を含む、いずれの制限も含まない、または両方の制限を含む各々の範囲も本発明に包含される。論じられている値が固有の制限を有する場合(例えば、成分が0~100%の濃度で存在することができる場合、または水溶液のpHが1~14の範囲である場合)には、それらの固有の制限が具体的に開示されている。

20

## 【0057】

値が明示的に列举されている場合、列举されている値とほぼ同じ数量または量である値も本発明の範囲内であると解されるものとする。組み合わせが開示されている場合、その組み合わせの要素の部分的組み合わせ各々も具体的に開示されており、本発明の範囲内である。逆に、異なる要素または要素の群が個々に開示されている場合、それらの組み合わせも開示されている。本発明のいずれかの要素が複数の代替物を有すると開示されている場合、各代替物が個々にまたは他の代替物との組み合わせで除外される本発明の実施例も本明細書によって開示されている(本発明の1つより多くの要素は、そのような除外を有することがあり、そのような除外を有する要素のすべての組み合わせが本明細書によって開示されている)。

30

## 【0058】

別段の定めがない限り、本明細書において用いるすべての技術および科学用語は、遺伝学、生物情報学および遺伝子設計技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。本開示において用いる用語の多くを収録している一般的な辞書は、Singleton et al. (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. 2nd Ed., John Wiley and Sons, New York; およびHale and Marham (1991) The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, New Yorkである。特定の方法及び材料は、本明細書において開示するものによって例示されるが、本明細書に記載するものと同様または等価の任意の方法及び材料を本発明の実施形態の実施または試験の際に使用してもよい。

40

## 【0059】

コドン使用頻度の偏向：本明細書で用いる場合、用語「コドン使用頻度の偏向」または単に「コドン使用頻度」は、生物体内のアミノ酸をコードする特定のコードンの(他の同義コードンとは対照的に)高頻度の優先的使用を指す。コドン使用頻度の偏向は、例えば同じアミノ酸をコードする他のコードンと比較したときの、特定の生物のゲノムにおいて特定のコードンが使用される率の定量的測定値として表すことができる。

## 【0060】

50

コドン使用頻度の偏向を決定するための様々な方法が当業者に公知である。いくつかの実施形態では、本質的に、ある遺伝子のコドン使用頻度の高度に発現される遺伝子の被定義セットのコドン使用頻度への距離の測定値である、コドン適応指数 (C A I) 方法によって、コドン使用頻度の偏向を決定することができる。Sharp and Li (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:1281-95。コドン使用頻度の偏向を決定するための代替方法としては、M I L C (長さおよび組成の独立した測定) (Supek and Vlahovicek (2005) *BMC Bioinformatics* 6:182)、およびそのアミノ酸についてのすべての同義コドンの同等の使用頻度から予想される頻度で割った特定のコードンの実測頻度である相対同義コドン使用頻度 (R S C U) が挙げられる。Sharp et al. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:5125-43。1. 0に近いR S C U値は特定のコードンについての偏向がないことを示すが、1. 0からの逸脱はコードン使用頻度の偏向を表す。

10

#### 【0061】

したがって、コドン使用頻度の偏向は、同じアミノ酸をコードするコードン (「同義コードン」) の使用の相対頻度を含む。偏向は自然に起こることもある。例えば、生物のゲノムにおけるコードンの偏向は、その生物におけるすべての遺伝子中の同義コードンの相対的全使用を表す。偏向を計算アルゴリズムに使用してもよく、その場合、例えば、そのアルゴリズムを用いて、様々な同義コードンがポリヌクレオチド配列の設計における使用に選択される相対頻度を決定してもよい。同様に、ヌクレオチド配列内のポリペプチドをコードするために使用される任意の配列エレメントの「相対」頻度は、所与リーディングフレーム内のポリペプチドにおけるその配列エレメントによってコードされ得る特徴の出現数で割った、その配列エレメントがポリペプチドの特徴をコードするために使用される頻度である。

20

#### 【0062】

コドン使用頻度の偏向を特定の発現宿主生物についてのコードン使用頻度表から推論してもよい。多くの発現宿主生物についてのコードン使用頻度表を容易に入手できる。例えば、Nakamura et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:292 (Codon Usage Database—アップデート版はkazusa.or.jp/codonで入手可能) を参照されたい。コードン使用頻度表が入手できない場合、N C B Iによって保守されているもの (ncbi.nlm.nih.gov/sites/genomeで入手可能) などの公開生物遺伝子データベースからアセンブルしてもよい。いくつかの実施形態では、コードン使用頻度表を特定の発現宿主生物から得られる1セットのコード領域からアセンブルすることもある。いくつかの例では、1セットのコード領域は、特定の発現宿主生物から得られる少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも550、少なくとも600以上のコード領域を含む。

30

#### 【0063】

用語「コードン使用頻度表」または「コードンの偏向表」または「コードン頻度表」は、同義で用いており、特定のアミノ酸をコードするために使用され得る各コードンと、各コードンが、特定の生物において、その生物における指定遺伝子クラス内で、または1つもしくは複数の合成ポリヌクレオチド中でそのアミノ酸をコードするために使用される頻度とを相関させる表を示す。

40

#### 【0064】

絶対コードン頻度：本明細書で用いる場合、用語「絶対コードン頻度」は、所与のリーディングフレーム (例えば、目的のポリペプチドをコードするために使用されるリーディングフレーム) 内のポリヌクレオチドまたは1セットのポリヌクレオチド中のコードン (例えば、同義コードンと非同義コードン両方) の総数に対する、コードンが現れる頻度を指す。同様に、ポリヌクレオチド中のポリペプチドをコードするために使用される任意の配列エレメントの「絶対」頻度は、その配列エレメントによってコードされ得るものと同じサイズの特徴がポリペプチド中で出現する数で割った、その配列エレメントが前記ポリペプチドの特徴 (例えば、アミノ酸、アミノ酸対など) をコードするために使用される頻度である。

#### 【0065】

50

コドンの偏向およびコドン頻度に関して本明細書で用いる場合、「低頻度コドン」は、目的の生物において10%未満の使用頻度を有するコドンである。いくつかの例では、「低頻度コドン」は、生物において5%未満の使用頻度を有するコドンである。本明細書で用いる場合、「優先コドン」は、目的の生物において5%より高い使用頻度を有するコドンである。いくつかの例では、「最優先コドン」は、生物において10%より高い使用頻度を有するコドン、例えば、生物において特定のアミノ酸のコード化に関して最も高い使用頻度を有するコドンである。

#### 【0066】

コドン空間 (codon space) : 本明細書で用いる場合、用語「コドン空間」は、特定のポリペプチド中のアミノ酸をコードするために使用されるコドンを変えることによって、その特定のポリペプチドをコードするために使用することができる可能性のあるすべてのポリヌクレオチド配列を指す。

10

#### 【0067】

コドン置換 : 本明細書で用いる場合、用語「コドン置換」は、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列を変えずに、コードされたポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸をコードするコドンの1つまたは複数を変更することによる、ヌクレオチドコード配列の改変を指す。

#### 【0068】

コドン最適化 : 本明細書で用いる場合、用語「コドン最適化」は、先ず第1に、例えば、コード配列から転写された転写物RNA分子の発現宿主細胞もしくは生物における翻訳を改善するように、またはコード配列の転写を改善するように、既存のコード配列を修飾する、またはコード配列を設計するために用いられるプロセスを指す。コドン最適化は、発現宿主生物のコドン優先度に適合するようにコード配列のコドンを選択することを含むプロセスを含むが、これらに限定されない。コドン最適化は、例えば、「コドン調和 (codon harmonization)」と呼ばれることもあるプロセスであって、ソース生物において低使用頻度コドンと見なされるコドン配列のコドンが新たな発現宿主において低使用頻度と見なされるコドンに改変されるプロセスも含む。このプロセスは、発現されるポリペプチドが折り重なることを、通常は、翻訳／伸長中に自然で適切な休止期を導入することによって、助長することができる。Birkholtz et al. (2008) Malaria J. 7:197-217。

20

#### 【0069】

遺伝コードの冗長性のため複数のDNA配列が単一のアミノ酸配列をコードするように設計されることがあることは、理解されるであろう。したがって、最適化DNA配列は、コドン領域のヌクレオチド配列を最適化すると同時に、例えば、過剰な制限部位および望ましくないRNA二次構造を除去するように設計されることがあり、その結果、コドン組成は、DNAが発現されることになる宿主の全コドン組成に似ている。合成DNA配列の設計および生産に関するガイダンスは、例えば、PCT国際公開特許出願番号WO2013/016546、WO2011/146542およびWO1997/013402、ならびに米国特許第6,166,302号および同第5,380,831号において見つけることができる。

30

#### 【0070】

修飾する : 本明細書で用いる場合、用語「修飾する」または「改変する」またはそれらの任意の形態は、修飾する、改変する、置き換える、欠失させる、置換する、除去する、変える、または形質転換することを意味する。

40

#### 【0071】

戻し交配 : 戻し交配方法は、核酸配列を植物に導入するために用いることができる。戻し交配技術は、新たな形質を植物に導入するために数十年にわたって広く使用されてきた。Jensen, N., Ed. Plant Breeding Methodology, John Wiley & Sons, Inc., 1988。典型的な戻し交配プロトコルでは、目的の原品種 (反復親) を、移入すべき目的の遺伝子を有する第2の品種 (非反復親) と交配させる。次いで、その交配の結果として生じる後代を反復親と再び交配させ、このプロセスを植物が得られるまで繰り返し、非反復親からの

50

移入遺伝子に加えて、反復植物の所望の形態学および生理学的特徴の本質的にすべてを転換植物において回収する。

#### 【0072】

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、成分の化学的または機能的変化をもたしつづ、成分が天然に存在する生物の細胞中の他の生体成分（すなわち、他の染色体または染色体外DNAおよびRNA、ならびにタンパク質）から実質的に分離された、そのような生体成分とは別に生産された、またはそのような生体成分から切り離して精製されたものである（例えば、核酸は、染色体から、該核酸と該染色体内の残りのDNAとを連結している化学結合を壊すことによって単離することができる）。「単離された」核酸分子およびタンパク質は、標準的な精製方法によって精製された核酸分子およびタンパク質を含む。この用語は、宿主において組み換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学合成された核酸分子、タンパク質およびペプチドも包含する。

10

#### 【0073】

核酸分子：本明細書で用いる場合、用語「核酸分子」は、ヌクレオチドの重合形態（RNA、cDNA、ゲノムDNAのセンス鎖とアンチセンス鎖の両方を含み得る）、および合形成態、ならびに上記のものの混合ポリマーを指すことがある。ヌクレオチドは、リボヌクレオチドを指すこともあり、デオキシリボヌクレオチドを指すこともあり、またはいずれかのタイプのヌクレオチドの修飾形態を指すこともある。「核酸分子」は、本明細書で用いる場合、「核酸」および「ポリヌクレオチド」と同義である。核酸分子は、別段の規定がない限り、通常は少なくとも10塩基の長さである。この用語は、1本鎖および2本鎖形態のDNAを含む。核酸分子は、天然に存在するおよび／または天然に存在しないヌクレオチド結合によって互いに連結されている、天然に存在するヌクレオチドおよび修飾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。

20

#### 【0074】

当業者には容易に理解されるであろうが、核酸分子は、化学的もしくは生化学的に修飾されることもあり、または非天然もしくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含有することもある。そのような修飾としては、例えば、標識、メチル化、1つまたは複数の天然に存在するヌクレオチドの類似体での置換、ヌクレオチド間修飾（例えば、非荷電結合、例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、アミド亜リン酸エステル、カルバミン酸エステルなど；荷電結合：例えばチオリン酸エステル、ジチオリン酸エステルなど；ペンダント部分：例えばペプチド；挿入剤：例えばアクリジン、ソラレンなど；キレート剤；アルキル化剤；および修飾結合：例えばαアノマー核酸など）が挙げられる。用語「核酸分子」は、1本鎖、2本鎖、部分的二重鎖、三重鎖、ヘアピン型、環状および南京錠型高次構造をはじめとする任意のトポロジカル高次構造も含む。

30

#### 【0075】

作動可能に連結された：第1のヌクレオチド配列と第2の核酸配列は、第1の核酸配列が、第2の核酸配列と機能的関係にある場合、作動可能に連結されている。組み換え生産された場合、作動可能に連結された核酸配列は、一般に、同じリーディングフレーム（例えば、ポリシストロン性ORF）内で近接しており、必要に応じて2つのタンパク質コード領域を接続するように近接している。しかし、核酸は、作動可能に連結されるように近接している必要はない。

40

#### 【0076】

用語「作動可能に連結された」は、調節配列およびコード配列に関して用いる場合、調節配列が、連結されたコード配列の発現に影響を及ぼすことを意味する。「調節配列」または「制御エレメント」は、転写、RNAプロセッシングもしくは安定性または関連コード配列の翻訳のタイミングおよびレベル／量に影響するヌクレオチド配列を指す。調節配列としては、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、エンハンサー、ステムループ構造、リプレッサー結合配列、終結配列、およびポリアデニル化認識配列を挙げることができる。特定の調節配列が、該配列に作動可能に連結されたコード配列の上流および／ま

50

たは下流に位置することもある。また、コード配列に作動可能に連結された特定の調節配列が、2本鎖核酸分子の関連相補鎖上に位置することもある。

#### 【0077】

プロモーター：本明細書で用いる場合、用語「プロモーター」は、転写開始から上流であり得る、ならびにRNAポリメラーゼおよび転写を開始させる他のタンパク質の認識および結合に関与し得る、DNAの領域を指す。プロモーターは、細胞での発現のためにコード配列に作動可能に連結されることもあり、またはプロモーターは、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、ヌクレオチド配列が細胞での発現のためにコード配列に作動可能に連結されることもある。「植物プロモーター」は、植物細胞において転写を開始させることができるプロモーターであり得る。発生制御下のプロモーターの例としては、特定の組織、例えば葉、根、種子、繊維、木部導管、仮導管または厚壁組織、において転写を優先的に開始させるプロモーターが挙げられる。そのようなプロモーターを「組織優先的」と言う。特定の組織においてのみ転写を開始させるプロモーターを「組織特異的」と言う。「細胞タイプ特異的」プロモーターは、1つまたは複数の器官の特定の細胞タイプ、例えば、根または葉の維管束細胞での発現を主として駆動する。「誘導性」プロモーターは、環境制御下にあり得るプロモーターであり得る。誘導性プロモーターによって転写を開始し得る環境条件の例としては、嫌気性条件および光の存在が挙げられる。組織特異的、組織優先的、細胞タイプ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、殆どの環境条件下で生物の殆どの細胞において活性であり得るプロモーターである。

#### 【0078】

任意の誘導性プロモーターを本発明のいくつかの実施形態において使用することができる。Ward et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-66を参照されたい。誘導性プロモーターを用いると、転写速度が誘導剤に応じて増加する。例示的誘導性プロモーターとしては、銅に応答するACEI系からのプロモーター；ベンゼンスルホンアミド除草剤解毒剤に応答するトウモロコシからのIn2遺伝子；Tn10からのTetリプレッサー；および転写活性が糖質コルチコステロイドホルモンによって誘導され得る、ステロイドホルモン遺伝子からの誘導性プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない (Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10421-5)。

#### 【0079】

例示的構成的プロモーターとしては、植物ウイルスからのプロモーター、例えば、CaMVからの35Sプロモーター；イネアクチン遺伝子からのプロモーター；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、すなわち、セイヨウアブラナ (Brassica napus) ALS3構造遺伝子の5'側のXba1/NcoI断片（または前記Xba1/NcoI断片とのヌクレオチド配列類似性）（PCT国際特許公開番号WO96/30530）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0080】

加えて、任意の組織特異的または組織優先的プロモーターを本発明のいくつかの実施形態において用いることができる。組織特異的プロモーターに作動可能に連結されたコード配列を含む核酸分子で形質転換された植物は、特異的組織において排他的にまたは優先的にコード配列の産物を生産することができる。例示的組織特異的または組織優先的プロモーターとしては、根優先的プロモーター、例えばファゼオリン遺伝子からのもの；葉特異的および光誘導プロモーター、例えばcabまたはrubiscoからのもの；葯特異的プロモーター、例えばLAT52からのもの；花粉特異的プロモーター、例えばZm13からのもの；小孢子優先的プロモーター、例えばapgからのもの；ならびに種子特異的プロモーター（例えば、Pvd1ec2、LfKCS3、FAE1、BoACPまたはBnNapinCからのプロモーター）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0081】

異種の：用語「異種の」は、本明細書において核酸（例えば、ポリヌクレオチド、DN

A、RNAおよび遺伝子)に適用する場合、異なる起源の、を意味する。例えば、宿主細胞が、自然界で非形質転換宿主細胞中に存在しない核酸で形質転換される場合には、その核酸は、その宿主にとって異種(および外来性)である。さらに、形質転換する核酸の異なるエレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、コード配列、ターミネーターなど)は、互いに異種であることもあり、および/または形質転換される宿主にとって異種であることもある。

#### 【0082】

ネイティブ：本明細書で用いる場合、用語「ネイティブ」は、ポリヌクレオチドまたは遺伝子の形態であって、自然界で見いだされる生物体内または生物のゲノム内のその天然の場所にある形態を指す。

10

#### 【0083】

内在性：本明細書で用いる場合、用語「内在性」は、ポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドであって、自然界でその分子を通常含む生物体内またはゲノム内に位置するポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドを指す。

#### 【0084】

形質転換：本明細書で用いる場合、用語「形質転換」は、細胞への1つまたは複数の核酸分子の移入を指す。細胞は、細胞ゲノムへの核酸分子の組み込みまたはエピソード複製のいずれかによって核酸分子が細胞により安定的に複製された状態になるとき、その細胞に形質導入された核酸によって「形質転換される」。本明細書で用いる場合、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術を包含する。例としては、ウイルスベクターでの形質転換、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取り込み、および微粒子銃(Klein et al. (1987) Nature 327:70)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0085】

導入遺伝子：宿主のゲノムに組み込まれている産物をコードする外来性ポリヌクレオチド。いくつかの例では、導入遺伝子は、該導入遺伝子のコード配列に作動可能に連結された調節配列(例えばプロモーター)を含有することがある。

30

#### 【0086】

ベクター：例えば形質転換細胞を生産するために、細胞に導入されるような核酸分子。ベクターは、該ベクターが宿主細胞において複製するのを可能にする核酸配列、例えば複製起点を含むことがある。ベクターの例としては、プラスミド；コスミド；バクテリオファージ；または細胞に外来性DNAを運ぶウイルスが挙げられるが、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技術分野において公知の他の遺伝エレメントも含むことがある。ベクターは、細胞を形質導入、形質転換または感染させることができ、それによって、そのベクターによってコードされた核酸分子および/またはタンパク質をその細胞に発現させる。ベクターは、細胞への核酸分子の侵入達成を助長するための物質(例えば、リポソーム、およびタンパク質コーティング)を場合により含む。

40

#### 【0087】

発現：本明細書で用いる場合、用語「発現」は、ポリヌクレオチドによってコードされたmRNAの転写および安定した蓄積を指すこともあり、またはそのようなmRNAのポリペプチドへの翻訳を指すこともある。用語「過剰発現」は、本明細書で用いる場合、同じ遺伝子または近縁遺伝子の内在性発現より多い発現を指す。異種遺伝子は、その発現が近縁内在性遺伝子(例えばホモログ)のものより多い場合、過剰発現される。

#### 【0088】

外来性：用語「外来性」は、本明細書において核酸(例えば、ポリヌクレオチド、DNA

50

A、RNAおよび遺伝子)に適用する場合、1つまたは複数の核酸であって、それらの特異的環境または状況の中で通常存在しない核酸を指す。例えば、宿主細胞が、自然界で非形質転換宿主細胞中に存在しない核酸で形質転換される場合には、その核酸は、その宿主細胞にとって外来性である。用語外来性は、本明細書で用いる場合、宿主細胞に既に存在する核酸と配列が同一であるが、その宿主細胞に既に存在する同じ配列を有する核酸とは異なる細胞状況またはゲノム状況にある、1つまたは複数の核酸も指す。例えば、同じ配列を有する核酸が宿主細胞のゲノムに通常組み込まれるのとは異なる場所でその宿主細胞のゲノムに組み込まれている核酸は、その宿主細胞にとって外来性である。さらに、宿主細胞内のプラスミドまたはベクターに存在する核酸(例えばDNA分子)は、同じ配列を有する核酸がその宿主細胞のゲノムにしか通常存在しない場合、その宿主細胞にとって外来性である。

10

#### 【0089】

配列同一性：用語「配列同一性」または「同一性」は、本明細書において2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの文脈で用いる場合、指定比較ウィンドウにわたって最大に一致するようにアラインしたとき同じである2配列中の残基(それぞれ、ヌクレオチドまたはアミノ酸)を指すことがある。

#### 【0090】

本明細書で用いる場合、用語「配列同一性百分率」は、比較ウィンドウにわたって最適にアラインされた2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って決定される値を指すことがあり、比較ウィンドウ内の配列の一部は、2配列の最適アラインメントのための(付加または欠失を含まない)基準配列と比較して、付加または欠失(すなわちギャップ)を含むことがある。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中に存在する位置の数を決定してマッチ位置の数を得、そのマッチ位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100をかけて配列同一性百分率を得ることによって算定される。

20

#### 【0091】

比較のために配列をアラインする方法は、当技術分野において周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5: 151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50に記載されている。配列アラインメント方法および相同性計算についての詳細にわたる検討は、例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10において見つけることができる。

30

#### 【0092】

(米国)国立生物学情報センター(NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST (商標)、Altschul et al. (1990))を、いくつかの配列分析プログラムとともに使用するために、国立生物学情報センター(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、入手することができる。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」セクションで入手することができる。核酸配列の比較のために、デフォルトパラメータを使用してBLAST (商標) (Blastn)プログラムの「Blast 2 sequences」機能を用いてもよい。基準配列との類似性がよりいっそう大きい核酸配列は、この方法によって評価したとき、同一性百分率増加を示すことになる。

40

#### 【0093】

本明細書で用いる場合、用語「実質的に同一の」は、85%より高く同一であるヌクレオチド配列を指すことがある。例えば、実質的に同一のヌクレオチド配列は、基準配列と

50

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% 同一であることがある。

#### 【0094】

いくつかの実施形態において、植物における異種核酸の存在は、核酸プローブの使用によって検出されることがある。プローブは、DNA 分子であることもあり、または RNA 分子であることもある。RNA プローブは、当技術分野において公知の手段によって、例えば、DNA 分子テンプレートを使用して合成することができる。プローブは、異種核酸のヌクレオチド配列のすべてまたは一部と植物ゲノムからの追加の連続ヌクレオチド配列とを含有することがある。これを本明細書では「連続プローブ」と呼ぶ。追加の連続ヌクレオチド配列を、従来理解されているように、植物染色体からのその連続ヌクレオチド配列が異種核酸の 5' 側にあるのか 3' 側にあるのかに依存して、異種核酸の「上流」または「下流」と呼ぶ。当業者には分かるように、プローブに含めるための追加の連続ヌクレオチド配列を得るプロセスをほぼ無期限に繰り返し（染色体の長さによってのみ制限される）、それによって染色体に沿って追加の核酸を同定することができる。上記の様々なプローブのいずれかおよびすべてを、本発明のいくつかの実施形態において使用することがある。

#### 【0095】

プローブは、異種核酸のものに連続していないヌクレオチド配列を含有することもあり、このプローブを本明細書では「非連続プローブ」と呼ぶ。非連続プローブの配列は、染色体上の異種核酸配列の十分近くに位置し、したがって非連続プローブは異種核酸と遺伝的に連鎖している。プローブは、検出される異種核酸の正確なコピーであることもある。プローブは、検出される異種核酸を含む染色体 DNA のクローン化セグメントと実質的に同一であるヌクレオチド配列を含む、またはそのようなヌクレオチド配列からなる、核酸分子であることもある。

#### 【0096】

オリゴヌクレオチドプローブ配列は、合成的に調製されることもあり、またはクローニングによって調製されることもある。好適なクローニングベクターは、当業者に周知である。オリゴヌクレオチドプローブは、標識されていることもあり、または未標識であることもある。核酸分子を標識するための多種多様な技術が存在し、そのような技術としては、例えば、限定ではないが、ニックトランスレーションによる放射性標識；ランダムプライミング；末端デオキシトランスフェラーゼでのテーリングなどが挙げられ、用いられるヌクレオチドは、例えば放射性  $^{32}\text{P}$  で標識される。使用することができる他の標識としては、例えば、限定ではないが、フルオロフォア、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤などが挙げられる。あるいは、単独でまたは他の反応性薬剤と協力して検出可能なシグナルをもたらす標識を使用する代わりに、受容体が結合するリガンドを使用してもよく、その場合、受容体を（例えば、上に示した標識によって）標識して、単独でまたは他の試薬と協力して検出可能なシグナルをもたらす。例えば、Leary et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4045-9を参照されたい。

#### 【0097】

プローブは、検出されるマーカーの正確なコピー（「DNA 標的」）に「特異的にハイブリダイズ可能」または「特異的に相補的」である核酸分子であることもある。「特異的にハイブリダイズ可能」または「特異的に相補的」は、核酸分子と DNA 標的間に安定した特異的な結合が存在するために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、特異的な結合が望まれる条件下、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な結合を回避するために十分な相補性度がある場合、特異的にハイブリダイズ可能である。

## 【0098】

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、選ばれるハイブリダイゼーション方法の性質ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに依存して変わることになる。一般に、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用緩衝液のイオン強度（特に $\text{Na}^+$ および／または $\text{Mg}^{++}$ 濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決めることになるが、洗浄時間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達成するために要するハイブリダイゼーション条件に関する計算は当業者に公知であり、例えば、Sambrook et al. (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup>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において論じられている。核酸のハイブリダイゼーションに関するさらなる詳細な説示およびガイダンスは、例えば、Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993; および Ausubel et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995において見つけることができる。

## 【0099】

本明細書で用いる場合、「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標的の間に25%未満のミスマッチが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、特定のストリンジェンシーレベルをさらに含む。したがって、本明細書で用いる場合、「低ストリンジェンシー」条件は、25%より多くの配列ミスマッチを有する分子がハイブリダイズしない条件であり、「中ストリンジェンシー」の条件は、15%より多くのミスマッチを有する分子が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、10%より多くのミスマッチを有する配列が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、6%より多いミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件である。

## 【0100】

特定の実施形態において、ストリンジェント条件は、65℃で6x食塩水ークエン酸ナトリウム（SSC）緩衝液、5xデンハート液、0.5% SDS および100 μg 剪断サケ精巢DNA中でのハイブリダイゼーション、続いて65℃で2x SSC 緩衝液および0.5% SDS、続いて1x SSC 緩衝液および0.5% SDS、そして最後に0.2x SSC 緩衝液および0.5% SDS 中での15～30分の逐次的洗浄である。

## 【0101】

上で論じたすべてのプローブに関して、プローブは、追加の核酸配列、例えばプロモーター、転写シグナル、および／またはベクター配列を含むことがある。

## 【0102】

タンパク質／ポリペプチド：用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本明細書では同義で用いている。これらの用語は、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸の連続分子鎖を指す。これらの用語は、産物の特定の長さを指さない。したがって、「ペプチド」、「オリゴペプチド」および「タンパク質」は、ポリペプチドの定義に含まれる。これらの用語は、インビボまたはインビトロで作られたポリペプチドの翻訳時および／または翻訳後修飾、例えば、限定ではないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、PEG化および硫酸化を有するポリペプチドを含む。加えて、タンパク質断片、類似体（遺伝コードによってコードされないアミノ酸、例えばホモシステイン、オルニチン、p-アセチルフェニルアラニン、D-アミノ酸およびクレアチンを含む）、天然または人工突然変異体、変異体、融合タンパク質、誘導体化残基（例えば、アミン基のアルキル化、カルボキシル基のアセチル化またはエステル化）、および前述のいずれかのものの組み合わせは、ポリペプチドの意味に含まれる。

## 【0103】

典型的に、タンパク質は機能を有する。しかし、タンパク質は、機能的活性を有さないオリゴペプチドおよびより小さい連続アミノ酸配列も包含する。機能性タンパク質の非限定的な例としては、受容体、受容体リガンド、サイトカイン、抗体、免疫修飾分子、シグナル伝達分子、蛍光タンパク質、殺虫または殺生物活性を有するタンパク質、および酵素が挙げられる。酵素の有用な一般クラスとしては、プロテアーゼ、セルラーゼ、オキシドレダクターゼ、リパーゼ、リアーゼ、リガーゼ、ヘミセルラーゼ、ラッカーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、エステラーゼ、デヒドロゲナーゼ、ラクターゼ、ポリガラクトロナーゼ、ガラクトシダーゼ、リグニナーゼ、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、トランスフェラーゼ、グルコースイソメラーゼ、ニトリラーゼ、ヒドロキシラーゼ、ヒドラーゼ、ポリメラーゼおよびデポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。酵素に加えて、本明細書において開示する合成核酸分子によってコードされ得るタンパク質としては、限定ではないが、転写因子、抗体、受容体、成長因子（例えば、PDGF、EGF、FGF、SCF、HGF、TGF、TNF、インスリン、IGF、LIF、オンコスタチン、CSFなど）、免疫修飾物質、ペプチドホルモン、サイトカイン、インテグリン、インターロイキン、接着分子、血栓調節分子（thrombomodulatory molecule）、プロテアーゼ阻害剤、アンジオスタチン、デフェンシン、分化抗原クラスター、インターフェロン、ケモカイン、抗原（感染性ウイルスおよび生物からのものを含む）、癌遺伝子産物、トロンボポエチン、エリスロポエチン、組織プラスミノゲンアクチベーター、および臨床、診断または獣医学的設定での使用に望ましい任意の他の生物活性タンパク質が挙げられる。これらのタンパク質のすべてが文献で（例えば例示的アミノ酸配列によって）十分に定義されており、本明細書においてもそのように定義される。そのようなタンパク質の欠失突然変異体、そのようなタンパク質の個々のドメイン、そのようなタンパク質から作られる融合タンパク質、およびそのようなタンパク質の混合物も含まれる。

10

20

## 【0104】

保存的置換：ポリペプチドに関して本明細書で用いる場合、用語「保存的置換」は、あるアミノ酸残基で同じクラスの別のアミノ酸が置換される置換を指す。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。保存的置換を行う目的で定義され得るアミノ酸の置換は、当技術分野において公知である。

30

## 【0105】

いくつかの実施形態において、保存的置換は、第1の脂肪族アミノ酸での第2の異なる脂肪族アミノ酸の置換を含む。例えば、第1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、第1のアミノ酸を、Gly、Ala、Pro、Ile、Leu、ValおよびMetから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。特定の例では、第1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、第1のアミノ酸を、Gly、Ala、Pro、Ile、LeuおよびValから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。疎水性脂肪族アミノ酸の置換を含む特定の例では、第1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、第1のアミノ酸を、Ala、Pro、Ile、LeuおよびValから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。

40

## 【0106】

いくつかの実施形態において、保存的置換は、第1の芳香族アミノ酸での第2の異なる芳香族アミノ酸の置換を含む。例えば、第1のアミノ酸が、His、Phe、TrpおよびTyrのうちの一つである場合、第1のアミノ酸を、His、Phe、TrpおよびTyrから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。非荷電芳香族アミノ酸の置換を含む特定の例では、第1のアミノ酸が、Phe、TrpおよびTyrのうちの一つである場合、第1のアミノ酸を、Phe、TrpおよびTyrから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。

50

## 【0107】

いくつかの実施形態において、保存的置換は、第1の疎水性アミノ酸での第2の異なる疎水性アミノ酸の置換を含む。例えば、第1のアミノ酸が、Ala、Val、Ile、Leu、Met、Phe、TyrおよびTrpのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、Ala、Val、Ile、Leu、Met、Phe、TyrおよびTrpから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。非芳香族疎水性アミノ酸の置換を含む特定の例では、第1のアミノ酸が、Ala、Val、Ile、LeuおよびMetのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、Ala、Val、Ile、LeuおよびMetから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。

## 【0108】

他の実施形態において、保存的置換は、第1の極性アミノ酸での第2の異なる極性アミノ酸の置換を含む。例えば、第1のアミノ酸が、Ser、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、Lys、AspおよびGluのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、Ser、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、Lys、AspおよびGluから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。非荷電極性アミノ酸の置換を含む特定の例では、第1のアミノ酸が、Ser、Thr、Asn、Gln、Cys、GlyおよびProのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、Ser、Thr、Asn、Gln、Cys、GlyおよびProから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。荷電極性アミノ酸の置換を含む特定の例では、第1のアミノ酸が、His、Arg、Lys、AspおよびGluのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、His、Arg、Lys、AspおよびGluから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。荷電極性アミノ酸の置換を含むさらなる例では、第1のアミノ酸が、Arg、Lys、AspおよびGluのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、Arg、Lys、AspおよびGluから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。正電荷を有する（塩基性の）極性アミノ酸の置換を含む特定の例では、第1のアミノ酸が、His、ArgおよびLysのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、His、ArgおよびLysから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。正電荷を有する極性アミノ酸の置換を含むさらなる例では、第1のアミノ酸が、ArgまたはLysである場合、第1のアミノ酸を、ArgおよびLysである他のアミノ酸によって置き換えてもよい。負電荷を有する（酸性の）極性アミノ酸の置換を含む特定の例では、第1のアミノ酸が、AspまたはGluである場合、第1のアミノ酸を、AspおよびGluである他のアミノ酸によって置き換えてもよい。

## 【0109】

代替実施形態において、保存的置換は、第1の電氣的に中性のアミノ酸での第2の異なる電氣的に中性のアミノ酸の置換を含む。例えば、第1のアミノ酸が、Gly、Ser、Thr、Cys、Asn、GlnおよびTyrのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、Gly、Ser、Thr、Cys、Asn、GlnおよびTyrから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。

## 【0110】

他のさらなる実施形態において、保存的置換は、第1の非極性アミノ酸での第2の異なる非極性アミノ酸の置換を含む。例えば、第1のアミノ酸が、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、ProおよびMetのうち1つである場合、第1のアミノ酸を、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、ProおよびMetから選択される第2の異なるアミノ酸によって置き換えてもよい。

## 【0111】

多くの例では、第1のアミノ酸を置き換えるための保存的置換で使用される特定の第2のアミノ酸の選択を、第1のアミノ酸と第2のアミノ酸の両方が属する上述のクラスの数 を最大に行うことがある。したがって、第1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2のアミノ酸は、別の極性アミノ

10

20

30

40

50

酸（すなわち、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、Lys、AspもしくはGlu）であってもよいし、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もしくはMet）であってもよいし、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2のアミノ酸は、Thr、Asn、Gln、CysおよびGlyのうち1つであることが好ましいことがある。なぜならこれらのアミノ酸は、極性、非芳香族性および電氣的な中性によるすべての分類を共有するからである。保存的置換に使用される特定の第2のアミノ酸を選択するために場合により用いることができるさらなる基準は、当技術分野において公知である。例えば、Thr、Asn、Gln、CysおよびGlyが、Serの保存的置換に使用するため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選択から外されることがある。同様に、Glyは、アルキル側鎖がないので、選択から外されることがある。この場合、例えば側鎖ヒドロキシル基の官能性を保持するためにThrが選択されることもある。しかし、保存的置換に使用される特定の第2のアミノ酸の選択は、最終的には当業者の自由裁量の範囲内である。

10

#### 【0112】

植物：用語「植物」は、本明細書で用いる場合、任意の子孫、細胞、組織、種子、種子油、またはそれらの部分を含む。

#### 【0113】

形質または表現型：用語「形質」および「表現型」は、本明細書では同義で用いている。本開示では、特に関心の高い形質は、例えば作物植物において発現され得るような（例えば、殺虫性タンパク質の発現）、農耕学的に重要な形質を含む。

20

#### 【0114】

##### IV. 目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチド

本開示は、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを設計する方法であって、例えば、異種宿主細胞または生物において目的のポリペプチドの発現を増加させるように設計する方法を提供する。本明細書におけるいくつかの実施形態では、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドは工学的に作製され、合成ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのポリアデニル化配列（例えば、AATAAA、AATAAT、AACCAA、ATATAA、AATCAA、ATACTA、ATAAAA、ATGAAA、AAGCAT、ATTAAAT、ATACAT、AAAAATA、ATTAAA、AATTAA、AATACAおよびCATAAA）からなる群から選択される少なくとも1つのポリアデニル化配列）を含有する基準遺伝子から誘導される。例えば、合成ポリヌクレオチドは、基準遺伝子からの少なくとも1つのポリアデニル化配列を同じ量で、コード配列の同じ場所に含むことがある。

30

#### 【0115】

本明細書における実施形態は、上述に従って工学的に作製された、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを提供する。そのような合成ポリヌクレオチドは、遺伝子導入植物細胞、遺伝子導入植物組織、またはそのような植物細胞を含む植物において目的のポリペプチドを発現させる際の使用に特によく適しているだろう。

40

#### 【0116】

本明細書における特定の実施形態の方法を用いて、当業者に公知の様々な理由で、例えば、発現を増加させるために、核酸配列を新たな宿主または生物において発現されるように適応させるために、ならびにコードされたポリペプチドに機能性および／または非機能性突然変異を導入するために、合成核酸配列を工学的に作製することができる。典型的に、目的のポリペプチドが天然に存在する遺伝子産物である、または天然に存在する遺伝子産物の一部分（例えば単離されたタンパク質ドメイン）である実施形態では、ポリペプチドをコードする天然に存在する基準ポリヌクレオチドは、例えば、ゲノムデータベースの検索またはソースゲノムからのクローニングによって得ることができる。多くの場合、そ

50

のような天然に存在する基準ポリヌクレオチドの相同体またはオルソログは、他の生物のゲノムにおいても見つけることができる。実施形態では、目的のポリペプチドのすべてまたは一部をコードする合成ポリヌクレオチドを、目的の任意のポリペプチドをコードする基準ポリヌクレオチドから設計または誘導することができる。特定の実施形態において、基準ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのポリアデニル化配列を含む。

#### 【0117】

本明細書における実施形態において、目的のポリペプチドは、自然界に存在する任意のタンパク質もしくはポリペプチドであることもあり、または例えば、限定ではないが、そのようなタンパク質のプロセッシングされた形態を含む、任意の天然に存在する変異体であることもある。目的のポリペプチドは、1つより多くの天然に存在するタンパク質の部分または断片を組み合わせることによって、例えば、機能性タンパク質ドメインの混合およびマッチングによって形成されたタンパク質であることもある。特定の実施形態の合成核酸は、例えば、限定ではないが、殺虫性タンパク質（例えばバチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) からのもの）；除草剤、水および／もしくは熱ストレス耐性遺伝子の発現産物；植物油生産、貯蔵および／もしくは代謝に参与するタンパク質；ならびに／またはマーカー遺伝子の発現産物である、目的のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドは、植物におけるその発現が農耕学的形質である表現型をもたらすものであるか、または農耕学的形質の遺伝子移入または導入に有用なレポータータンパク質である。

#### 【0118】

殺虫性タンパク質、例えば、鱗翅目ドライバー有害生物 (*Lepidoptera driver pest*) に対する活性を有するものは、作物改良の極めて重要なツールである。バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) からの C r y 1 A b タンパク質は、インビトロ食餌ベースアッセイを用いたとき、アワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) (アワノメイガ) およびアメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) (アメリカタバコガ幼虫 (C E W)) に対する活性を明示した。C r y 1 A b は、確立された活性物質であり、このタンパク質の一形態は、昆虫抵抗性 S M A R T S T A X (商標) 製品に現在利用されている。H E R C U L E X (登録商標) も成功した農業ツールである。切断形態の C r y 1 F a タンパク質である、H E R C U L E X (登録商標) の活性成分は、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) (ツマジロクサヨトウ (F A W))、アワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) (アワノメイガ (E C B)) およびアメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) (アメリカタバコガ幼虫 (C E W)) をはじめとする、多くの肝要なトウモロコシ有害生物に対して効果があることが実証されている。

#### 【0119】

昆虫は、切断型 C r y 毒素に結合する、中腸に位置する受容体の変化によって、C r y 毒素の活性に対する抵抗性を発現することができる。Van Rie et al. (1990) *Science* 247(4938):72-4; Heckel et al. (2007) *J. Invert. Pathol.* 95(3): 192-7. 昆虫の C r y 毒素に対する抵抗性の発生を防止するまたは遅らせる1つの方法は、異なる作用様式を有する複数の毒素を植物において発現させることである。Roush (1998) *Philos. Trans. B* 353: 1777-86; Ives et al. (2011) *Ecol. Appl.* 21(2):503-15. 本明細書における実施形態は、植物において昆虫抵抗性形質の活性を延期するための昆虫管理戦略の一部として、C r y 1 A b および／または C r y 1 F a を昆虫抵抗性ポリペプチドとして用いる。そのような方法は、害虫の毒素抵抗性の発生を遅らせるのに特に都合がよい。

#### 【0120】

本明細書におけるいくつかの実施形態では、目的のポリペプチドをコードするネイティブ／野生型遺伝子配列を同定および／または用意し、その後分析して、ポリアデニル化シグナル配列が存在するかどうかを判定する。本明細書における特定の実施形態において、目的のポリペプチドを発現する合成ポリヌクレオチドを工学的に作製する際の1ステップは、ポリヌクレオチドにおける、A T A T A T、T T G T T T、T T T T G T、T G T T T T、T A T A T A、T A T T T T、T T T T T T、A T T T T T、T T A T T T、T T

T A T T、T A A T A A、A T T T A T、T A T A T T、T T T T A T、A T A T T T、T A T T A T、T G T T T G、T T A T A T、T G T A A T、A A A T A A、A T T T T T、T A T T T T T、T T A T T T T、T T T A T T T、T T T T T T T、T T T T A T、A A T T T T、T T T T T A、T A A T T T、T T A A T T、A A A T T T、A A A T A A、A T A T T T、T T T G T T、T T G T T T、A T A T A T、A T T A T T、A T T T T A、T T A A T T および T T T T A A からなる群から選択される望ましくないポリアデニル化シグナル配列の数を（基準遺伝子に対して）低減させることを含む。特定の実施形態では、ショー（Shaw）・ケイメン（Kamen）配列、A T T T A の出現も除去する。

#### 【0121】

特定の実施形態では組み換えDNA技術の公知技法を用いて、異種ポリヌクレオチドの発現の制御を、例えば、限定ではないが、宿主細胞中のポリヌクレオチドのコピー数を操作することによって、それらのポリヌクレオチドが転写される効率を操作することによって、得られた転写物が翻訳される効率を操作することによって、および翻訳後修飾の効率を操作することによって改善することがある。さらなる例として、プロモーター配列を遺伝子操作して、宿主での発現レベルを基準プロモーターと比較して改善することもある。したがって、ポリヌクレオチド発現の制御に有用な技法には、例えば、限定ではないが、1つまたは複数の宿主細胞染色体へのポリヌクレオチドの組み込み、プラスミドへのベクター安定性配列の付加、転写制御シグナル（例えばプロモーター、オペレーターおよびエンハンサー）の置換または修飾、翻訳制御シグナル（例えばリボソーム結合部位およびシャイン・ダルガーノ配列）の置換または修飾、宿主細胞のコドン使用頻度に対応するポリヌクレオチドの修飾；および転写物を不安定化させる配列の欠失が含まれる。

#### 【0122】

合成中に目的のコードされたポリペプチドの翻訳伸長速度に影響を及ぼし得る因子としては、例えば、tRNA濃度に依存する荷電tRNAのレベル（Elf et al. (2003) Science 300: 1718-22）、tRNA荷電率、およびアミノ酸利用率が挙げられる。例えば、宿主生物のコドン使用頻度の偏向に従って低頻度（または非優先）コドンによって誘導される翻訳休止は、異種タンパク質発現速度を低下させることがある。低頻度コドンによって誘導される翻訳休止は、目的のポリヌクレオチド中の、宿主生物において使用頻度が低い、コドンの存在を含み、利用可能なtRNAプールにそのようなコドンが不足していることからタンパク質翻訳にマイナス影響を及ぼすこともある。これらの因子は、コドン-アンチコドン相互作用の強度、先行コドン（P部位コドン）、先行コドンのゆらぎ塩基、および読み取られるコドンのゆらぎ塩基に依存する、リボソームtRNA選択の速度（解読速度）も含む。リボソーム忠実度に影響を及ぼし得る因子としては、リボソームフレームシフトに影響するもの、例えば、ホモポリマーストレッチ、G/Cアイランド、A/Tアイランド、および休止部位付近のホモポリマーストレッチが挙げられる。さらに、一部のポリペプチドは、リボソーム出口チャンネルで妨げられることもあり、これは、ポリペプチドの最初の10～20アミノ酸の配列にある程度依存する。上記のことに鑑みて、宿主生物における最適な翻訳を改善する1つの方法は、合成ポリヌクレオチド中の低頻度宿主コドンが修飾される結果となり得る、コドン最適化の実施を含む。

#### 【0123】

したがって、望ましくないポリアデニル化シグナル配列およびショー・ケイメン配列を除去することに加えて、合成ポリヌクレオチドが発現されることになる植物種に天然に存在する遺伝子において概して利用される頻度と大体同じ頻度でコドンを利用する、本明細書における合成ポリヌクレオチドを工学的に作製することができる。いくつかの実施形態において、合成ポリヌクレオチド工学的作製プロセスは、配列中の低頻度コドンを優先コドンで置き換えることによって、およびコード配列中の特定のポリアデニル化配列を保存することによって、コドン配列を最適化することを含む。

#### 【0124】

表1は、トウモロコシおよびダイズでの使用を意図した合成遺伝子におけるコドン使用頻度の例示的目標百分率を提供するものである。これらの百分率は、例えば、より具体的

なコドン使用頻度データが不在の場合に用いることができ、一般に双子葉植物に関しても、または一般に植物に関しても用いることができる。

【0125】

【表1-1】

表1.合成植物遺伝子の規模を変更した例示的目標コドン組成。

| アミノ酸    | コドン | 目標使用頻度%<br>(トウモロコシ) | 目標使用頻度%<br>(ダイズ) |
|---------|-----|---------------------|------------------|
| ALA (A) | GCA | 18.0                | 33.1             |
|         | GCC | 34.0                | 24.5             |
|         | GCG | 24.0                | 0                |
|         | GCT | 24.0                | 42.3             |
| ARG (R) | AGA | 18.8                | 36.0             |
|         | AGG | 32.5                | 32.2             |
|         | CGA | 0                   | 0                |
|         | CGC | 30.0                | 15.0             |
|         | CGG | 18.8                | 0                |
|         | CGT | 0                   | 16.9             |
| ASN (N) | AAC | 68.0                | 50.0             |
|         | AAT | 32.0                | 50.0             |
| ASP (D) | GAC | 63.0                | 38.1             |
|         | GAT | 37.0                | 61.9             |
| CYS (C) | TGC | 68.0                | 50.0             |
|         | TGT | 32.0                | 50.0             |
| END     | TAA | 0                   | 0                |
|         | TAG | 0                   | 0                |
|         | TGA | 100                 | 100              |
| GLN (Q) | CAA | 38.0                | 55.5             |
|         | CAG | 62.0                | 44.5             |
| GLU (E) | GAA | 29.0                | 50.5             |
|         | GAG | 71.0                | 49.5             |
| GLY (G) | GGA | 19.0                | 31.9             |
|         | GGC | 42.0                | 19.3             |
|         | GGG | 19.0                | 18.4             |
|         | GGT | 20.0                | 30.4             |
| HIS (H) | CAC | 62.0                | 44.8             |
|         | CAT | 38.0                | 55.2             |
| ILE (I) | ATA | 14.0                | 23.4             |
|         | ATC | 58.0                | 29.9             |
|         | ATT | 28.0                | 46.7             |
| LEU (L) | CTA | 0                   | 0                |
|         | CTC | 29.9                | 22.4             |
|         | CTG | 33.3                | 16.3             |
|         | CTT | 19.5                | 31.5             |
|         | TTA | 0                   | 0                |
| LYS (K) | TTG | 17.2                | 29.9             |
|         | AAA | 22.0                | 42.5             |

【0126】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

| アミノ酸    | コドン | 目標使用頻度%<br>(トウモロコシ) | 目標使用頻度%<br>(ダイズ) |
|---------|-----|---------------------|------------------|
|         | AAG | 78.0                | 57.5             |
| MET (M) | ATG | 100                 | 100              |
| PHE (F) | TTC | 71.0                | 49.2             |
|         | TTT | 29.0                | 50.8             |
| PRO (P) | CCA | 26.0                | 39.8             |
|         | CCC | 24.0                | 20.9             |
|         | CCG | 28.0                | 0                |
|         | CCT | 22.0                | 39.3             |
| SER (S) | AGC | 25.3                | 16.0             |
|         | AGT | 0                   | 18.2             |
|         | TCA | 17.6                | 21.9             |
|         | TCC | 25.3                | 18.0             |
|         | TCG | 15.4                | 0                |
|         | TCT | 16.5                | 25.8             |
| THR (T) | ACA | 21.0                | 32.4             |
|         | ACC | 37.0                | 30.2             |
|         | ACG | 22.0                | 0                |
|         | ACT | 20.0                | 37.4             |
| TRP (W) | TGG | 100                 | 100              |
| TYR (Y) | TAC | 73.0                | 48.2             |
|         | TAT | 27.0                | 51.8             |
| VAL (V) | GTA | 0                   | 11.5             |
|         | GTC | 34.8                | 17.8             |
|         | GTG | 42.4                | 32.0             |
|         | GTT | 22.8                | 38.7             |

## 【0127】

いくつかの実施形態において、開示する方法は、コードされたポリペプチドの一次構造が不変であるような、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の最適化を含む。コードされたポリペプチドの構造は、最大限、そのポリペプチドのアミノ酸配列によって左右される。したがって、コードされたポリペプチドの所望の構造がそのポリヌクレオチドコード配列に制約を課し、この制約は、遺伝コードの縮重および標準的なコドン使用頻度によって決まる。本発明の特定の実施形態において、合成ポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが目的のポリペプチドのすべてまたは一部をコードするコドン空間から選択される特異的コドン最適化配列を含むようにインシリコで工学的に作製され、特定のポリアデニル化配列の数および場所は、ネイティブポリヌクレオチドから合成ポリヌクレオチドへと保存される。選択される特異的ポリヌクレオチド配列の組み込みは、ポリペプチドをコードする異種ヌクレオチド配列に関連した特定の問題を回避することができ、例えば発現宿主生物のコドン使用頻度の偏向を参照することによって、コドン最適化されているに過ぎないポリヌクレオチドと比較したとき、1つまたは複数の所望の特性（例えば発現増進）を達成することができる。

## 【0128】

所定のパラメータに従って核酸分子（例えば、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）のコード配列を最適化するために様々な方法を当業者は利用することができる。例えば、当業者は、検査によって、例えば、発現宿主生物のコドン使用頻度の偏向によりよく合うように、コード配列を最適化することができる。より一般的には、コンピュータ利用ソフトウェアプログラムを使用して、コード配列を最適化することができる。そのようなソフトウェアプログラムは、目的のコードされたポリペプチドの発現に影響を及ぼし得る因子、転写物の翻訳開始速度に影響を及ぼし得る因子、およびコードされたポリ

ペプチドまたはその前駆体の翻訳伸長速度に影響を及ぼし得る因子を含む群から選択される因子を最適化する、1つまたは複数のアルゴリズムを含むことができる。したがって、いくつかの実施形態では、所定のパラメータに従ってコード配列を最適化することができる、コンピュータ利用ソフトウェアプログラムに、基準ポリヌクレオチドをインポートすることができる。そのようなソフトウェアプログラムの特定の例としては、限定ではないが、OPTGENE (商標) (Ocimum Biosolutions)、Accelrys GCG (商標) (Accelrys Software, Inc.)、OPTIMIZER (商標) (ワールドワイドウェブのgenomes.urv.es/OPTIMIZERで一般利用のために入手可能) およびOPTIMUMGENE (商標) (GenScript) が挙げられる。

10

#### 【0129】

いくつかの実施形態では、目的のポリペプチドのアミノ酸配列を直接使用して、コドン最適化ポリヌクレオチド配列を得ることができる。特定の実施形態では、目的のポリペプチドのアミノ酸配列 (例えば直接得たもの) を使用して、例えば、所定のパラメータに従ってコード配列を最適化することができるコンピュータ利用ソフトウェアプログラムを使用することにより、アミノ酸配列をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドを推定すること (例えば、インシリコ逆翻訳) ができる。具体的な例では、標準遺伝コードと、発現宿主生物についての適切なコドン使用頻度の偏向の表とを使用して、コドン最適化ポリヌクレオチドを推定することができる。いくつかの実施形態では、目的の各ポリペプチドをコードする複数のコドン最適化ポリヌクレオチドを推定することが望ましいこともある。したがって、特定の例では、目的のポリペプチドを使用して、その目的のポリペプチドをコードする1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上のコドン最適化核酸配列を推定することができる。いくつかの実施形態では、目的のポリペプチドをコードする推定コドン最適化ポリヌクレオチドをコンピュータ利用ソフトウェアプログラムによってテキストファイルにエクスポートすることができ、または実施者のために別様に記録することができる。例えば、コンピュータ利用ソフトウェアプログラムを、目的の単一のポリペプチドをコードする推定コドン最適化ポリヌクレオチドの全セットについての対応する数のテキストファイルにエクスポートすることができる。

20

#### 【0130】

他の実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化ポリヌクレオチドを、配列相同性によってアラインすることができる。特定の例では、目的のポリペプチドのポリアデニル化配列のすべてに対応する1つまたは複数の推定コドン最適化ポリヌクレオチドを、目的のポリペプチドをコードするネイティブポリヌクレオチドとアラインする。特定の例では、推定コドン最適化核酸配列は、タンパク質コード領域のセグメントに対応し、「ギャップ」を許さずにアラインメントを実行することができる。

30

#### 【0131】

上述にしたがって、本明細書における方法を用いて、目的のポリペプチドをコードする単一のコドン最適化ポリヌクレオチドを提供することができる。特定の例では、ある方法を用いて、各々が目的のポリペプチドである1セットのコドン最適化ポリヌクレオチドを提供することができる。

40

#### 【0132】

いくつかの実施形態では、AATAAA、AATAAT、AACCAA、ATATAA、ATCAAA、TACTAA、TAAAAA、ATGAAA、AAGCAT、ATTAAAT、ATACAT、AAAAATA、ATTAAAA、AATTAA、AATACAおよびCATAAAからなる群から選択されるポリアデニル化配列を、目的の全ポリペプチドをコードする最適化ポリヌクレオチドに、目的のポリペプチドの適正なリーディングフレームを維持しながら、選択されるポリアデニル化配列が、目的のポリペプチドをコードするネイティブ核酸配列中の特定のポリアデニル化配列のネイティブ位置に組み込まれるように、組み込むことができる。例えば、AATAAA、AATAAT、AACCAA、AT

50

A T A A、A A T C A A、A T A C T A、A T A A A A、A T G A A A、A A G C A T、A T T A A T、A T A C A T、A A A A T A、A T T A A A、A A T T A A、A A T A C A および C A T A A A からなる群から選択される 1 セットのネイティブポリアデニル化配列のすべてのメンバーを、目的の全ポリペプチドをコードする最適化ポリヌクレオチドに、セットのすべてのメンバーが、全ポリヌクレオチド中の特定のポリアデニル化配列のそれらのネイティブ位置に組み込まれるように、組み込むことができる。したがって、本明細書におけるいくつかの実施形態を使用して、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを生産することができ、この場合、ネイティブポリヌクレオチドのいずれのポリアデニル化配列も、アラインされた合成、最適化ポリヌクレオチドの同じ位置に存在する。

10

#### 【0133】

核酸の最適化は、例えば、異種タンパク質を生産する宿主の能力を改善するステップはもちろん、研究者が発現構築物を効率的に設計するのを支援するステップも含むことがある。核酸の最適化中に考慮され得る因子としては、限定ではないが、目的のコードされたポリペプチドの発現に影響を及ぼし得る因子、転写物の翻訳開始速度に影響を及ぼし得る因子、およびコードされたポリペプチドまたはその前駆体の翻訳伸長速度に影響を及ぼし得る因子を挙げることができる。1 セットのコドン最適化配列の設計中に考慮されるこれらの因子の選択は、当業者の自由裁量の範囲内である。

#### 【0134】

ポリヌクレオチドによってコードされる目的のポリペプチドの発現に影響を及ぼし得る因子は、ポリペプチドのアミノ酸をコードするために選択される特定のコドンによる影響を受けることもある。テンプレート核酸配列からの mRNA の生産速度に影響を及ぼす因子としては、転写に使用される RNA ポリメラーゼのタイプ、発現系に存在する RNA ポリメラーゼのレベル、および使用される転写プロモーター配列を挙げることができる。mRNA レベルもまた mRNA 分解速度による影響を受けることがあり、そしてまたその分解速度も mRNA 不安定化モチーフ、RNA se 認識配列およびポリ A 付加シグナルによる影響を受けることがある。mRNA レベルもまた、翻訳開始部位で、リボソーム結合部位で、開始コドンで、および／またはコード配列の最初の 10～50 コドン付近で（またはオープンリーディングフレーム内、または後の他の箇所）mRNA；オープンリーディングフレーム前または内に存在する転写終結モチーフ；ならびに転写された配列内のシグナル、例えば、mRNA スプライシングおよび／または核輸送を指示、改変または修飾するものによる影響を受けることがある。テンプレート配列からの mRNA 生産速度に影響を及ぼす因子の特定の例は、ヌクレオチドリピートにより誘導されるポリメラーゼのスリッページである。ヌクレオチドリピートにより誘導されるポリメラーゼのスリッページは、フレームシフト突然変異を生じさせる結果となり得る DNA ポリメラーゼのスリッページまたはスタッタリング (stuttering) の原因となることが証明されている、ヌクレオチド配列反復を含む。そのようなヌクレオチドリピートは、RNA ポリメラーゼのスリッページの原因にもなり得る。例えば、高 G + C 含有量の偏向を有する生物には、高い G または C ヌクレオチド反復度がある場合がある。したがって、RNA ポリメラーゼスリッページを誘導する可能性を低減させる 1 つの方法として、G または C ヌクレオチドの伸長リピートの改変が挙げられる。

20

30

40

#### 【0135】

選択的翻訳開始 (alternate translational initiation) および干渉 mRNA 二次構造は、特定の転写物の翻訳開始速度に影響を及ぼすことがある。選択的翻訳開始は、リボソーム結合部位 (RBS) として機能することができる 1 つまたは複数のモチーフを意図せず含有する合成ポリヌクレオチド配列で起こることがある。これらの部位は、遺伝子内部からの切断型タンパク質の翻訳開始をもたらすことがある。精製中に除去することが困難であり得る切断型タンパク質を生じさせる可能性を低減させる 1 つの方法として、最適化ポリヌクレオチドからの推定内部 RBS 配列の修飾が挙げられる。干渉二次構造は、RBS 配列または開始コドンを離隔することがあり、タンパク質発現の低減との相関関係が

50

証明されている。ステムループ構造も転写減衰および衰弱に関与し得る。それ故、最適化ポリヌクレオチドは、転写および翻訳改善を可能にするためにRBSおよび遺伝子コード領域にできるだけ二次構造を含有しないだろう。

#### 【0136】

異種タンパク質発現に影響を及ぼし得るポリヌクレオチド配列エレメントのもう1つのクラスは、制限部位を含むことがある。それ故、本明細書におけるポリヌクレオチドの最適化は、例えば、宿主発現ベクターへの転写単位のその後のサブクローニングに干渉し得る制限部位の修飾を含むことがある。

#### 【0137】

ポリヌクレオチド配列のすべてが最適化されることもあり、または一部分が最適化されることもある。いくつかの例において、所望の発現修飾は、ネイティブ遺伝子の特定のポリアデニル化配列を保存しつつ本質的に全遺伝子を最適化することによって達成されることがある。他の例では、所望の修飾は、遺伝子のすべてでなく一部を最適化することによって達成されることもある。そのような最適化の出発点は、発現宿主のコドン使用頻度の偏向に従って、高頻度利用コドンもしくは優先コドンのみからなるコード配列であることもあり、または高頻度コドンと非高頻度コドンの混合物を含有するコード配列であることもある。ポリヌクレオチドの最適化は、遺伝子発現もしくはタンパク質生産にマイナスに作用することもあり、またはプラスに作用することもある。例えば、より高頻度のコドンで低頻度または非優先コドンを置き換えることは、置き換えられたコドンを含む配列から転写されたmRNA分子の半減期に影響を及ぼすことがあり、またはその構造を、その翻訳に干渉するに二次構造を導入することによって改変することもある。したがって、特定の事例では、最適化されたポリヌクレオチドをさらに改変することが必要なこともある。

#### 【0138】

いくつかの実施形態の中で、ネイティブ遺伝子の特定のポリアデニル化配列を保存しつつ目的のポリペプチドをコードするコドン最適化配列を含む合成ポリヌクレオチドは、1つより多くの最適化配列を含むことがある。例えば、そのようなポリヌクレオチドは、本明細書に記載の複数のポリペプチドを含む融合ポリペプチドをコードすることもあり、または本明細書に記載の少なくとも1つのポリペプチドと無関係の配列とを含む融合ポリペプチドをコードすることもある。融合ポリペプチドは、両方の成分ポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を保持する単一の融合ポリペプチドへの翻訳を可能にするような標準的技術（化学的コンジュゲーションを含む）を用いて調製することができる。ペプチドリinker配列を用いて、融合ポリペプチドのポリペプチド成分を、各ポリペプチドが適切な二次構造および三次構造に確実に折り重なるために十分な距離だけ離すことができる。当技術分野における標準的技術を用いて、そのようなペプチドリinker配列を融合ポリペプチドに組み込むことができる。

#### 【0139】

多くの実施形態において、目的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の非コード領域も最適化されることがある。例えば、合成ポリヌクレオチドの上流、下流または中（例えばイントロン）のいずれかに特定の非コード配列を含むことが望ましいことがある。したがって、いくつかの実施形態では、合成ポリヌクレオチドを含む核酸分子に含まれている任意の非コード配列の配列が本明細書における方法では考慮され得る。

#### 【0140】

目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを含む核酸を、様々な用途での使用のために、例えば、組み換えポリペプチドを生産するために、新たな発現系を発生させるために、発現特性を他の核酸配列のものと比較するために、および診断用途のために発現させることができる。

#### 【0141】

##### V. 分岐、コドン最適化核酸配列の発現

本明細書におけるいくつかの実施形態は、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドを植物細胞に導入して目的のポリペプチドを細胞において発現させることを含むプロセスによって、植物、植物組織、植物材料および／または植物全体において望ましい表現型または形質を得る方法を提供する。特定の実施形態において、目的のポリペプチドは、細胞では通常は見られない異種ポリペプチドである。

#### 【0142】

目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを含む核酸構築物（例えばベクター）を特定の実施形態では発現宿主の形質転換に用いることができ、この場合、構築物を発現宿主のゲノムに組み込むことができる。構築物は、転写および翻訳開始および終結領域を少なくとも含むことができ、合成ポリヌクレオチドは、その開始領域と終結領域の間に、それらの領域の調節制御下に位置することができる。構築物は、選択マーカーおよび／または他の機能性配列、例えば、限定ではないが、宿主ゲノムへの組み込みのための相同配列、PCRプライマーにハイブリダイズするための配列、および制限部位をさらに含むこともある。

10

#### 【0143】

いくつかの実施形態において、発現宿主は、例えば植物組織培養または植物全体の植物細胞などの、植物細胞であり得る。本発明の実施形態は、植物細胞を見つけられる任意の組織またはあらゆる場所（胚、分裂組織細胞、カルス、花粉、葉、葯、根、根端、花、種子、さや、茎、および組織培養を含むがこれらに限定されない）からの植物細胞を含むことができる。合成ポリヌクレオチドを適切なベクターに組み込むことができ、当業者に公知の任意の方法で植物細胞に導入することができる。例えば、ウイルスベクターでの形質転換、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取り込み、および微粒子銃（Klein et al. (1987) Nature 327:70）を限定ではないが含む方法によって、核酸分子を植物細胞に導入することができる。

20

#### 【0144】

他の実施形態では、合成ポリヌクレオチドを含むベクターを植物細胞の特定の部分に（例えば、ナノ粒子照射によって）導入することがある。核酸分子を導入することができる植物細胞の特定の部分の例としては、サイトゾル、核、液胞膜、色素体、エチオプラスト、有色体、ロイコプラスト、脂肪体、プロテインプラスト、アミロプラスト、葉緑体、および二重膜の内腔を挙げることができるが、これらに限定されない。

30

#### 【0145】

細胞形質転換（植物細胞形質転換を含む）は、特定の細胞において機能することになる発現ベクターの構築を含むことがある。そのようなベクターは、調節エレメント（例えばプロモーター）の制御下にある遺伝子、または調節エレメント（例えばプロモーター）に作動的に連結された遺伝子を含む、DNAを含むことがある。発現ベクターは、そのような作動可能に連結された遺伝子／調節エレメントの組み合わせを1つまたは複数含有することもある。ベクターはプラスミドの形態であることがあり、単独で使用して、または他のプラスミドと併用して、導入遺伝子を植物細胞の遺伝子材料に導入するための本明細書に記載の形質転換方法を用いて形質転換細胞をもたらすことができる。

40

#### 【0146】

植物細胞発現ベクターは、調節エレメント（例えばプロモーター）に作動可能に連結された少なくとも1つの遺伝子マーカーを含むことがあり、調節エレメントによって、マーカーを含有する形質転換細胞の負の選択（すなわち、選択可能マーカー遺伝子を含有しない細胞の成長を阻害すること）または正の選択（すなわち、遺伝子マーカーによりコードされた産物についてスクリーニングすること）いずれかによる選択が可能になる。植物形質転換に好適な多くの選択可能マーカー遺伝子が形質転換技術分野では周知であり、例えば、抗生物質もしくは除草剤であり得る選択的化学物質を代謝的に解毒する酵素をコード

50

する遺伝子、または阻害剤に対して非感受性であり得る改変された標的をコードする遺伝子を含む。2、3の正の選択方法も当技術分野において公知である。いくつかの実施形態において、植物形質転換に好適な選択可能マーカー遺伝子としては、カナマイシンに対する抵抗性を付与する、植物調節シグナルの制御下にあるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ I I (n p t I I) 遺伝子 (例えば、Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:4803参照) ; 抗生物質、ハイグロマイシンに対する抵抗性を付与する、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (例えば、Vanden Elzen et al. (1985) Plant Mol. Biol., 5:299参照) ; ゲンタマイシンアセチルトランスフェラーゼ、ストレプトマイシンホスホトランスフェラーゼ、アミノグリコシド-3'-アデニルトランスフェラーゼおよびブレオマイシン抵抗性決定因子を含む、抗生物質に対する抵抗性を付与する細菌由来のマーカー遺伝子 (Hayford et al. (1988) Plant Physiol. 86:1216; Jones et al. (1987) Mol. Gen. Genet. 210:86; Svab et al. (1990) Plant Mol. Biol. 14:197; およびHille et al. (1986) Plant Mol. Biol. 7:171参照) ; グリホサート、グルホシネートまたはプロモキシニルなどの除草剤に対する抵抗性を付与するマーカー遺伝子 (Comai et al. (1985) Nature 317:741-744; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603-618; およびStalker et al. (1988) Science 242:419-423参照) ; ならびに例えばマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ、植物5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼおよび植物アセト乳酸シンターゼを含む、細菌由来でないマーカー遺伝子 (Eichholtz et al. (1987) Somatic Cell Mol. Genet. 13:67; Shah et al. (1986) Science 233:478; およびCharest et al. (1990) Plant Cell Rep. 8:643参照) を挙げることができる。

#### 【0147】

植物形質転換に好適なマーカー遺伝子のもう1つのクラスは、抗生物質などの毒性物質に対する抵抗性についての形質転換細胞の直接遺伝子選択ではなく、推定形質転換植物細胞のスクリーニングを必要とする。これらの遺伝子は、特定の組織での遺伝子の空間的発現パターンを定量または可視化するのに特に有用であり得、これらの遺伝子は、遺伝子発現の研究のための遺伝子または遺伝子調節配列に融合することができるので、レポーター遺伝子と呼ばれることが多い。形質転換細胞のスクリーニングに一般に使用される遺伝子としては、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼおよびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼが挙げられる。Jefferson (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387; Teeri et al. (1989) EMBO J. 8:343; Koncz et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:131; およびDeBlock et al. (1984) EMBO J. 3:1681を参照されたい。植物組織の検出を必要としないインビボGUS活性を可視化する方法が利用可能である。Molecular Probes publication 2908 (1993) IMAGENE GREEN™, pp. 1-4; およびNaleway et al. (1991) J. Cell Biol. 115:151。蛍光タンパク質 (例えばGFP、EGFP、EBFP、ECFPおよびYFP) をコードする遺伝子も、原核および真核細胞における遺伝子発現にマーカーとして利用されている。Chalfie et al. (1994) Science 263:802を参照されたい。このように、蛍光タンパク質、および蛍光タンパク質の突然変異をスクリーニング可能マーカーとして使用することができる。

#### 【0148】

植物発現ベクターに含まれている合成ポリヌクレオチドの発現は、調節エレメント、例えばプロモーター、を含むヌクレオチド配列によって駆動されることがある。植物細胞において有用なプロモーターのいくつかのタイプが今では形質転換細胞技術分野において周知であり、単独で使用またはそのようなプロモーターと併用することができる他の調節エレメントも周知である。

#### 【0149】

用語「プロモーター」は、転写開始から上流であり得るDNA領域であって、RNAポリメラーゼおよび転写を開始させる他のタンパク質の認識および結合に関与し得るDNAの領域を指す。「植物プロモーター」は、植物細胞において転写を開始させることができるプロモーターであり得る。発生制御下のプロモーターの例としては、特定の組織、例え

ば葉、根、種子、繊維、木部導管、仮導管または厚壁組織、において転写を優先的に開始させるプロモーターが挙げられる。そのようなプロモーターを「組織優先的」と言う。特定の組織においてのみ転写を開始させるプロモーターを「組織特異的」と言う。「細胞タイプ特異的」プロモーターは、1つまたは複数の器官の特定の細胞タイプ、例えば、根または葉の維管束細胞での発現を主として駆動する。「誘導性」プロモーターは、環境制御下にあり得るプロモーターであることができる。誘導性プロモーターによって転写に影響を及ぼすことがある環境条件の例としては、限定ではないが、嫌気性条件および光の存在が挙げられる。組織特異的、組織優先的、細胞タイプ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、殆どの環境条件下で活性であり得るプロモーターである。

10

#### 【0150】

誘導性プロモーターは、細胞での発現のために本発明の最適化ヌクレオチド配列に作動可能に連結されることがある。場合により、誘導性プロモーターは、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ることがあり、ヌクレオチド配列が、細胞での発現のために本発明のヌクレオチド配列に作動可能に連結されることがある。誘導性プロモーターに作動可能に連結されたヌクレオチド配列の転写速度は、誘導剤に応じて増加し得る。いずれの誘導性プロモーターを本発明において使用してもよい。Ward et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366を参照されたい。例示的誘導性プロモーターとしては、銅に応答するACEI系からのもの(Mett et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:4567-71) ; ベンゼンスルホンアミド除草剤解毒剤に応答するトウモロコシからのIn2遺伝子(Hershey et al. (1991) Mol. Gen. Genetics 227:229-37; およびGatz et al. (1994) Mol. Gen. Genetics 243:32-8) ; およびTn10からのTetリプレッサー(Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genetics 227:229-37) が挙げられるが、これらに限定されない。特に有用な誘導性プロモーターは、植物が通常は応答しない誘導剤に応答するプロモーターであり得る。例示的誘導性プロモーターは、転写活性が糖質コルチコステロイドホルモンによって誘導され得るステロイドホルモン遺伝子からの誘導性プロモーターであり得る。Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:10421-5。

20

#### 【0151】

あるいは、構成的プロモーターが、細胞での発現のために合成ポリヌクレオチドに作動可能に連結されることもあり、または構成的プロモーターが、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、該ヌクレオチド配列が、細胞での発現のために合成ポリヌクレオチドに作動可能に連結されることもある。様々な構成的プロモーターを本発明において用いることができる。例示的構成的プロモーターとしては、植物ウイルスからのプロモーター、例えばC a M Vからの35Sプロモーター(Odell et al. (1985) Nature 313:810-2) ; イネアクチン遺伝子からのプロモーター(McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163-71) ; ユビキチンからのプロモーター(Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-32; およびChristensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-89) ; p E M Uからのプロモーター(Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-8) ; M A Sからのプロモーター(Velten et al. (1984) EMBO J. 3:2723-30) ; およびトウモロコシH3ヒストンからのプロモーター(Lepetit et al. (1992) Mol. Gen. Genetics 231:276-85; およびAtanassova et al. (1992) Plant Journal 2(3):291 -300) が挙げられるが、これらに限定されない。A L Sプロモーター、すなわち、セイヨウアブラナ(Brassica napus) A L S 3構造遺伝子の5'側のX b a 1 / N c o I断片(または前記X b a 1 / N c o I断片とのヌクレオチド配列類似性)は、特に有用な構成的プロモーターである。P C T国際特許出願公開番号W O 9 6 / 3 0 5 3 0を参照されたい。

30

40

#### 【0152】

あるいは、組織特異的プロモーターが、細胞での発現のために合成ポリヌクレオチドに作動可能に連結されることもある。場合により、組織特異的プロモーターが、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、該ヌクレオチド配列が、細胞での発現のために合成ポリヌクレオチドに作動可能に連結されることもある。組織特異的プ

50

ロモーターに作動可能に連結された合成ポリヌクレオチドで形質転換された植物は、特異的組織において排他的にまたは優先的に合成ポリヌクレオチドのタンパク質産物を生産することができる。任意の組織特異的または組織優先的プロモーターを特定の実施形態において用いることができる。例示的組織特異的または組織優先的プロモーターとしては、根優先的プロモーター、例えば、ファセオリン遺伝子からのもの (Murai et al. (1983) Science 23 :476-82 ; および Sengupta-Gopalan et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 82:3320-4) ; 葉特異的および光誘導プロモーター、例えば、c a b または r u b i s c o からのもの (Simpson et al. (1985) EMBO J. 4(11):2723-9 ; および Timko et al. (1985) Nature 318:579-82) ; 葯特異的プロモーター、例えば、L A T 5 2 からのもの (Twell et al. (1989) Mol. Gen. Genetics 217:240-5) ; 花粉特異的プロモーター、例えば、Z m 1 3 からのもの (Guerrero et al. (1993) Mol. Gen. Genetics 244: 161 -168) ; および小孢子優先的プロモーター、例えば a p g からのもの (Twell et al. (1993) Sex. Plant Reprod. 6:217-224) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0153】

合成ポリヌクレオチドから発現されたポリペプチドの細胞内区画、例えば葉緑体、空胞、ペルオキシソーム、グリオキシソーム、細胞壁もしくはミトコンドリアへの輸送、またはアポプラストへの分泌のための輸送は、ポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドの 5' および / または 3' 領域にシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を作動可能に連結させることによって果たすことができる。構造遺伝子の 5' および / または 3' 末端に配列を標的化することで、コードされたタンパク質が最終的にどこに区画化されるかを、タンパク質合成およびプロセッシング中に決めることができる。あるいは、細胞内区画を標的にするタンパク質をナノ粒子に直接連結させて、目的の分子でコーティングされたナノ粒子を所望の細胞内区画に指向させることができる。多くのシグナル配列が当技術分野において公知である。例えば、Becker et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20:49 ; Close, P. S. (1993) Master's Thesis, Iowa State University ; Knox et al. (1987) Plant Mol. Biol. 9:3-17 ; Lerner et al. (1989) Plant Physiol. 91:124-129 ; Fontes et al. (1991) Plant Cell 3 :483-496 ; Matsuoka et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 88:834 ; Gould et al. (1989) J. Cell. Biol. 108 :1657 ; Creissen et al. (1991) Plant J. 2:129 ; Kalderon et al. (1984) Cell 39:499-509 ; および Steifel et al. (1990) Plant Cell 2:785-793 を参照されたい。

#### 【0154】

発現宿主が多細胞生物 (例えば植物) である実施形態では、ベクターまたは DNA 構築物を多細胞生物の 1 つまたは複数の細胞に導入し、そこで発現させることがある。いくつかの例では、導入されたベクターまたは DNA 構築物を含む多細胞生物の 1 つまたは複数の細胞から生物全体が生産されることもある。例えば、目的の核酸分子で形質転換された植物細胞から植物全体を再生し、そしてその後、核酸分子がゲノムに組み込まれている植物を選択する方法は、当技術分野において公知である。

#### 【0155】

いくつかの実施形態において、本明細書における実施形態で使用するための発現宿主が、多細胞生物であることに加えて、単細胞原核または真核生物であってもよいことは、理解されるであろう。様々な発現系を本発明の最適化核酸配列からのポリペプチドの発現に使用することができる。発現宿主は、例えば、細菌、藻類、真菌 (例えば酵母)、昆虫細胞、動物細胞、バキュロウイルス、および哺乳動物組織培養物を含む群から選択することができる。

#### 【0156】

特定の実施形態において、発現系は、例えば、限定ではないが、細菌発現系、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ属種 (*Salmonella* spp.)、バチルス属種 (*Bacillus* spp.)、ストレプトマイセス属種 (*Streptomyces* spp.)、シュードモナス属種 (*Pseudomonas* spp.) (例えばシュードモナス・フルオレッセンス (*P. fluorescens*))、ラストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*)、クラミドモナス属種 (*Chlamydomonas*

spp.) ; サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*) およびカンジダ属種 (*Candida species*)、出芽酵母 (*S. cerevisiae*)、*P. pastoris* (*P. pastoris*)、メチロトーフ酵母 (*P. methanolica*) ならびに *K. lactis* (*K. lactis*) を含む、酵母発現系；クリプトスポリジウム属 (*Cryptosporidium spp.*) およびトリコデルマ属種 (*Trichoderma spp.*) を含む、真菌発現系；糸状菌タンパク質生産系；熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) およびリーシュマニア (*Leishmania*) を含む、原生動物発現系；エレガンス線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) およびアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を含む、モデル生物；植物細胞（例えば、ダイズ、インゲンマメ、トウモロコシ、ワタ、タバコおよびシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) を含む）；C O S 細胞、チャイニー  
10  
ズハムスター卵巣細胞、および線維芽細胞、例えば 3 T 3 細胞を含む、組織培養発現系；アデノウイルスに感染した細胞株；昆虫細胞株、例えば、バキュロウイルスを成長させるためのスポドプテラ属種 (*Spodoptera spp.*) に由来するもの；疾患の研究および D N A ワクチンの有効性試験のためのモデル生物、例えば、マカク、マウス、ラット、モルモット、ヒツジ、ヤギおよびウサギ；生細胞の抽出物、例えば大腸菌 (*E. coli*) 抽出物、小麦胚芽抽出物、ウサギ網状赤血球ライセート抽出液から調製されたインビトロ発現系；ならびに精製された個々の成分の会合によって調製されたインビトロ発現系であってもよい。

#### 【0157】

例えば、限定ではないが、植物を含む、遺伝子修飾生物での遺伝子発現方法は、当技術分野において公知である。いくつかの実施形態は、目的の異種ポリペプチドをコードする  
20  
1 つまたは複数の異種ポリヌクレオチドを含む組み換えベクター（例えばプラスミド）を含む。組み換えベクターは、選ばれた核酸の操作および／またはそのような核酸の宿主細胞への導入のためのツールとして使用される、工学的に作製された（例えば人工的に生産された）核酸分子である。したがって、組み換えベクターは、含有するポリヌクレオチドを、例えば、該ポリヌクレオチドを発現させることおよび／または該ポリヌクレオチドを宿主細胞に送達して組み換え細胞を形成することにより、クローニング、シークエンシングおよび／または別様に操作する際の使用に好適であり得る。ベクターは、天然にはクローニングまたは送達されるポリヌクレオチドに隣接して見つからないヌクレオチド配列を含有することがある。ベクターは、ポリヌクレオチドに隣接して天然に見つけられる、またはポリヌクレオチドの発現に有用である、調節核酸配列（例えば、プロモーター、非翻訳領域）を含有することもある。組み込まれたポリヌクレオチドは、染色体プロモーター  
30  
制御下にあることもあり、ネイティブもしくはプラスミドプロモーター制御下にあることもあり、またはいくつかのプロモーター制御の組み合わせの下にあることもある。ベクターは、R N A もしくは D N A いずれであってもよく、原核性または真核性のいずれであってもよい。ベクターを染色体外エレメント（例えばプラスミド）として維持することができ、または組み換え生物（例えば微生物、酵母および植物細胞）の染色体に組み込むことができる。ベクター全体を宿主細胞内の適所に維持することができ、または特定の条件下で、目的の異種ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種ポリヌクレオチドを残して外来性 D N A （例えば不必要なプラスミド配列）を検出することができる。異種ポリヌクレオチドの単一または複数のコピーを宿主ゲノムに組み込むことができる。本発明の組  
40  
み換えベクターは、少なくとも 1 つの選択可能マーカーを含有することができる。

#### 【0158】

いくつかの実施形態において、目的の異種ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターは、発現ベクター、例えば植物発現ベクターである。そのような実施形態において、生産される産物をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドは、組み換え宿主細胞内の核酸配列の転写および翻訳を可能にするベクター中の調節配列にポリヌクレオチドを作動可能に連結させるように組み換えベクターに挿入することができる。様々な生物および細胞の形質転換に有用なベクターが当技術分野において公知である。通常、ベクターは、選択可能マーカーと、所望の宿主における自律複製または染色体組み込みを可能にする配列とを含有する。

10

20

30

40

50

## 【0159】

宿主細胞の好適な形質転換方法としては、DNAを細胞に導入することができる任意の方法、例えば、プロトプラストの形質転換による方法（例えば米国特許第5,508,184号参照）、乾燥／阻害媒介DNA取り込みによる方法（例えば、Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8）、エレクトロポレーションによる方法（例えば米国特許第5,384,253号参照）、炭化ケイ素線維での攪拌による方法（例えば米国特許第5,302,523号および同第5,464,765号参照）、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）媒介形質転換による方法（例えば米国特許第5,563,055号、同第5,591,616号、同第5,693,512号、同第5,824,877号、同第5,981,840号および同第6,384,301号参照）、およびDNA被覆粒子の加速による方法（例えば米国特許第5,015,580号、同第5,550,318号、同第5,538,880号、同第6,160,208号、同第6,399,861号および同第6,403,865号参照）が挙げられる。これらの方法などの技術の適用により、単子葉植物と双子葉植物の両方を含む事実上あらゆる種の細胞を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、形質転換するDNAが宿主細胞のゲノムに組み込まれる。多細胞種の場合、遺伝子導入細胞は、遺伝子導入生物に再生され得る。これらの技術のいずれかを用いて、例えば、目的の異種ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種ポリヌクレオチドを遺伝子導入のゲノム内に含む遺伝子導入単子葉または双子葉植物を生産することができる。

## 【0160】

植物に発現ベクターを導入するために最も広く用いられている方法は、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）の天然形質転換系に基づく。A. ツメファシエンス（*A. tumefaciens*）およびA. リゾゲネス（*A. rhizogenes*）は、植物細胞を遺伝子的に形質転換する植物病原性土壌細菌である。A. ツメファシエンス（*A. tumefaciens*）およびA. リゾゲネス（*A. rhizogenes*）のTiおよびRiプラスミドは、植物の遺伝子形質転換に責任を負う遺伝子をそれぞれ有する。Ti（腫瘍誘発）プラスミドは、形質転換植物に移入される、T-DNAとして公知の、大きいセグメントを含有する。Tiプラスミドのもう1つのセグメントであるvir領域は、T-DNA移入に責任を負う。T-DNA領域は、末端リピートに隣接している。修飾バイナリーベクターでは、腫瘍誘発遺伝子が欠失しており、vir領域を用いて外来遺伝子をT-DNA境界配列に隣接して移入する。T領域は、遺伝子導入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dsRNAコード核酸などの移入用の配列を挿入するための複数のクローニング部位も含有することがある。

## 【0161】

したがって、特定の実施形態において、植物形質転換ベクターは、A. ツメファシエンス（*A. tumefaciens*）のTiプラスミド（例えば米国特許第4,536,475号、同第4,693,977号、同第4,886,937号および同第5,501,967号、ならびに欧州特許EP0122791参照）またはA. リゾゲネス（*A. rhizogenes*）のRiプラスミドに由来する。さらなる植物形質転換ベクターとしては、例えば、限定ではないが、Herrera-Estrella et al (1983) Nature 303:209-13、Bevan et al (1983) Nature 304:184-7およびKlee et al (1985) Bio/Technol. 3:637-42によって記載されたもの、欧州特許EP0120516に記載されているもの、ならびに前述のいずれかのものから誘導されるものが挙げられる。植物と天然に相互作用する他の細菌、例えばシノリゾビウム（*Sinorhizobium*）、根粒菌（*Rhizobium*）およびメソリゾビウム（*Mesorhizobium*）を、いくつかの多様な植物への遺伝子移入を媒介するように修飾することができる。これらの植物関連共生細菌は、武装解除したTiプラスミドと好適なバイナリーベクターの両方の獲得によって遺伝子移入に適任なものになることができる。

## 【0162】

外来性DNAを受容細胞に供給した後、一般に、形質転換細胞をさらなる培養および植物再生のために同定する。形質転換細胞の同定能力を向上させるために、形質転換体を生

成するために使用される形質転換ベクターとともに、前に述べたような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が望ましいこともある。選択可能マーカーを使用する場合、形質転換された可能性のある細胞集団の中の形質転換細胞を、選択剤に曝露することによって同定する。スクリーニング可能マーカーを使用する場合、所望のマーカー遺伝子の形質について細胞をスクリーニングすることができる。

#### 【0163】

選択剤への曝露を乗り切る細胞、またはスクリーニングアッセイにおいて陽性スコアを得た細胞は、植物の再生を支援する培地で培養することができる。いくつかの実施形態では、任意の好適な植物組織培養培地（例えばMSおよびN6培地）を、成長調節物質などのさらなる物質を含めることによって修飾することができる。成長調節物質を含有する基礎培地で、植物再生努力を始めるために十分な組織を利用できるようになるまで、または手作業での選択の反復ラウンド後、組織の形態が再生に好適になるまで（例えば少なくとも2週間）、組織を培養し、その後、芽形成を助長する培地に移してもよい。十分な芽形成が起きてしまうまで、培養物を定期的に移す。芽が形成されたら、根の形成を助長する培地に移す。十分な根が形成されたら、さらなる成長および成熟のために植物を土壌に移すことができる。

#### 【0164】

再生する植物中の目的の核酸分子（例えば、目的の異種ポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド）の存在を確認するために、様々なアッセイを行ってもよい。そのようなアッセイとしては、例えば、分子生物学的アッセイ、例えば、サザンおよびノーザンブロッティング、PCRならびに核酸シーケンシング；生化学的アッセイ、例えば、タンパク質生成物の存在の、例えば免疫学的手段（ELISAおよび／もしくはウエスタンブロット）によるまたは酵素的機能による、検出；植物部位アッセイ、例えば、葉または根のアッセイ；ならびに再生植物全体の表現型の分析が挙げられる。

#### 【0165】

例えば、PCR増幅、例えば目的の核酸分子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用するPCR増幅によって、組み込み事象を分析してよい。PCR遺伝子型判定は、ゲノムに組み込まれた目的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カルス組織に由来するゲノムDNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、続いて、PCR増幅産物の標準的クローニングおよび配列分析を、これらに限定されるものではないが、含むと理解される。PCR遺伝子型判定方法は十分に説明されており（例えば、Rios, G. et al. (2002) Plant J. 32:243-53）、任意の植物種（例えば、トウモロコシ（*Z. mays*）もしくはダイズ（*G. max*））または組織タイプ（細胞培養物を含む）に由来するゲノムDNAに適用することができる。

#### 【0166】

アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）依存性形質転換方法を用いて形成された遺伝子導入植物は、1つの染色体に挿入された単一の組み換えポリヌクレオチドを通常は含有する。この単一の組み換えポリヌクレオチドは、「遺伝子導入事象」または「組み込み事象」と言われる。そのような遺伝子導入植物は、挿入された外来性配列に対してヘテロ接合性である。いくつかの実施形態において、導入遺伝子に対してホモ接合性の遺伝子導入植物は、単一の外来性遺伝子を含有する独立分離個体遺伝子導入植物をそれ自体に、例えばT<sub>0</sub>植物に、性的交配（自家受粉）して、T<sub>1</sub>種子を生産することによって得ることができる。生産されるT<sub>1</sub>種子の4分の1は、導入遺伝子に対してヘテロ接合性となる。T<sub>1</sub>種子の発芽は、ヘテロ接合性について試験することができる植物をもたらし、この試験には、通常、ヘテロ接合体とホモ接合体間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）を用いる。

#### 【0167】

組み換え核酸分子での植物の直接形質転換に加えて、少なくとも1つの遺伝子導入事象を有する第1の植物とそのような事象のない第2の植物を交配することによって、遺伝子導入植物を調製することができる。例えば、目的の異種ポリペプチドをコードする1つま

たは複数の異種ポリヌクレオチドを含む組み換え核酸分子を、形質転換を受け入れる第1の植物系統に導入して遺伝子導入植物を生産してもよく、この遺伝子導入植物を第2の植物系統と交配させて、ポリヌクレオチドを第2の植物系統に遺伝子移入してもよい。

#### 【0168】

組み換え宿主の上述の遺伝子操作は、標準的遺伝子技術およびスクリーニングを用いて行うことができ、遺伝子操作に好適である任意の宿主細胞において行うことができる。いくつかの実施形態において、組み換え宿主は、双子葉植物と単子葉植物の両方を含む高等植物、および作物植物を含む消費植物である。したがって、任意の植物種または植物細胞を選択することができる。

#### 【0169】

本明細書における特定の実施形態は、細胞質および／または細胞の周辺質において目的の異種ポリペプチドを生産する方法を提供する。いくつかの実施形態は、宿主生物（例えば細菌宿主生物）における異種発現のために最適化された合成ポリヌクレオチドを用いる。特定の実施形態では、そのような最適化合成ポリヌクレオチドを発現ベクターに連結させることができ、最適化ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを発現宿主細胞に（例えば形質転換によって）導入することができ、その発現宿主細胞においてポリペプチドが最適化合成核酸配列から発現される。

#### 【0170】

目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを含む核酸分子を当業者に公知の方法によって生産することができる。例えば、いくつかの実施形態では、所望の核酸配列の比較的短いセグメントを確実に合成し、その後、連鎖させることができる。DNA合成分野における進歩によって、比較的短いポリヌクレオチドばかりでなく、より長いポリヌクレオチドの確実な生産も可能になった。合成技術によって塩基数300以上のかかなり正確なオリゴヌクレオチド合成が可能になる。したがって、他の実施形態では、より長いポリヌクレオチドが合成されることができ、その結果、濃縮を必要としないこともある。しかし、化学的に生産された合成オリゴヌクレオチドは、通常は20bp～100bpの間の長さである。いくつかの実施形態では、最終所望配列をコードするように設計された合成交互および重複センスおよびアンチセンスオリゴマー（例えば長さが90～110bp）のアニールおよび伸長による段階的PCRを用いて、合成遺伝子または遺伝子断片を調製することができる。

#### 【0171】

オリゴヌクレオチド生産は、固相合成のようなホスホロアミダイトプロトコルによって行われるオリゴ合成を含むことがある。簡単に言うと、DMT基によって保護された5'-OH官能基を有する第1のヌクレオチドを固相としてのポリスチレンビーズに結合させることができる。次に、DMT基を酸処理によって除去して、遊離5'-OH基を生成することができる。その後、選ばれたホスホロアミダイトを添加し、弱酸性条件で反応性中間体に転化させ、遊離5'-OH基に結合させて新規亜リン酸結合を生成することができる。これらの反応をTHFまたはDMSO中で行うことができる。付加されたヌクレオチドの5'-OHは保護されたままであるので、1つのヌクレオチドしか成長鎖に付加されない。反応しない5'-OH基は、合成プロセスに参加し続けることができないように、および欠失があるオリゴヌクレオチドを生成できないように、キャップすることができる。このキャッピングを酢酸および1-メチルイミダゾールでの処理後のアセチル化によって果たすことができる。最後に、水およびヨウ素を添加して亜リン酸結合をリン酸ジエステル結合に酸化することができる。ステップ間に、生産系を好適な溶媒での洗浄によってコンディショニングすることができる。この一連のステップを必要に応じて反復した後、最後にオリゴヌクレオチドをカラムから切断し、高温の水酸化アンモニウムで処理してすべての残存保護基を除去することができる。このプロセスは、例えばNIMBLEGEN（商標）（Feibit, Germany）によって提供されているような、フォトリソグラフィアプローチの使用によって、より効率的にすることができる。

#### 【0172】

短いオリゴヌクレオチドを固相合成によって生産した後、それらのオリゴヌクレオチドからより大きいDNA断片、例えば約500bpのサイズをアセンブルすることができる。これは、様々な酵素援用方法の1つによって通常は果たされる。例えば、短い重複オリゴヌクレオチドペアを使用して、クレノウ（Klenow）伸長反応によってより長いdsDNA分子を生成することができる。対応するオリゴヌクレオチドを混合し、ハイブリダイズし、その後、PCAによってより長い構築物へと転化させることができる。PCA反応には、標的2本鎖DNA断片を一緒に表すすべてのオリゴヌクレオチドが存在する。融解および再ハイブリダイゼーションを反復することによって、特定の集団が所望の長さに達するまでオリゴヌクレオチドを段階的に伸長させてより長い切片にする。この反応が過剰な末端オリゴヌクレオチドなしに行われ、そのため増幅反応ではないことに留意されたい。もっと正確に言えば、すべての完全長断片はオリゴヌクレオチドおよびそれらの伸長部分からなり、その結果、ポリメラーゼ反応によって誤りが導入される機会が低減される。PCAの代替方法論は、末端プライマーをオリゴヌクレオチドプールに加え、その結果、オリゴヌクレオチドの特異的サブセットのみを増幅する、ポリメラーゼアセンブリ多重化（PAM）である。PAM反応の第2ラウンドでは、新規プライマーセットを使用することにより複数のオリゴヌクレオチドを単一DNA分子に組み換えることができる。

10

#### 【0173】

大きいオリゴヌクレオチド（例えば、PCA、PMAなどによって生産されるオリゴヌクレオチド）から、例えば制限消化およびライゲーションによって、よりいっそう大きいDNAをアセンブルすることができる。

20

#### 【0174】

アミノ酸反復領域を含む目的のポリペプチドを原核細胞または発現系において発現させることになる実施形態では、目的のポリペプチドをコードする最適化されたポリヌクレオチドを、核酸配列挿入のためのベクター（複製起点と、ポリリンカーを含み得る適便な制限部位とを有するベクター）を直線化することによって、先ず原核生物ベクターにクローニングすることができる。ベクターは、抗生物質抵抗性を付与することまたは別の識別特性（例えば発色団またはフルオロフォア形成）をもたらすことができる、選択のためのマーカー遺伝子も有することもある。マーカー援用選択に用いることができる様々な抗生物質試薬（例えば、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、アクチノマイシン、ネオマイシン、アンピリシン、ハイグロマイシン、重金属など）がある。他のマーカーとしては、発現されると基質X-galを転化させて青色をもたらす、 $\square$ -ガラクトシダーゼが挙げられる。細菌でのクローニング用の非常にいくつかのベクターが市販されており、これらのベクターは当業者に周知である。いくつかの実施形態では、その後、目的のポリペプチドをコードする1つまたは複数の最適化合成ポリヌクレオチドを含む原核細胞ベクターを、リン酸カルシウム沈殿DNA、融合、トランスフェクションおよび接合を限定ではないが含む任意の適便な手段によって、適切なクローニング宿主に導入することができる。その後、細胞を適切な選択的栄養培地で成長させることができる。生存細胞を回収し、溶解し、プラスミドを単離することができる。

30

#### 【0175】

原核細胞発現ベクターは、適切な発現宿主において通常はエピソードの維持のために機能する複製起点と、選択のためのマーカーとを有することの特徴とし得る。組み込まれていないベクターまたは構築物については、複製起点は、多コピー、例えば、平均で少なくとも5コピーを普通はもたらすことになる。発現ベクターは、発現宿主において機能するプロモーターも有することになる。いくつかのプロモーターが利用可能であり、特定のプロモーターは、例えば、高レベルの誘導性転写または構成的転写いずれかをもたらすことができる。いくつかの実施形態において有用であり得る説明に役立つプロモーターとしては、限定ではないが、 $\square$ -ラクタマーゼ、 $\square$ -ガラクトシダーゼ、 $\square P_I$ または $\square P_R$ プロモーター、trpEプロモーター、trp-lacプロモーター、T7プロモーター（特に遺伝子9および10）、およびcI<sup>ts</sup>が挙げられる。

40

#### 【0176】

50

最適化ポリヌクレオチドを含む核酸分子と直線化ベクターとをハイブリダイゼーション、例えばライゲーションによって結合させることができる。最適化ポリヌクレオチドが開始コドンをもたない場合、そのようなコドンを追加させることができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを、ベクター中（適切なリーディングフレーム内）に存在するコード配列に、プロモーターの転写制御下で挿入することができる。シグナル配列をコード配列の 5' 末端に含めて、細胞膜周辺腔へのポリペプチド産物の選択を可能にすることができる。一般に、この産物は細胞内生産されることになる。

#### 【0177】

導入されたベクターまたは DNA 構築物を含む発現宿主細胞を培養（例えば発酵）で適切な培地において成長させることができる。細胞を適切な密度に成長させた後、細胞を回収し、溶解し、発現産物をその物理的および化学的特性に従って単離することができる。いくつかの実施形態において、発現産物は、中温で水性媒体に不溶性であることがあり、軽度の上昇させた温度での洗浄剤抽出によって精製されることがある。米国特許第 5, 235, 041 号を参照されたい。必要に応じて、その後、粗製のまたは精製された発現産物をその所期の目的に使用することができる。

#### 【0178】

本明細書における実施形態は、目的の任意のポリペプチドの発現を可能にする。いくつかの例では、目的のポリペプチドは、それ自体が施用（例えばポリマー）に望ましいことがある。他の例では、目的のポリペプチドを宿主において発現させて、さらに望ましいポリペプチド、小分子または他の物質（例えば酵素）を生産することができ、宿主に所望の表現型を導入することができる。特定の例では、目的のポリペプチドは、発現宿主の細胞では通常は見つけれないタンパク質；農耕学的遺伝子産物；有害生物または疾病に対する抵抗性を付与するポリペプチド；バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) タンパク質；レクチン；ビタミン結合タンパク質（例えばアビジン）；酵素阻害剤；昆虫特異的ホルモンまたはフェロモン；特定の生物に特異的であるペプチドまたは神経ペプチド；毒液；モノテルペン、セスキテルペン、ステロイド、ヒドロキサム酸、フェニルプロパノイド誘導体または他の非タンパク質分子の高度集積の原因となる酵素；生理活性分子の、翻訳後修飾を含む、修飾に関与する酵素（例えば、オメガ-3 脂肪酸合成に関与する酵素）；シグナル伝達分子またはシグナル伝達を刺激する分子（例えばカルモジュリン）；疎水性モーメントペプチド；膜透過酵素、輸送体またはチャネル；チャネル形成剤またはチャネル遮断剤；ウイルス侵襲性タンパク質またはそれに由来する複合毒素；抗体または免疫毒素（例えばウイルス特異的抗体）；発育抑止タンパク質；除草剤、殺真菌剤または他の有害小分子に対する抵抗性を付与するポリペプチド；足場タンパク質；および特定の機能（例えば、結合タンパク質などのアミノ酸リピート領域または物理的特性に起因し得る機能）を有するように設計されている合成ポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態では、目的のポリペプチドを自然界から使うことができる。他の実施形態では、目的のポリペプチドは、自然界で通常見つけられないポリペプチド、例えば、目的のネイティブポリペプチドのアミノ酸配列に保存的突然変異を含む突然変異型ポリペプチドであり得る。

#### 【0179】

特定の実施形態では、異なるパラメータを使用する配列最適化によって生成された 2 つ以上の異なる候補配列（例えば、コドン使用頻度が異なる配列）を生成し、所望の特定を有するかどうかを判定することができる。候補配列を評価して、例えば、サイレンサーもしくはエンハンサーなどの調節配列の存在を探索してもよいし、またはそのような調節エレメントに変換され得るコード配列の領域の存在をコドン使用頻度の変化によって探索してもよい。さらなる基準としては、特定のヌクレオチド（例えば、A、C、G もしくは U）についての濃縮（例えば、特定のアミノ酸についてのコドンの偏向）、特定の mRNA 二次もしくは三次構造の存在もしくは不在、および／またはさらなるポリアデニル化配列の存在もしくは不在を挙げることができる。さらなる発現のための候補配列の調整をそのような基準に基づいて行うことができる。

## 【0180】

有望な候補配列を構築し、実験に基づいて評価することができる。複数の候補を互いに独立して評価してもよく、またはその評価プロセスは、最も有望な候補を新たな出発点として使用することによる、または2つ以上の候補の領域を組み合わせる新規雑種を生産することによる、反復的なものであることができる。さらなる修飾および評価ラウンドが望ましいこともある。

## 【0181】

本明細書における他の実施形態は、植物細胞、植物組織、植物材料および／または植物全体において望ましい表現型または形質を得る方法であって、望ましい表現型が例えば昆虫毒素の発現であり、望ましい形質が有害生物耐性および／または抵抗性であり得る方法を提供する。いくつかの例では、植物における有害生物を防除する方法は、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを植物細胞において発現させるステップを含み、合成ポリヌクレオチドは、昆虫毒素、例えば、限定ではないが、バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) Cryタンパク質をコードする。粗挽き粉または細粉における有害生物を防除する方法の特定の例は、合成ポリヌクレオチドを含有する植物から子実または種子を得るステップを含み、植物は昆虫毒素を発現する。昆虫毒素を発現する遺伝子導入植物は、植物の細胞中の防除量の対象殺虫性タンパク質（またはその変異体）の存在のおかげで昆虫標的有害生物による攻撃に対して抵抗性であり得る。例えば、Bt殺虫性毒素の殺虫特定を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物のゲノムに導入することにより、昆虫標的有害生物（例えば、成虫または幼虫）は、その植物材料の摂取後、死ぬことになる。

## 【0182】

本明細書における特定の実施形態は、植物細胞、植物組織、植物材料および／または植物全体において望ましい表現型または形質を得る方法であって、望ましい表現型が例えば除草剤耐性および／または抵抗性遺伝子の発現であり、望ましい形質が除草剤耐性および／または抵抗性であり得る方法を提供する。いくつかの例では、植物に除草剤耐性をもたらす方法は、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを植物細胞において発現させるステップを含み、合成ポリヌクレオチドは、除草剤耐性酵素、例えば、限定ではないが、アリーロキシアルカノエートジオキシゲナーゼ (AAD1) (PCT国際特許公開番号WO2005/107437参照)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT)、または5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ (EPSPシンターゼ) 酵素をコードする。

## 【0183】

本明細書における特定の実施形態は、植物細胞、植物組織、植物材料および／または植物全体において望ましい表現型または形質を得る方法であって、望ましい表現型が例えば植物油形質に関与するタンパク質の発現であり、望ましい形質が植物における修飾された油プロファイルであり得る方法を提供する。いくつかの例では、植物の油プロファイルを修飾する方法は、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを植物細胞において発現させるステップを含み、合成ポリヌクレオチドは、植物における油プロファイルを修飾するための1つまたは複数の酵素、例えば、限定ではないが、脂肪酸デサチュラーゼ（例えばFAD2およびFAD3）をコードする。

## 【0184】

本明細書における特定の実施形態は、植物細胞、植物組織、植物材料および／または植物全体において望ましい表現型または形質を得る方法であって、望ましい表現型が例えばストレス耐性遺伝子の発現であり、望ましい形質が例えば水および／または熱ストレスに対するストレス耐性であり得る方法を提供する。いくつかの実施例では、植物にストレス耐性をもたらす方法は、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを植物細胞において発現させるステップを含み、合成ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のストレス耐性タンパク質、例えば、限定ではないが、ストレス関連タンパク質 (SAP1) (米国特許出願公開第2010/0275327号) および1-Cysペルオキシレドキシ

ン (1-CysPrx) タンパク質 (Mowla et al. (2002) Planta 215:716-26) をコードする。

#### 【0185】

本明細書における特定の実施形態は、植物細胞、植物組織、植物材料および／または植物全体において望ましい表現型または形質を得る方法であって、望ましい表現型が例えばマーカータンパク質の発現であり、望ましい形質がマーカー選択であり得る方法を提供する。いくつかの実施例では、植物にマーカー選択をもたらす方法は、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを植物細胞において発現させるステップを含み、合成ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の形質転換マーカータンパク質、例えば、限定ではないが、緑色蛍光タンパク質 (GFP) またはβ-グルクロニダーゼ酵素をコードする。

10

#### 【0186】

##### VI. 目的のポリペプチドを含む遺伝子導入植物

本開示は、目的のポリペプチドをコードする異種、合成ポリヌクレオチドを含む、遺伝子修飾生物も提供する。本明細書におけるいくつかの実施形態は、目的のポリペプチドをコードする異種、合成ポリヌクレオチドを含む遺伝子導入植物であって、例えば、合成ポリヌクレオチドを含む核酸で形質転換された植物細胞からの植物の再生によって生産され得るような植物を提供する。目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを、前に説明したように、生物に適している調節配列 (例えばプロモーター) に作動可能に連結することができる。特定の実施形態において、生物は、目的のポリペプチドを発現することができる。本明細書における特定の実施形態において、目的のポリペプチドは、最適化されたポリペプチドから、同様に最適化されていない同じポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、同じ宿主での発現についてコドン最適化されているが、AATAAA、AATAAT、AACCAA、ATATAA、AATCAA、ATACTA、ATAAAA、ATGAAA、AAGCAT、ATTAAAT、ATACAT、AAAAATA、ATTAAA、AATTAA、AATACAおよびCATAAAからなる群から選択されるポリアデニル化配列が保存されていないポリヌクレオチド、によって発現されるものの少なくとも110%、150%、200%、500%、1,000%、5,000%またはさらには10,000%であるレベルで発現され得る。

20

#### 【0187】

いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドをコードする異種、合成ポリヌクレオチドを含む遺伝子修飾生物は、遺伝子修飾植物であり、遺伝子修飾植物の細胞の少なくとも一部は、異種、合成ポリヌクレオチドの1つまたは複数を含む。ある実施形態の1つの例では、目的のポリペプチドをコードする異種、合成ポリヌクレオチドと選択可能マーカーとを含むプラスミドを、植物細胞に、例えば本明細書において前に列挙した方法のいずれかによって導入する。合成ポリヌクレオチドおよび／または選択可能マーカーが安定的に組み込まれている好適な形質転換体をそのような植物細胞から選択することができる。他の実施形態では、合成ポリヌクレオチド (例えば、選択された安定な形質転換体) を含む植物細胞を増殖させて、合成ポリヌクレオチドを含む新たな植物細胞を生産することができる。合成ポリヌクレオチドを含む植物細胞は、植物細胞を再生するために使用することができる再生可能細胞であり得る。そのような植物細胞およびそれらから生成された植物全体は、合成ポリヌクレオチドによってコードされている目的のポリペプチドを発現することができる。

30

40

#### 【0188】

これらの実施形態およびさらなる実施形態において、合成ポリヌクレオチドを含む再生可能植物細胞を (例えば、組織培養での使用のために) 創製する方法を提供することができる。組織培養は、再生可能細胞と実質的に同じ遺伝子型を有する植物を再生できる可能性がある。そのような組織培養での再生可能細胞は、胚、プロトプラスト、分裂組織細胞、カルス、花粉、葉、葯、根、根端、花、種子、さやまたは茎であり得る。本発明のいくつかの実施形態は、本発明の組織培養から再生された植物を提供する。

#### 【0189】

50

目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを含む安定化植物系統を生成する方法であって、安定化植物系統の細胞が、ポリヌクレオチドによってコードされている目的のポリペプチドを発現することができる方法も、本明細書において提供する。安定化植物系統を生成する方法は当業者に公知であり、自家受粉、戻し交配、雑種生産、および個体群の交配などの（しかしこれらに限定されない）技術を含み得る。本明細書に記載の目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを含むすべての植物および植物細胞は自然界に存在せず、例えば、同様に最適化されていない目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを含む植物または植物細胞と比較したとき、目的の異種ポリペプチドの有利な発現特性を示すことができる。合成ポリヌクレオチドを含む植物細胞を他の異なる植物細胞との交配に使用して、優れたまたは望ましい特性を有する第一世代（F<sub>1</sub>）雑種細胞、種子および／または植物を生産することができる。

10

#### 【0190】

本明細書に記載する方法によって最適化された合成ポリヌクレオチドから目的のポリペプチドを発現する任意の植物もしくは植物細胞、またはそのようなポリペプチドを含む植物材料は、特定の実施形態に含まれる。特定の実施形態では、合成ポリヌクレオチドを用いて遺伝子修飾セイヨウアブラナ（*Brassica napus*）植物を生産する。さらなる実施形態において、合成ポリヌクレオチドを使用して生産される遺伝子修飾植物は、例えば、限定ではないが、高等植物、双子葉植物、単子葉植物、消費植物（例えば、油が使用される作物植物）、ダイズ、ナタネ、アマニ、トウモロコシ、ベニバナ、ヒマワリ、タバコ、マメ科（*Fabaceae*）〔マメ科（*Leguminosae*）、マメ科（*legume family*）、マメ科（*pea family*）、マメ科（*bean family*）またはマメ科（*pulse family*）〕の植物、ダイズ属〔例えば、*G. アルビカンス*（*G. albicans*）、*G. アフィロノタ*（*G. aphyonota*）、*G. アレナイ*（*G. arenari*）、*G. アルギレア*（*G. argyrea*）、*G. カネッセン*（*G. canescens*）、*G. クランデスチン*（*G. clandestine*）、*G. クルバタ*（*G. curvata*）、*G. クリトロバ*（*G. cyrtoloba*）、*G. ファルカテ*（*G. falcate*）、*G. グラセイ*（*G. gracei*）、*G. ヒルチカウリス*（*G. hirticaulis*）、*G. ヒルチカウリス亜種レプトサ*（*G. hirticaulis subsp. leptosa*）、*G. ラクトビレンス*（*G. lactovirens*）、*G. ラチフォリア*（*G. latifolia*）、*G. ラトロベアナ*（*G. latrobeana*）、*G. ミクロフィラ*（*G. micropylla*）、*G. モンチス・ダグラス*（*G. montis-douglas*）、*G. ペラトサ*（*G. peratosa*）、*G. ペスカドレンシス*（*G. pescadrensis*）、*G. ピンダニカ*（*G. pindanica*）、*G. プレニイ*（*G. pullenii*）、*G. ルビギノサ*（*G. rubiginosa*）、*G. ステノフィタ*（*G. stenophita*）、*G. シンデチカ*（*G. syndetika*）、*T G. タバシナ*（*G. tabacina*）、*G. トメンテラ*（*G. tomentella*）、ツルマメ（*G. soja*）およびダイズ（*G. Max*）（ダイズ）〕の植物、ピーナッツ、インゲンマメ（*Phaseolus vulgaris*）、ソラマメ（*Vicia faba*）およびエンドウマメ（*Pisum sativum*）であり得る。

20

30

#### 【0191】

いくつかの実施形態において、遺伝子修飾植物は、医薬品、着香剤、栄養補助剤、機能性食品製品もしくは美容活性薬剤として使用される化合物を生産することが公知である植物、またはこれらの化合物／薬剤を生産するように遺伝子操作されている植物である。

#### 【0192】

他の実施形態において、遺伝子修飾植物は、油糧種子および／またはそれらからの油が同じ種の野生型植物に対して修飾された油プロファイル（例えば、普通でない量、オメガ油含有量および増加した油含有量の LC-PUFA の発現）を有する、油糧種子植物である。

40

#### 【0193】

代替実施形態において、本明細書に記載の目的のポリペプチドをコードする異種、合成ポリヌクレオチドを含む遺伝子導入植物または種子は、そのゲノムに少なくとも1つの他の遺伝子導入事象も含むことがあり、それらの事象としては、限定でないが、殺虫性タンパク質（例えば、バチルス・チューリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）殺虫性タンパク質）をコードする遺伝子、除草剤耐性遺伝子（例えば、グリホサートに対する耐性を

50

もたらす遺伝子)、および遺伝子導入植物における望ましい表現型、例えば収穫量増加、脂肪酸代謝改変または細胞質雄性不稔の回復の一因となる遺伝子が挙げられる。特定の実施形態では、目的のポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドと、そのような追加の導入遺伝子とを、組み換えDNA技術によって、または追加の導入遺伝子を既に含む植物を用いる従来の育種によって、組み合わせる。

#### 【0194】

いくつかの実施形態には、本明細書に記載の目的のポリペプチドをコードする異種、合成ポリヌクレオチドを含む植物の部位も含まれる。そのような植物部位としては、例えば、限定ではないが、種子(成熟種子および未成熟種子を含む)、組織、花粉、胚、花、果実、芽、葉、根、茎および外植片を含む、植物の任意の部位が挙げられる。特定の実施形態は、本明細書に記載の目的のポリペプチドをコードする異種、合成ポリヌクレオチドを含む植物の子孫を含む。

10

#### 【0195】

以下の実施例は、若干の特定の特徴および/または実施形態を例証するために提供するものである。これらの実施例が本開示を例示する特定の特徴または実施形態に限定すると解釈すべきではない。

#### [実施例]

#### 【実施例1】

#### 【0196】

切断型Cry1Abタンパク質をコードする複数のDNA配列のT<sub>0</sub>トウモロコシにおける遺伝子発現に対する影響についての評価

20

同一の切断型Cry1Abタンパク質をコードする3つの異なるDNA配列を評価した。異なる3バージョンのcry1Ab遺伝子を均一バイナリー植物形質転換ベクターで試験した。同じ選択可能マーカーカセットを有する同一遺伝子発現カセットにこれらの遺伝子をクローニングした。各プラスミドの唯一の変要素は、切断型cry1Ab遺伝子をコードする実際のDNA配列であった。

#### 【0197】

#### 材料および方法

合成Cry1Ab DNA配列の設計。この研究で使用する切断型Cry1Abタンパク質は、ネイティブCry1Ab完全長タンパク質の位置1~619で見られるものに対応するアミノ酸からなる。アミノ酸1~619をコードする切断型のネイティブcry1Ab遺伝子を16の別個のポリアデニル化配列の存在について分析した。表2。ネイティブcry1Ab遺伝子において同定されたこれら16の配列の場所および組成を記録し、そのような位置および組成を、評価するcry1Ab切断型遺伝子配列の設計に含めた。

30

#### 【0198】

遺伝子設計に関する様々な概念を用いて、3つの異なるDNA配列を設計し、創製した。各バージョンのcry1Ab遺伝子を、アミノ酸1~619からなる対応するタンパク質を生じさせるようにトリミングし、ネイティブ遺伝子で見られる上述の16のポリアデニル化配列を含むように、およびさらなる推定不安定性配列を除去するようにDNA組成を変更し、塩基1639で始まる17のポリアデニル化配列をこの設計に組み込んだ。この配列を本明細書では「IRDIG. 1471. 4」と呼ぶ。

40

#### 【0199】

新たな2バージョンの遺伝子を設計して、異なる再設計仮説を試験した。OPTGENE(商標)2.0ソフトウェア(Ocimum Biosolutions、Banjara Hills Hyderabad、India)を使用して、Cry1Abコア毒素をコードする野生型DNA配列に対応するアミノ酸配列に翻訳し、その後、各アミノ酸の最優先コドンを使用して逆翻訳した。得られたDNA配列を分析し、必要に応じて、表2で識別される配列を回復するように、不必要なオープンリーディングフレームを除去するように、不必要な制限部位を除去するように、および可能な場合にはG+CコドンまたはA+Tコドンいずれかの連続鎖を壊すような塩基の置換によってG+CおよびA+Tの

50

伸長した並びを除去するようにコドンを変更した。得られたコード化アミノ酸配列は、ネイティブアミノ酸配列と一致した。この配列を本明細書では「IRDIG. 1471. 2」と呼ぶ。

#### 【0200】

第2の配列設計は、800を超えるトウモロコシ遺伝子のアミノ酸コドンの分布を包含するトウモロコシコドン分布表に基づいた。コアCry1Abタンパク質に対応するアミノ酸配列を、平均トウモロコシ遺伝子中に存在する各コドンのレベルに対応するアミノ酸コドン分布表を使用して、逆翻訳した。低頻度コドン（すなわち、10パーセント以下の確率で存在するコドン）は含めなかった。得られたDNA配列を分析し、必要に応じて、不必要なオープンリーディングフレームを除去するように、不必要な制限部位を除去するように、表2で識別される配列を回復するように、および可能な場合はG+CおよびA+Tの伸長した並びを除去するようにコドンを変更した。得られたコード化アミノ酸配列は、ネイティブアミノ酸配列と一致した。この配列を本明細書では「IRDIG. 1471. 3」と呼ぶ。

#### 【0201】

##### 【表2】

**表2. ネイティブcry1Ab遺伝子に見られる配列を、この実験で評価する再構築遺伝子に含めた。1639に表から1つの追加ポリアデニル化部位(AATCAA)があり、この部位は、ネイティブ配列には含まれていないが、追加の推定不安定化配列を排除するので再構築物中に工学的に作製した。**

|    | 配列     | ネイティブCry1Ab中の部位の数 | ネイティブCry1Ab中の場所 | IRDIG.1471.2 | IRDIG.1471.3 | IRDIG.1471.4 | 再設計Cry1Ab中の場所   |
|----|--------|-------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| 1  | AATAAA | 0                 | -               | 0            | 0            | 0            | -               |
| 2  | AATAAT | 3                 | 960, 1126, 1387 | 3            | 3            | 3            | 960, 1126, 1387 |
| 3  | AACCAA | 2                 | 253, 280        | 2            | 2            | 2            | 253, 280        |
| 4  | ATATAA | 2                 | 185, 1391       | 2            | 2            | 2            | 185, 1391       |
| 5  | AATCAA | 2                 | 688, 1129       | 3            | 3            | 3            | 688, 1129, 1639 |
| 6  | ATACTA | 0                 | -               | 0            | 0            | 0            | -               |
| 7  | ATAAAA | 0                 | -               | 0            | 0            | 0            | -               |
| 8  | ATGAAA | 1                 | 1232            | 1            | 1            | 1            | 1232            |
| 9  | AAGCAT | 0                 | -               | 0            | 0            | 0            | -               |
| 10 | ATTAAT | 1                 | 1636            | 1            | 1            | 1            | 1636            |
| 11 | ATACAT | 2                 | 1366, 1613      | 2            | 2            | 2            | 1366, 1613      |
| 12 | AAAATA | 0                 | -               | 0            | 0            | 0            | -               |
| 13 | ATTAAA | 3                 | 249, 704, 785   | 3            | 3            | 3            | 249, 704, 785   |
| 14 | AATTAA | 0                 | -               | 0            | 0            | 0            | -               |
| 15 | AATACA | 0                 | -               | 0            | 0            | 0            | -               |
| 16 | CATAAA | 0                 | -               | 0            | 0            | 0            | -               |
|    | 合計     | 16                |                 | 17           | 17           | 17           |                 |

#### 【0202】

異なる3バージョンの切断型cry1Abを総計G+C含有量について評価した。総計は、50.9%～59.5%G+Cの範囲であった。表3。上に記載した3バージョンの切断型cry1Ab各々を合成した(DNA2.0; Menlo Park, CA)。

#### 【0203】

【表 3】

表3.異なる3バージョンのCry1Ab各々についてのG+C含有量。

| Cry1Ab配列     | G+C 含有量 |
|--------------|---------|
| IRDIG.1471.2 | 59.50%  |
| IRDIG.1471.3 | 50.90%  |
| IRDIG.1471.4 | 51.40%  |

【0204】

植物発現ベクター構築。cry1Ab発現カセットを含有するエントリーベクターの構築には標準的クローニング方法を用いた。cry1Ab発現カセットを含有するバイナリープラスミドを、GATEWAY（登録商標）（Invitrogen、Carlsbad、CA）を用いて工学的に作製し、アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介植物形質転換に使用した。制限エンドヌクレアーゼはNew England Biolabs（NEB（登録商標）；Ipswich、MA）から入手し、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen）をDNAライゲーションに使用した。1つのエントリーベクターと1つのディスティネーションベクターをアセンブルするためにGATEWAY（登録商標）LR CLONASE（登録商標）酵素ミックス（Invitrogen）を使用してGATEWAY（登録商標）反応を行った。プラスミド調製は、NUCLEOSPIN（登録商標）Plasmid Kit（Macherey-Nagel Inc.、Bethlehem、PA）またはPlasmid Midi Kit（QIAGEN）を供給業者の説明書に従って使用して行った。アガローストリスー酢酸ゲル電気泳動後にQIAQUICK（登録商標）Gel Extraction Kit（QIAGEN）を使用してDNA断片を単離した。

【0205】

上述のDNA設計での切断型Cry1Abをコードする3つの合成遺伝子をプラスミドDASDNA411～DASDNA443において得た。植物発現ベクター構築を、BamHI/SacI断片のZmUbi1プロモーターとZmPer5 3'非翻訳領域（3'UTR）の間のpDAB101557への各合成cry1Ab遺伝子の挿入で開始して、エントリーベクターpDAB111444～pDAB111446を生成した。GATEWAY（登録商標）技術を用いて、エントリーベクターpDAB111444～pDAB111446各々を、選択可能マーカーカセットSCBV（MAM）プロモーターv2/AAD-1 v3/ZmLip 3'UTR v1を含有するディスティネーションベクターpDAB109805と組み換えて、最終バイナリーベクターpDAB111447～pDAB111449をそれぞれ創製した。

【0206】

アセンブルされたすべてのプラスミドのコロニーをミニプレブDNAの制限消化によって最初にスクリーニングした。選択されたクローンのプラスミドDNAを商業シーケンシング供給業者（EUROFINS（商標）MWG Operon、Huntsville、AL）との契約によってシーケンシングした。SEQUENCHER（商標）ソフトウェア（Gene Codes Corp.、Ann Arbor、MI）を用いて、配列データをアセンブルし、分析した。プラスミドマップは、正確な配列を反映する。図1。

【0207】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）株生産。植物形質転換用のアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）株を発生させるために使用した大腸菌（E. coli）由来プラスミドDNAの詳細を表4に提供する。A. ツメファシエンス（A. tumefaciens）のrecA-ターナリー株であるDat13192が、これらの植物形質転換株の発生のために選択した基本株であった。標準的形質転換プロトコルをこれらの株の発生に用いた。目的のバイナリーベクターで安定的に形質転換された新たなA. ツメファシエンス（A. tumefaciens）株の発生を各株の制限

消化によって確認して、各構築物について少なくとも1つのコロニーの確証を得た。

【0208】

【表4】

**表4.DAt13192から植物形質転換用のA.ツメファシエンス(A. tumefaciens)**

株を発生させるために使用した大腸菌(E. coli)由来プラスミドDNA。

| Cry1Abアグロバクテリウム(Agrobacterium)検証の要約 |                                                         |      |    |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------|------|----|
| 構築物                                 | 説明                                                      | コロニー | 結果 |
| pDAB111447                          | ZmUbi1 v2/IRDIG.1741.2/ZmPer5::SCBV(MAM)/AAD-1 v3/ZmLip | 1    | 合格 |
|                                     |                                                         | 2    | 合格 |
| pDAB111448                          | ZmUbi1 v2/IRDIG.1741.3/ZmPer5::SCBV(MAM)/AAD-1 v3/ZmLip | 1    | 合格 |
|                                     |                                                         | 2    | 合格 |
| pDAB111449                          | ZmUbi1 v2/IRDIG.1741.4/ZmPer5::SCBV(MAM)/AAD-1 v3/ZmLip | 1    | 合格 |
|                                     |                                                         | 2    | 合格 |

10

【0209】

アグロバクテリウム (Agrobacterium) 培養開始。宿主 A. ツメファシエンス (A. tumefaciens) D A t 1 3 1 9 2 株 (R e c A マイナスターナリー株) におけるプロジェクトベクターのグリセロールストックを得、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 培養物をグリセロールストックから A B 最小培地に画線し、20℃で、暗所で、2～3日インキュベートした。その後、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 培養物を Y E P 培地のプレートに画線し、20℃で、暗所で、1日、インキュベートした。

20

【0210】

実験当日、接種培地とアセトシリングンの混合物を実験の構築物数に適した体積で調製した。表5。接種培地を滅菌、使い捨て250mLフラスコにピペットで移した。100%ジメチルスルホキシド中のアセトシリングンの1Mストック溶液を、接種培地が入っているフラスコに、200μMの最終アセトシリングン濃度にするために適した体積で添加した。

【0211】

【表5】

**表5.調製した構築物の数に従って作製した接種培地/アセトシリングン混合物の量。**

30

| 調製した構築物の数 | 接種培地 (mL) | 1Mアセトシリングンストック (μL) |
|-----------|-----------|---------------------|
| 1         | 50        | 10                  |
| 2         | 100       | 20                  |
| 3         | 150       | 30                  |
| 4         | 200       | 40                  |
| 5         | 250       | 50                  |

【0212】

各構築物について、1～2ループのアグロバクテリウム (Agrobacterium) を Y E P プレートから滅菌、使い捨て50mL遠心チューブ内の15mL接種培地/アセトシリングン混合物に懸濁させ、分光光度計で600nmでの溶液の光学密度 (OD<sub>600</sub>) を測定した。その後、さらなる接種培地/アセトシリングン混合物を使用して懸濁液を希釈して0.25～0.35OD<sub>600</sub>にした。その後、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 懸濁液のチューブを、約75rpmに設定したプラットフォームシェーカーに室温で1～4時間の間、水平に載せておき、その後、使用した。

40

【0213】

穂の滅菌および胚の単離。トウモロコシ (Zea mays) 栽培品種 B 1 0 4 からの穂を温室施設で生産し、受粉10～12日後に収穫した。収穫した穂を脱穀し、層流フード内で、商業用漂白剤 (U L T R A C L O R O X (登録商標) Germicidal Blea

50

ch、6.15%次亜塩素酸ナトリウム)の20%溶液および2滴のTWEEN(商標)20に20分間浸漬し、その後、滅菌脱イオン水で3回すすぐことによって表面滅菌した。未成熟接合胚(1.8~2.2mm長)を各穂から無菌切除し、2μlの10%BREAK-THRU(登録商標)S233界面活性剤を添加した2.0mLアグロバクテリウム(Agrobacterium)懸濁液が入っている1本または複数のマイクロ遠心チューブに分配した。

#### 【0214】

アグロバクテリウム(Agrobacterium)共培養。胚単離活動完了後、胚のチューブを閉じ、ロッカープラットフォームに5分間、載せておいた。その後、チューブの内容物を共培養培地のプレートに注ぎ入れ、液体アグロバクテリウム(Agrobacterium)懸濁物を滅菌、使い捨てホールピペットで除去した。顕微鏡を使用して胚を胚盤が上を向く方向にした。その後、胚を有するその共培養プレートを、蓋を少し開けてさらに15分間、層流フードの後部に置いておいた。その後、プレートを閉じ、3Mマイクロポアテープで密封し、おおよそ $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度で、明期24時間/日で、25℃のインキュベーターに入れておいた。

#### 【0215】

カルス選択および遺伝子導入事象の再生。共培養期間後、胚を休止培地に移した。36以下の胚を各プレートから除去した。プレートに3Mマイクロポアテープを巻きつけ、27℃で、明期24時間/日で、おおよそ $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度で、7~10日間、インキュベートした。その後、カルス化した胚を選択I培地に移した。18以下のカルス化した胚を選択Iの各プレートから除去した。プレートに3Mマイクロポアテープを巻きつけ、27℃で、明期24時間/日で、おおよそ $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度で、7日間、インキュベートした。その後、カルス化した胚を選択II培地に移した。12以下のカルス化した胚を選択IIの各プレートから除去した。プレートに3Mマイクロポアテープを巻きつけ、27℃で、明期24時間/日で、おおよそ $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度で、14日間、インキュベートした。

#### 【0216】

この時期に、抵抗性カルスを予備再生培地に移動した。9以下のカルスを予備再生培地の各プレートに移動した。プレートに3Mマイクロポアテープを巻きつけ、27℃で、明期24時間/日で、おおよそ $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度で、7日間、インキュベートした。その後、再生中のカルスをPHYTATRAYS(商標)の中の再生培地に移し、25.5℃で、1日16時間明期/8時間暗期で、おおよそ $90\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度で7~14日間、または芽が出るまでインキュベートした。5以下のカルスを各PHYTATRAY(商標)に入れた。その後、小さい芽を一次根とともに単離し、芽伸長培地に移した。約6cm以上の高さの根付いた小植物を土壌に移植し、寒さに慣れさせるために栽培箱に移動した。

#### 【0217】

PCRのための植物組織からのゲノムDNA単離。組織サンプル(標準的クラフトパンチを使用して2回葉をパンチしたのと同程度の葉の引き裂き)を96ウェル回収プレート(QIAGEN#19560)に回収した。ステンレス鋼ビーズ1個を伴うBIOSPRINT96(商標)AP1溶解緩衝液中、KLECKO(商標)組織粉碎機(Garcia Manufacturing、Visalia、CA)で、組織破壊を行った。組織解離後、BIOSPRINT96(商標)抽出ロボットを使用してBIOSPRINT96(商標)Plant kit(QIAGEN、#69181)をハイスループット形式でを使用してゲノムDNAを単離した。ゲノムDNAを2:3 DNA/H<sub>2</sub>Oで希釈した後、qPCR反応を起こして適切なCpスコアを得た。

#### 【0218】

qPCR。LIGHTCYCLER(登録商標)480システム(Roche Applied Science)を使用してリアルタイムPCRによって加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子検出を行った。PRIMER EXPRESS(商標)と、Zm

10

20

30

40

50

U b i 1 プロモーター ( z m U b i L N K ) の 3 ' 領域と、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子 ( s p e c R ) を使用し、L I G H T C Y C L E R ( 登録商標 ) P r o b e D e s i g n S o f t w a r e 2 . 0 を使用して、A A D - 1 用のアッセイを設計した。アッセイを内部参照アッセイインバナーゼで多重化して、g D N A が各アッセイに確実に存在するようにした。増幅のために、0 . 4 μ M プライマーと 0 . 2 μ M プローブとを含有する 1 0 μ L 容量のマルチプレックス反応において 1 X 最終濃度で L I G H T C Y C L E R ( 登録商標 ) 4 8 0 P r o b e s M a s t e r m i x ( R o c h e A p p l i e d S c i e n c e 、 # 0 4 7 0 7 4 9 4 0 0 1 ) を調製した。表 6 。蛍光を収集しながら 6 0 ° C で 4 0 秒間伸長する、2 ステップ増幅反応を行った。表 6 。

【 0 2 1 9 】

フィットポイントアルゴリズム ( L I G H T C Y C L E R ( 登録商標 ) ソフトウェアリリース 1 . 5 ) および R E L A T I V E Q U A N T ( 商標 ) モジュール ( Δ Δ C t 方法に基づく ) を使用して蛍光シグナルがバックグラウンド閾値を交差する点である C p スコアを用いてリアルタイム P C R データの分析を行った。

【 0 2 2 0 】

【表 6】

表6.HPアッセイのためのプライマーおよびプローブ。

| 名称            | 配列                                    | プローブ    |
|---------------|---------------------------------------|---------|
| zmUbiLNK F    | TGCAGCAGCTATATGTGGATT ( 配列番号 15)      |         |
| zmUbiLNK R    | TCCATGGTGTCTGTGG ( 配列番号 16)           |         |
| zmUbiLNK-プローブ | AACAACAGGGTGAGCATCGAC ( 配列番号 17)      | FAM/BHQ |
| zmUbiV5LNK R  | TCCATTGTTGGATCCTCTAGAG ( 配列番号 27)     |         |
| GAADI F       | TGTCGGTTCCTCTACCAA ( 配列番号 18)         |         |
| GAADI R       | CAACATCCATCACCTTGACTGA ( 配列番号 19)     |         |
| GAADI-プローブ    | CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA ( 配列番号 20)   | FAM/MGB |
| IVF-Taq       | TGGCGGACGACGACTTGT ( 配列番号 21)         |         |
| IVR-TAQ       | AAAGTTTGGAGGCTGCCGT ( 配列番号 22)        |         |
| IV-Probe      | CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC ( 配列番号 23) | HEX/BHQ |
| SPC1S         | GACCGTAAGGCTTGATGAA ( 配列番号 24)        |         |
| SPC1A         | CTTAGCTGGATAACGCCAC ( 配列番号 25)        |         |
| TQSPC-プローブ    | CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA ( 配列番号 26)      | Cy5/BHQ |

【 0 2 2 1 】

【表 7】

表7.T<sub>0</sub>分析のための反応成分および条件。

| マスターミックス | 成分               | Amt (μL) | ストック  | 最終  |
|----------|------------------|----------|-------|-----|
|          | 2 X 緩衝液          | 5        | 2x    | 1x  |
|          | GOI フォワード        | 0.4      | 10 μM | 0.4 |
|          | GOI リバース         | 0.4      | 10 μM | 0.4 |
|          | GOI プローブ         | 0.4      | 5 μM  | 0.2 |
|          | IVF-TQ           | 0.4      | 10 μM | 0.4 |
|          | IVR-TQ           | 0.4      | 10 μM | 0.4 |
|          | IVP-TQ           | 0.4      | 5 μM  | 0.2 |
|          | H <sub>2</sub> O | 0.6      |       |     |
|          | DNA              | 2        |       |     |

| サーモサイクラー条件 |      |      |              |
|------------|------|------|--------------|
| 始動         | 95°C | 10 分 | サイクル = 40 収集 |
| 変性         | 95°C | 10 秒 |              |
| 伸長         | 60°C | 40 秒 |              |
| 冷却         | 40°C | 10 秒 |              |

| マスターミックス | 成分               | Amt (μL) | ストック  | 最終  |
|----------|------------------|----------|-------|-----|
|          | 2 X 緩衝液          | 5        | 2x    | 1x  |
|          | GOI フォワード        | 0.4      | 10 μM | 0.4 |
|          | GOI リバース         | 0.4      | 10 μM | 0.4 |
|          | GOI プローブ         | 0.4      | 5 μM  | 0.2 |
|          | IVF-TQ           | 0.4      | 10 μM | 0.4 |
|          | IVR-TQ           | 0.4      | 10 μM | 0.4 |
|          | IVP-TQ           | 0.4      | 5 μM  | 0.2 |
|          | H <sub>2</sub> O | 0.6      |       |     |
|          | DNA              | 2        |       |     |

| サーモサイクラー条件 |      |      |              |
|------------|------|------|--------------|
| 始動         | 95°C | 10 分 | サイクル = 40 収集 |
| 変性         | 95°C | 10 秒 |              |
| 伸長         | 60°C | 40 秒 |              |
| 冷却         | 40°C | 10 秒 |              |

## 【0222】

タンパク質抽出。バイオアッセイ収集日のうちにV3～V5期で植物葉組織をサンプリングした。2つの6mm径葉サンプルを96ウェルクラスターチューブラックに-80℃で分析日まで保存した。2つのDAISY（商標）スチールBBおよび300μL抽出用緩衝液（0.05%TWEEN（商標）20と5μL/mLプロテアーゼ阻害剤とを含有するPBS溶液（SIGMA（商標）カタログ番号9599）を各チューブに添加した。サンプルをKLECKO（商標）組織粉碎機で、最大設定で、3分間、サンプルを粉碎した。85μL NuPAGE（商標）変性サンプル緩衝液および15μL DTTを各サンプルチューブに添加した。サンプルを穏やかに混合し、5分間90℃で加熱し、その後、3,000rcfで遠心した。上清を除去し、同日に試験した。

## 【0223】

ウエスタンブロット生成。従来の電気泳動およびプロットティング方法（Gallagher et al. (2008) Curr. Prot. Immunol. 8(10):1-28）を、INVTROGEN（商標）デバイスおよび基礎試薬とともに使用した。ウサギ抗Cry1Abコア抗体が、化学発光検出システムとともに用いた一次抗体であった。

## 【0224】

定量的方法。この研究でC r y 1 A b 定量に使用したE L I S A は、C r y 1 A b 精製タンパク質を標準物質として使用する、E N V I R O L O G I X（商標）カタログ番号A P 0 0 3であった。

#### 【0225】

T<sub>0</sub> 昆虫バイオアッセイ。遺伝子導入植物からの葉の上の鱗翅目新生幼虫を用いて行ったバイオアッセイで、単一B t 遺伝子を含む遺伝子導入植物を殺虫活性について試験した。アッセイした鱗翅目種は、アワノメイガ、オストリニア・ヌビラリス・ヒュブナー（*Ostrinia nubilalis* Hubner）（E C B）、およびアメリカタバコガ幼虫、アメリカタバコガ（*Helicoverpa zea*）（C E W）であった。

#### 【0226】

32 ウェルトレイ（C-D International, Pitman, NJ）を2%寒天溶液で部分的に満たし、寒天を凝固させた。葉切片（およそ1インチ<sup>2</sup>）を各植物から採取し、32 ウェルトレイのウェルに個々に入れた。1葉片を各ウェルに入れ、2葉片を植物ごとにおよび昆虫ごとに試験した。絵筆を使用して10匹の新生幼虫を各ウェルに入れて、昆虫を大量に群がらせた。試験中の換気を可能にする穴の開いた粘着蓋でトレイを封止した。トレイを、28℃、40%RH、16:8時間の明期:暗期で3日間、置いておいた。試験期間の後、各葉片について損傷率スコアをつけた。各試験の損傷スコアを平均し、タンパク質発現分析と併用して相関分析を行った。

#### 【0227】

T<sub>1</sub> 種子生産。遺伝子コピー数、E L I S A によって測定したタンパク質発現レベル、葉バイオアッセイでの防護、および総合的植物健康状態に基づいて、3つすべてのバックグラウンドからの選択事象を次世代への進行用に特定した。スペクチノマイシン抵抗性遺伝子（S p e c R）を含む事象を必ずしも進行から外さなかったが、書き留めた。これらの事象を温室で試験したが、冬季苗床または圃場実験で使用した。

#### 【0228】

進行に選択した事象を18.92リットルのポットに移植した。定期的に観察記録を取ってあらゆる異常表現型を追跡した。トウモロコシの毛が出現する前に苗条用袋を苗条の上に配置して、散在する花粉による相互汚染を防止した。カバーをする前にトウモロコシの毛を生産した苗条を書き留め、苗条を除去した。その後、2番目の苗条にカバーをし、受粉に使用した。異常な苗条を生産したまたは苗条を生産しなかった植物をデータベースに記録した。トウモロコシの毛を受粉の前日に刈り込んで、花粉を受け入れるように均一にブラシがけした。自殖栽培品種B104からの花粉をすべての受粉に使用した。可能な場合には相反交配を行った。追跡目的で受粉情報をデータベースに記録した。受粉の21日後に穂を剥ぎ取ってドライダウンを増進し、その後、受粉の42日後に完全に収穫した（植物から穂を除去した）。穂を1週間、乾燥器内に置き、その後、種子を処理した（殻から取り出し、計数し、事前に印刷された封筒に包装した）。

#### 【0229】

表8は、上述のプロトコルで使用した様々な培地の成分を記載するものである。

#### 【0230】

10

20

30

【表 8】

表8.植物培地成分

| 成分                                | オートクレーブ<br>前または後     | 接種                       | 共培養         | 休止                      | 選択<br>I     | 選択<br>II |
|-----------------------------------|----------------------|--------------------------|-------------|-------------------------|-------------|----------|
| MS 塩                              | 前                    | 2.2 g/L                  | 4.33 g/L    | 4.33 g/L                | 4.33 g/L    | 4.33 g/L |
| スクロース                             | 前                    | 68.4 g/L                 | 30 g/L      | 30 g/L                  | 30 g/L      | 30 g/L   |
| グルコース                             | 前                    | 36 g/L                   |             |                         |             |          |
| MS 修飾<br>ビタミン                     | 後                    | 1 mL/L                   | 1 mL/L      | 1 mL/L                  | 1 mL/L      | 1 mL/L   |
| L-プロリン                            | 前                    | 115 mg/L                 | 700 mg/L    | 700 mg/L                | 700 mg/L    | 700 mg/L |
| カゼイン<br>酵素<br>加水分解物               | 前                    |                          | 100 mg/L    | 100 mg/L                | 100 mg/L    | 100 mg/L |
| MES                               | 前                    |                          |             | 500 mg/L                | 500 mg/L    | 500 mg/L |
| ジカンバp.t.<br>液                     | 前                    |                          | 3.3 mg/L    | 3.3 mg/L                | 3.3 mg/L    | 3.3 mg/L |
| pH                                |                      | 5.2                      | 5.8         | 5.8                     | 5.8         | 5.8      |
| NAA p.t.ストック                      | 前                    |                          |             |                         |             |          |
| ABA                               | 後                    |                          |             |                         |             |          |
| BA p.t. ストック                      | 前                    |                          |             |                         |             |          |
| IAA p.t. ストック                     | 後                    |                          |             |                         |             |          |
| アセトシリゴン<br>1 M                    | 後                    | 200 μM                   | 200 μM      |                         |             |          |
| 硝酸銀                               | 後                    |                          | 15 mg/L     | 15 mg/L                 | 15 mg/L     | 15 mg/L  |
| セフトキシム                            | 後                    |                          |             | 250 mg/L                | 250 mg/L    | 250 mg/L |
| ハロキシホップ                           | 後                    |                          |             |                         | 36.2 μg/L   | 181 μg/L |
| Sigma 寒天<br>A7921                 | 前                    |                          | 7.0 g/L     | 7.0 g/L                 | 7.0 g/L     | 7.0 g/L  |
| 滅菌                                |                      | フィルター                    | オートクレーブ     | オートクレーブ                 | システック       | システック    |
| オートクレーブ=20分/サイクル<br>システック=2分/サイクル |                      |                          |             |                         |             |          |
| 成分                                | オート<br>クレーブ<br>前または後 | 再生前<br>500 nM<br>ハロキシホップ | 再生前<br>選択なし | 再生 500<br>nM<br>ハロキシホップ | 再生前<br>選択なし | 芽伸長      |
| MS 塩                              | 前                    | 4.33 g/L                 | 4.33 g/L    | 4.33 g/L                | 4.33 g/L    | 4.33 g/L |
| スクロース                             | 前                    | 45 g/L                   | 45 g/L      | 60 g/L                  | 60 g/L      | 30 g/L   |
| グルコース                             | 前                    |                          |             |                         |             |          |
| MS 修飾<br>ビタミン                     | 後                    | 1 mL/L                   | 1 mL/L      | 1 mL/L                  | 1 mL/L      | 1 mL/L   |
| L-プロリン                            | 前                    | 350 mg/L                 | 350 mg/L    |                         |             |          |
| カゼイン<br>酵素<br>加水分解物               | 前                    | 50 mg/L                  | 50 mg/L     |                         |             |          |
| MES                               | 前                    | 500 mg/L                 | 500 mg/L    | 500 mg/L                | 500 mg/L    | 500 mg/L |
| ジカンバp.t.<br>液                     | 前                    |                          |             |                         |             |          |
| pH                                |                      | 5.8                      | 5.8         | 5.8                     | 5.8         | 5.8      |
| NAA p.t.ストック                      | 前                    | 0.5 mg/L                 | 0.5 mg/L    |                         |             |          |
| ABA                               | 後                    | 2.5 mg/L                 | 2.5 mg/L    |                         |             |          |
| BA p.t. ストック                      | 前                    | 1.0 mg/L                 | 1.0 mg/L    |                         |             |          |
| IAA p.t. ストック                     | 後                    |                          |             |                         |             |          |
| アセトシリゴン<br>1 M                    | 後                    |                          |             |                         |             |          |
| 硝酸銀                               | 後                    | 1.0 mg/L                 | 1.0 mg/L    |                         |             |          |
| セフトキシム                            | 後                    | 250 mg/L                 | 250 mg/L    | 125 mg/L                | 125 mg/L    |          |
| ハロキシホップ                           | 後                    | 181 μg/L                 |             | 181 μg/L                |             |          |
| Sigma 寒天<br>A7921                 | 前                    | 7.0 g/L                  | 7.0 g/L     | 7.0 g/L                 | 7.0 g/L     | 5.5 g/L  |
| 滅菌                                |                      | システック                    | システック       | システック                   | システック       | システック    |
| オートクレーブ=20分/サイクル<br>システック=2分/サイクル |                      |                          |             |                         |             |          |

【 0 2 3 1 】

結果および考察

形質転換の結果。形質転換頻度を各構築物について推定した。表9。各構築物の形質転換頻度は、いつでも単離できる植物を少なくとも1つ生産した事象数（全再生可能事象）をアグロバクテリウム（Agrobacterium）で感染させたすべての胚の合計（処理した全胚）で割ることによって推定した。加えて、表9は、試験した総数の中からの陰性のqPCR結果を有した植物の数を収載している。図2に示すように4.9%～30.0%の幅がある推定形質変換頻度の広い変動度が存在する。

【0232】

【表9】

**表9.個々の構築物各々についての推定形質転換頻度の要約。各構築物について少なくとも25の事象を生じさせた。**

| 構築物        | qPCRによって分析した植物の数 | ADD-1+かつCry1Ab-の植物の数 | ADD-1+かつCry1Ab-の植物の数 | 少なくとも1個の遺伝子について陰性の植物の数 | 全再生可能事象 | 処理した全胚 | 推定形質転換頻度 |
|------------|------------------|----------------------|----------------------|------------------------|---------|--------|----------|
| pDAB111447 | 34               | 1                    | 2                    | 3                      | 34      | 694    | 4.9%     |
| pDAB111448 | 25               | 0                    | 0                    | 0                      | 98      | 394    | 24.9%    |
| pDAB111449 | 28               | 0                    | 2                    | 2                      | 69      | 230    | 30.0%    |
| pDAB109812 | 7                | 1                    | 0                    | 1                      | 31      | 191    | 16.2%    |

【0233】

コピー数検出のためのqPCRアッセイ。加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子検出を、AAD-1遺伝子のコピー数を特定するために設計したリアルタイムPCRアッセイによって行った。3つの異なるDNA配列を実装したので、cry1Ab遺伝子は、加水分解プローブアッセイの標的ではなかった。その代わりに、すべてのバックグラウンドに存在するcry1Ab遺伝子カセットの領域を用いた。cry1Ab遺伝子の上流に位置し、ZmUbi1イントロン1の一部（クローニングを助長するポリリンカー、および翻訳開始部位の前にあるコザック配列）からなる領域を同定した。この領域の存在の確認は、cry1Ab遺伝子カセットの存在を示し、単にこの領域の存在または不在に過ぎず、コピー数の判定には使用しなかった。

【0234】

これら2つのアッセイ（AAD-1およびCry1Abリンカー）を内部参照アッセイインバーターゼ遺伝子で多重化して、gDNAが各アッセイに確実に存在するようにした。加えて、specR遺伝子の存在を同定するためにアッセイを設計して、どの事象を圃場試験での使用のために次世代に進めるべきかを判定した。この実験過程を通して、分子分析データを実装して、ネイティブ事象またはAAD-1遺伝子のコピーを3つ以上含有する事象を集団から除去し、cry1Ab遺伝子とAAD-1遺伝子の両方を有する低コピー事象のみをさらなる試験のためにCONVIRON（商標）および温室に進めた。バックグラウンドのすべてが、少なくとも20の低（1～2）コピー事象を生じさせた。しかし、pDAB111447バックグラウンドは、最高の単一コピー事象百分率（すなわち32.3%）を生じさせた。表10。

【0235】

10

20

30

## 【表 10】

**表10.**加水分解プローブアッセイを用いて、AAD-1に関してはコピー数決定のために、すべてのバックグラウンドに見られるトウモロコシユビキチンプロモーターと cry1Ab のATG開始の間のリンカー領域に関しては存在または不在について、specR 遺伝子に関しては存在または不在について、ならびにネイティブトウモロコシ遺伝子、インバターゼに関してはシグナルの相対強度について、事象を分析した。

| プラスミド      | 説明                      | % GC | 分析した<br>AAD-1/GOI<br>+/+事象 | 1コピー<br>事象の数 | 1コピー%             |
|------------|-------------------------|------|----------------------------|--------------|-------------------|
| pDAB111447 | IRDIG.1741.2<br>高 GC    | 59.5 | 31                         | 10           | 32.3              |
| pDAB111448 | IRDIG1471.3<br>Zmコドンの偏向 | 50.9 | 29                         | 4            | 13.8              |
| pDAB111449 | IRDIG1471.4<br>特許実施例    | 51.4 | 26                         | 7            | 26.9              |
| プラスミド      | LC事象の数<br>(PCR)         | % LC | HC事象の数<br>(PCR)            | SpecR        | % SpecR<br>バックボーン |
| pDAB111447 | 25                      | 80.6 | 6                          | 6            | 19.4              |
| pDAB111448 | 20                      | 69.0 | 5                          | 6            | 20.7              |
| pDAB111449 | 22                      | 84.6 | 4                          | 6            | 23.1              |

10

## 【0236】

20

タンパク質分析。3つのバックグラウンドの各々からの分子分析スクリーニングに合格した低コピー事象すべてを Cry1Ab タンパク質レベルについて分析した。高GCバックグラウンドである pDAB111447 は、他の2つのバックグラウンドと比較して、 $45.3 \text{ ng/cm}^2$  の値である Cry1Ab の有意に高い平均発現レベルを示した。トウモロコシのコドンに偏向があるバックグラウンドである pDAB111448 は、 $23.8 \text{ ng/cm}^2$  の平均発現を有し、米国特許出願公開第2012/026635号A1に記載されているタンパク質 (pDAB111449) は、 $5.8 \text{ ng/cm}^2$  の平均発現レベルを有した。各バックグラウンドからの  $T_0$  事象において検出された Cry1Ab タンパク質レベルの統計分析を図3に示し、表11に要約する。

## 【0237】

30

## 【表 11】

**表11.**Cry1Abタンパク質発現の定量的ELISA判定に含めた各バックグラウンドについての事象の数。異なるバックグラウンドからの $5.8 \sim 45.3 \text{ ng/cm}^2$ の幅がある平均発現。

| バックグラウンド   | 説明                       | 試験した事<br>象の数 | 平均発現<br>( $\text{ng/cm}^2$ ) |
|------------|--------------------------|--------------|------------------------------|
| pDAB111447 | IRDIG.1741.2<br>高 GC     | 25           | 45.3                         |
| pDAB111448 | IRDIG1471.3 Zm<br>コドンの偏向 | 18           | 23.8                         |
| pDAB111449 | IRDIG1471.4<br>特許実施例     | 21           | 5.8                          |

40

## 【0238】

各バックグラウンドから選択した事象に関してウェスタンブロットを完了して、タンパク質が安定しており、適正なサイズであることを保証した。完全長 Cry1Ab を含有する  $T_1$  対照 (pDAB107645)、ならびに pDAB111447、pDAB111448 および pDAB111449 からの  $T_0$  事象からのサンプルからなる代表ウェスタンブロットを図4に示す。切断型 Cry1Ab タンパク質を、20および18kDのサイズの分解産物とともに、各々のバックグラウンドからの事象において検出することがで

50

きた。完全長C r y 1 A b T<sub>1</sub> 対照がバイオアッセイにおいて活性であること、および抗体の検出レベルより低くC r y 1 A bを発現することは既知である。

【0239】

T<sub>0</sub> 事象のバイオアッセイの結果。p D A B 1 1 1 4 4 7、p D A B 1 1 1 4 4 8およびp D A B 1 1 1 4 4 9バックグラウンドを代表する事象からの葉材料をV5発育期で回収し、C E W、E C B、およびC r y 1 F a抵抗性アワノメイガ（r E C B）幼虫に曝露した。アッセイは3日にわたり、それらの葉材料がV5生育期に達したときT<sub>0</sub> 事象を評価した。その後、それらのサンプルを葉組織への損傷について等級分けした。図5～7は、C E W、E C Bおよびr E C Bについてのバイオアッセイの結果をそれぞれ含む。3つの構築物からの事象は、3種すべての有害生物に対して同等によく機能した。各々が、C E WおよびE C Bに対してH E R C U L E X（登録商標）対照と同様によく機能し、各々が、r E C Bに対して20%未満の葉損傷を有した。

10

【0240】

受粉。A A D - 1 分析によって判定して高度に発現する単一コピー事象であって、C r y 1 A b遺伝子カセットについて陽性であると判定もされた事象は、T<sub>1</sub> 世代への進行について考慮した。S p e c R遺伝子を含む事象は、進行プロセスから外した。各バックグラウンドからの10事象をT<sub>1</sub> 世代に進めた。それらの植物を相反様式でB 1 0 4 ドナー事象と交雑受粉して、T<sub>1</sub> 世代での評価のための種子を確実に回収した。T<sub>1</sub> 種子生産に進めた事象を表12に示す。

【0241】

20

【表 1 2】

**表12.T<sub>1</sub>種子生産に進めた各事象についてのデータの要約。すべての事象は、ZmUbi1-リンカーの検出には陽性であり、SpecRの検出には陰性であった。各事象をB104と交雑受粉した。**

| 対象物 ID            | AAD-1<br>v3コピー | Cry1Ab<br>ELISA<br>(ng/cm <sup>2</sup> ) | CEW<br>平均葉<br>損傷% | ECB<br>平均葉<br>損傷% | rECB<br>平均葉<br>損傷% |
|-------------------|----------------|------------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 111447[1]-010.001 | 1.3            | 49                                       | 3                 | 1                 | 1                  |
| 111447[1]-012.001 | 1.3            | 35                                       | 3                 | 1                 | 5                  |
| 111447[1]-023.001 | 1.5            | 45                                       | 5                 | 1                 | 3                  |
| 111447[1]-002.001 | 1.6            | 68                                       | 5                 | 1                 | 3                  |
| 111447[1]-003.001 | 1.6            | 63                                       | 5                 | 1                 | 3                  |
| 111447[1]-006.001 | 1.6            | 59                                       | 5                 | 3                 | 3                  |
| 111447[1]-007.001 | 1.7            | 45                                       | 1                 | 1                 | 1                  |
| 111447[1]-008.001 | 1.7            | 48                                       | 5                 | 1                 | 1                  |
| 111447[1]-013.001 | 1.8            | 51                                       | 3                 | 1                 | 1                  |
| 111447[1]-021.001 | 1.8            | 50                                       | 1                 | 1                 | 1                  |
| 111448[1]-022.001 | 1.0            | 29                                       | 3                 | 3                 | 7.5                |
| 111448[1]-021.001 | 1.1            | 23                                       | 5                 | 3                 | 5                  |
| 111448[1]-013.001 | 1.4            | 35                                       | 1                 | 1                 | 5                  |
| 111448[1]-015.001 | 1.5            | 27                                       | 5                 | 3                 | 5                  |
| 111448[1]-020.001 | 1.5            | 30                                       | 3                 | 1                 | 5                  |
| 111448[1]-002.001 | 1.6            | 20                                       | 5                 | 1                 | 3                  |
| 111448[1]-003.001 | 1.8            | 27                                       | 3                 | 1                 | 1                  |
| 111448[1]-030.001 | 1.9            | 43                                       | 5                 | 1                 | 5                  |
| 111448[1]-033.001 | 1.8            | 32                                       | 3                 | 1                 | 1                  |
| 111448[1]-032.001 | 1.9            | 34                                       | 5                 | 3                 | 5                  |
| 111449[1]-025.001 | 1.2            | 7.3                                      | 10                | 3                 | 10                 |
| 111449[1]-008.001 | 1.3            | 9.9                                      | 10                | 5                 | 5                  |
| 111449[1]-012.001 | 1.4            | 6.9                                      | 10                | 5                 | 3                  |
| 111449[1]-017.001 | 1.5            | 6.8                                      | 5                 | 3                 | 1                  |
| 111449[1]-020.001 | 1.5            | 13                                       | 10                | 1                 | 7.5                |
| 111449[1]-026.001 | 1.6            | 5                                        | 5                 | 1                 | 3                  |
| 111449[1]-027.001 | 1.7            | 9.3                                      | 5                 | 3                 | 5                  |
| 111449[1]-009.001 | 1.8            | 10                                       | 5                 | 1                 | 3                  |
| 111449[1]-023.001 | 1.8            | 7                                        | 5                 | 3                 | 5                  |
| 111449[1]-024.001 | 2.0            | 8.1                                      | 1                 | 5                 | 3                  |

【0 2 4 2】

結論

切断型Cry1Abタンパク質をコードするであろう複数のDNA配列を評価し、pDAB111447（ネイティブ遺伝子DNA組成で同定されたポリアダニル化配列の特異的セットを再構築遺伝子中の同一のヌクレオチド位置に含むようにさらに修飾されている）を予想以上に優れている遺伝子として同定した。この遺伝子を地上鱗翅目防除遺伝子スタックに用いることにする。様々なDNA設計方法論を含む、3つの異なるDNA配列を、T<sub>0</sub>世代のトウモロコシで評価した。DNA配列3つすべてを、Cry1Abタンパク質の発現のための同一成分からなるバイナリー植物形質転換プラスミドと組み合わせた。DNA配列自体のみを構築物間で変えた。

【0 2 4 3】

タンパク質発現には、T<sub>0</sub>集団における平均発現について、（pDAB111449バックグラウンドで観察された）5.8 ng/cm<sup>2</sup>という低レベルから、pDAB11144

7バックグラウンドで検出されたような45.3 ng/cm<sup>2</sup>という高レベルまで幅があった。このように、pDAB11447は8倍増加をもたらす。個々の事象を記録して、pDAB11447バックグラウンドで68 ng/cm<sup>2</sup>ほどの多い量でCry1Abタンパク質を発現させた。pDAB11447は、他の2つのバックグラウンドと比較して最大百分率の単一コピー事象も生じさせた。しかし、pDAB11447での形質転換効率は、他の2つのバックグラウンド（両方とも約25%）と比較して、はるかに低かった（4.5%）。

#### 【0244】

pDAB11447バックグラウンドからの事象で測定されたCry1Abタンパク質の総合的発現、ならびに昆虫葉バイオアッセイにおけるCEW、ECBおよびrECBに対する活性は、地上鱗翅目有害生物遺伝子スタックに対してこのDNA配列を進展させる上で肝要な因子であった。このバージョンの切断型Cry1Abをいくつかの例示的遺伝子スタックのCry1Fa遺伝子と組み合わせることにする。

#### 【実施例2】

#### 【0245】

切断型Cry1Faタンパク質をコードする複数のDNA配列のT<sub>0</sub>トウモロコシにおける遺伝子発現に対する影響についての評価

この実験は、同一の切断型Cry1Faタンパク質をコードする11の異なるDNA配列を評価した。異なる11バージョンの切断型cry1Fa遺伝子を均一バイナリー植物形質転換ベクターで試験した。同じ選択可能マーカーカセットを有する同一遺伝子発現カセットにこれらの遺伝子をクローニングした。各プラスミドの唯一の変要素は、切断型Cry1Faタンパク質をコードする実際のDNA配列である。

#### 【0246】

##### 材料および方法

合成Cry1Fa遺伝子の設計。この研究で使用した切断型Cry1Faタンパク質は、ネイティブCry1Fa完全長タンパク質の位置1～605で見られるものに対応するアミノ酸からなる。アミノ酸1～605をコードする切断型のネイティブcry1Fa遺伝子を16の別個のポリアデニル化配列の存在について分析した。表13。これらの22配列の場所および組成を記録し、そのような場所および組成を、評価するcry1Fa切断型遺伝子配列の設計に含めた。

#### 【0247】

11の異なるcry1Fa遺伝子を設計して、異なる再設計仮説を試験した。既存バージョンのcry1Faは、トウモロコシのコドンに偏向のある配列と、植物のコドンに偏向のある配列2つと、米国特許出願公開第2012/0266335号A1に記載のものとを含む。各バージョンのcry1Fa遺伝子を、アミノ酸1～605からなる対応するタンパク質を生じさせるようにトリミングし、ネイティブ遺伝子で見られる上述の22のポリアデニル化配列を含むようにDNA組成を変更した。

#### 【0248】

いくつかの新たなバージョンの遺伝子を設計して、異なる再設計仮説を試験した。OPTGENE（商標）2.0ソフトウェア（Ocimum Biosolutions、Banjara Hills Hyderabad、India）を使用して、Cry1Faコア毒素をコードする野生型DNA配列に対応するアミノ酸配列に翻訳し、その後、各アミノ酸の最優先コドンを使用して逆翻訳した。得られたDNA配列を分析し、必要に応じて、表13で識別される配列を回復するように、不必要なオープンリーディングフレームを除去するように、および不必要な制限部位を除去するように、コドンを置換した。G+CおよびA+Tの伸長した並びをこの初期遺伝子設計では無視した。アミノ酸配列を保存し、得られたDNA配列を本明細書では「IRDIG.586.34」と呼ぶ。IRDIG.586.34を、可能な場合にはG+CコドンまたはA+Tコドンいずれかの連続鎖を壊すような塩基の置換によってさらに修飾して、6塩基以上伸長しているG+CおよびA+Tの並びを除去した。前と同様に、アミノ酸配列組成を保存した。得られたDNA

10

20

30

40

50

配列を本明細書では「I R D I G. 5 8 6. 3 5」と呼ぶ。

【0 2 4 9】

既存のトウモロコシのコドンに偏向のあるc r y 1 F a遺伝子を、アミノ酸配列を保存しながら表1 3で識別される配列を回復することによって修飾した。得られたDNA配列を本明細書では「I R D I G. 5 8 6. 3 6」と呼ぶ。DNAを分析し、必要に応じて、不必要なオープンリーディングフレームを除去するようにおよびアミノ酸配列を保存しながら不必要な制限部位を除去するようにコドンを変更することによって、I R D I G 5 8 3. 3 6をさらに修飾した。得られたDNA配列を本明細書では「I R D I G. 5 8 6. 3 7」と呼ぶ。

【0 2 5 0】

既存の植物のコドンに偏向のある2バージョンのc r y 1 F a遺伝子を、この場合もやはり表1 3で識別される配列を回復させることによって修飾した。各々のアミノ酸配列を保存した。得られたDNA配列を本明細書では「I R D I G. 5 8 6. 3 8」および「I R D I G. 5 8 6. 4 2」とそれぞれ呼ぶ。DNAを分析し、必要に応じて、不必要なオープンリーディングフレームを除去するようにおよび不必要な制限部位を除去するようにコドンを変更することによって、I R D I G. 5 8 6. 3 8をさらに修飾した。アミノ酸配列を保存した。得られたDNA配列を本明細書では「I R D I G. 5 8 6. 3 9」と呼ぶ。

【0 2 5 1】

米国特許出願公開第2 0 1 2 / 0 2 6 6 3 3 5号A 1に記載されている切断型C r y 1 F a配列を比較のために用いた。この配列を本明細書では「I R D I G. 5 8 6. 4 0」と呼ぶ。コードされた産物のアミノ酸配列を保存しながらG + CコドンまたはA + Tコドンいずれかの連続鎖を壊すような塩基の置換によってI R D I G. 5 8 6. 4 0をさらに修飾して、6塩基以上伸長しているG + CおよびA + Tの並びを除去した。得られたDNA配列を本明細書では「I R D I G. 5 8 6. 4 1」と呼ぶ。

【0 2 5 2】

各コドンが平均トウモロコシ遺伝子に存在するレベルに対応するアミノ酸コドン分布表を使用する逆翻訳によって、さらなる配列を特異的に設計した。低頻度コドン（すなわち、1 0 %以下存在するコドン）は含めなかった。得られたDNA配列を分析し、必要に応じて、不必要なオープンリーディングフレームを除去するように、不必要な制限部位を除去するように、表1 3で識別される配列を回復するように、および可能な場合は伸長されたG + CおよびA + Tの並びを除去するようにコドンを変更した。得られたDNA配列を本明細書では「I R D I G. 5 8 6. 4 3」と呼ぶ。

【0 2 5 3】

10

20

30

【表 1 3】

**表13.**この実験で評価した再構築遺伝子に含めたネイティブcry1Fa遺伝子に見られる配列。ヌクレオチド位置426および582で開始するネイティブ遺伝子に見られるAATAAA配列を、再構築遺伝子の同じ場所でAATCAAに変更した。

| 配列     | ネイティブ<br>Cry1Ab中の<br>部位の数 | ネイティブ<br>Cry1Ab中の<br>場所 | IRDIG.586.43<br>-<br>IRDIG.586.34 | 再設計<br>Cry1Fa中の<br>場所 |
|--------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| AATAAA | 2                         | 426, 582                | 0                                 | -                     |
| AATAAT | 5                         | 7, 46, 358, 430, 562    | 5                                 | 7, 46, 358, 430, 562  |
| AACCAA | 0                         | -                       | 0                                 | -                     |
| ATATAA | 1                         | 1520                    | 1                                 | 1520                  |
| AATCAA | 2                         | 19, 628                 | 4                                 | 19, 426, 582, 628     |
| ATACTA | 1                         | 1508                    | 1                                 | 1508                  |
| ATAAAA | 0                         | -                       | 0                                 | -                     |
| ATGAAA | 2                         | 314, 1211               | 2                                 | 314, 1211             |
| AAGCAT | 0                         | -                       | 0                                 | -                     |
| ATTAAT | 2                         | 579, 1690               | 2                                 | 579, 1690             |
| ATACAT | 0                         | -                       | 0                                 | -                     |
| AAAATA | 0                         | -                       | 0                                 | -                     |
| ATTAAA | 2                         | 66, 1266                | 2                                 | 66, 1266              |
| AATTAA | 2                         | 368, 779                | 2                                 | 368, 779              |
| AATACA | 3                         | 400, 1369, 1693         | 3                                 | 400, 1369, 1693       |
| CATAAA | 0                         | -                       | 0                                 | -                     |
| 合計     | 22                        |                         | 22                                |                       |

【0 2 5 4】

異なる11バージョンの切断型cry1Fa遺伝子を総計G+C含有量について評価した。総計には、IRDIG.586.38での46.9%G+Cという低レベルからIRDIG.568.36での64.1%G+Cという高レベルまで幅があった。HERCULES（登録商標）Cry1Fa遺伝子（すなわち「Cry1F trunc HX」）を含めて、各バージョンの遺伝子のG+C含有量は、表14で見つけられる。

【0 2 5 5】

【表 1 4】

**表14.11の異なるバージョンのCry1Fa各々についてのG+C含有**

| Cry1Fa配列       | G+C含有量 |
|----------------|--------|
| IRDIG.568.34   | 61.40% |
| IRDIG.568.35   | 59.80% |
| IRDIG.568.36   | 64.10% |
| IRDIG.568.37   | 60.80% |
| IRDIG.568.38   | 46.90% |
| IRDIG.568.39   | 48.30% |
| IRDIG.568.40   | 48.70% |
| IRDIG.568.41   | 49.10% |
| IRDIG.568.42   | 48.50% |
| IRDIG.568.43   | 53.80% |
| Cry1F trunc Hx | 48.50% |

## 【0256】

上に記載した10の切断型c r y 1 F a遺伝子（I R D I G. 5 6 8. 3 4～I R D I G. 5 6 8. 4 3）の各々を合成した（D N A 2. 0 ; M e n l o P a r k、C A）。

## 【0257】

植物発現ベクター構築。c r y 1 F a発現カセットを含有するエントリーベクターの構築には標準的クローニング方法を用いた。例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup>Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい。c r y 1 F a発現カセットを含有するアグロバクテリウム（Agrobacterium）バイナリープラスミドを、G A T E W A Y（登録商標）（I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A）を用いて工学的に作製し、アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介植物形質転換に使用した。制限エンドヌクレアーゼはN e w E n g l a n d B i o L a b s（NEB（商標）；I p s w i c h、M A）から入手し、T 4 D N A リガーゼ（I n v i t r o g e n）をD N A ライゲーションに使用した。P C R増幅は、I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s I n c（I D T（商標）、C o r a l v i l l e、I A）によって合成されたP H U S I O N（商標）H i g h - F i d e l i t y D N A P o l y m e r a s e（NEB）およびプライマーを使用して行った。1つのエントリーベクターと1つのディスティネーションベクターをアセンブルするためにG A T E W A Y（登録商標）L R C L O N A S E（登録商標）酵素ミックス（I n v i t r o g e n）を使用してG A T E W A Y（登録商標）反応を行った。プラスミド調製は、N U C L E O S P I N（登録商標）P l a s m i d K i t（M a c h e r e y - N a g e l I n c.、B e t h l e h e m、P A）またはP l a s m i d M i d i K i t（Q I A G E N）を供給業者の説明書に従って使用して行った。アガローストリスー酢酸ゲル電気泳動後にQ I A Q U I C K（登録商標）G e l E x t r a c t i o n K i t（Q I A G E N）を使用してD N A断片を単離した。

## 【0258】

上述のD N A設計によるC r y 1 F aをコードする10の合成遺伝子をプラスミドD A S D N A 4 2 6～D A S D N A 4 3 5において得た。B a m H I / S a c I断片のZ m U b i 1プロモーターとZ m P e r 5 3'非翻訳領域（3'UTR）の間のp D A B 1 0 1 5 5 7への各合成c r y 1 F a遺伝子の挿入で植物発現ベクター構築を開始して、エントリーベクターp D A B 1 1 1 4 2 4～p D A B 1 1 1 4 4 3をそれぞれ生成した。G A T E W A Y（登録商標）技術を用いて、エントリーベクターp D A B 1 1 1 4 2 4～p D A B 1 1 1 4 3 3各々を、選択可能マーカーカセットS C B V（M A M）プロモーターv 2 / A A D - 1 v 3 / Z m L i p 3'UTR v 1を含有するディスティネーションベクターp D A B 1 0 9 8 0 5と組み換えて、最終バイナリーベクターp D A B 1 1 1 4 3 4～p D A B 1 1 1 4 4 3をそれぞれ創製した。

## 【0259】

2つのさらなる植物発現ベクターを、p M Y C 2 4 0 5からの切断型c r y 1 F a遺伝子を用いてアセンブルした。これらのうちの第1のものは、プライマーp M Y C 2 4 0 5 F（G A T C A T A C C A T G G A G A A C A A C A T A C A G A A T C A G T G C；配列番号28）およびp M Y C 2 4 0 5 R（G A T C T C G A G C T C G C G A A A G C T T G G C；配列番号29）を用いてp M Y C 2 4 0 5からP C R増幅したc r y 1 F a含有断片を含んだ。その1869bp増幅断片をN c o I / S a c Iで消化し、p D A B 1 0 1 5 5 7に挿入してエントリーベクターp D A B 1 1 0 8 3 0を創製し、その後、G A T E W A Y（登録商標）技術を用いてエントリーベクターをディスティネーションベクターp D A B 1 0 9 8 0 5と組み換えてp D A B 1 1 0 8 3 9を創製した。p M Y C 2 4 0 5からのS a c I平滑末端化E c o R I断片をp D A B 1 1 0 8 3 1に挿入してエントリーベクターp D A B 1 1 0 8 3 3を創製することによって、最終プラスミドをアセンブルした。p D A B 1 1 0 8 3 3およびp D A B 1 0 9 8 0 5とのG A T E W A Y（登録商標）組み換え反応は、p D A B 1 1 0 8 4 2をもたらした。

## 【0260】



$2 \text{ s}^{-1}$  の光強度で、14日間、インキュベートした。

#### 【0265】

この時期に、抵抗性カルスを予備再生培地に移動した。9以下のカルスを予備再生の各プレートに移動した。プレートに3Mマイクロポアテープを巻きつけ、 $27^\circ\text{C}$ で、明期24時間/日で、おおよそ $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光強度で、7日間、インキュベートした。その後、再生中のカルスをPHYTATRAYS（商標）の中の再生培地に移し、 $25.5^\circ\text{C}$ で、1日16時間明期/8時間暗期で、おおよそ $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光強度で7～14日間、または芽が出るまでインキュベートした。6以下のカルスを各PHYTATRAY（商標）に入れた。その後、小さい芽を一次根とともに単離し、芽/根用の培地に移した。約6cm以上の高さの根付いた小植物を土壌に移植し、栽培箱に入れた。

10

#### 【0266】

$T_0$  植物の温室への移転および温室内での定着。遺伝子導入植物に固有の識別子（事象ごとに1植物）を割り当て、定期的に温室に移した。植物をPHYTATRAY（商標）から、成長培地（Premier Tech Horticulture、Promix BX、0581P）を満たした小さいポット（T. O. Plastics、3.5" SVD、700022C）に移植し、ヒューミドーム（humidome）を被せて、温室環境（照光タイプ：フトライトまたは同化ライト；ハイトリミット：1200PAR；昼の長さ16時間；昼 $27^\circ\text{C}$ /夜 $24^\circ\text{C}$ ）への植物の気候順化を助長した。

#### 【0267】

ゲノムDNA単離、qPCR（表7参照）、タンパク質抽出、ウェスタンブロット生成、および定量的分析は、実質的に実施例1に記載の通りに行った。

20

#### 【0268】

$T_1$  種子生産。遺伝子コピー数、ELISAによって測定したタンパク質発現レベル、および総合的植物健康状態に基づいて、12のプラスミドの各々を含有する選択事象を次世代への進行に選択した。SpecR遺伝子を含有する事象は、温室で試験したが、冬季苗床または圃場実験には使用しなかった。進行に選択した事象を18.92リットルのポットに移植した。定期的に観察記録を取ってあらゆる異常表現型を追跡した。トウモロコシの毛が出現する前に苗条用袋の上に配置して、散在する花粉による相互汚染を防止した。カバーをする前にトウモロコシの毛を生産した苗条を書き留め、苗条を除去した。その後、2番目の苗条にカバーをし、受粉に使用した。異常な苗条を生産したまたは苗条を生産しなかった植物をデータベースに記録した。トウモロコシの毛を受粉の前日に刈り込んで、花粉を受け入れるように均一にブラシがけした。自殖栽培品種B104からの花粉をすべての受粉に使用した。可能な場合には相反交配を行った。追跡目的で受粉情報を記録した。受粉の21日後に穂を剥ぎ取ってドライダウンを増進し、その後、受粉の42日後に完全に収穫した（植物から穂を除去した）。穂を1週間、乾燥器内に置き、その後、種子を処理した（殻から取り出し、計数し、事前に印刷された封筒に包装した）。

30

#### 【0269】

結果および考察

形質転換。各構築物の形質転換効率を計算し、表16にまとめた。4%～23%の幅がある形質変換頻度の広い変動度が存在する。pDAB111434およびpDAB111436バックグラウンドは、最低形質転換効率（それぞれ5%および4%）を有したが、pDAB111435およびpDAB110839バックグラウンドは、（各々23%に達する）最高形質転換率を示した。pDAB111436およびpDAB111437から出芽した小植物は、芽および葉の変色、ならびに葉および茎の上偏生長を明示した。図9。これらの事象の大部分は生残せず、分子分析によって分析しなかった。

40

#### 【0270】

【表 16】

**表16.**個々のプラスミド各々についての(AAD-1に対して調整した)形質転換頻度の要約。バックグラウンド各々について少なくとも25の事象を生じさせた。しかし、pDAB11436バックグラウンドからの多くの小植物は、赤色素沈着を含有し、茎および葉の萎縮を明示し、分析に進めるには不十分な健康状態であった。

| 構築物            | qPCRによって分析した植物の数 | ADD-1-の植物の数 | 全再生可能事象 | 処理した全胚 | 形質転換頻度 (AAD-1に対して調整) |
|----------------|------------------|-------------|---------|--------|----------------------|
| pDAB110839     | 37               | 0           | 115     | 504    | 23%                  |
| pDAB110842     | 45               | 0           | 73      | 520    | 14%                  |
| pDAB111434     | 35               | 0           | 38      | 718    | 5%                   |
| pDAB111435     | 40               | 0           | 116     | 504    | 23%                  |
| pDAB111436     | 22               | 0           | 25      | 572    | 4%                   |
| pDAB111437     | 32               | 0           | 52      | 504    | 10%                  |
| pDAB111438     | 34               | 3           | 44      | 500    | 9%                   |
| pDAB111439     | 39               | 2           | 66      | 724    | 9%                   |
| pDAB111440     | 30               | 0           | 54      | 504    | 11%                  |
| pDAB111441     | 31               | 0           | 34      | 504    | 7%                   |
| pDAB111442     | 36               | 1           | 91      | 504    | 18%                  |
| pDAB111443     | 29               | 1           | 53      | 504    | 11%                  |
| 合計             | 410              | 7           | 761     | 6562   | 12                   |
| pDAB10981 (対照) | 7                | 0           | 50      |        | 25                   |

## 【0271】

様々なcry1F含有バックグラウンドを比較して、形質転換に対して及ぼしたDNA配列の効果の統計的有意性を判定した。生じたイベントの数を、処理した胚の総数の百分率として比較して、形質転換頻度を生成した。JMP（商標）統計ソフトウェアを使用して状況変異分析を完了することにより、バックグラウンドpDAB111435、pDAB110839およびpDAB111442を、0.05有意性レベルで、形質転換頻度について統計的に同等であると判定した。pDAB110842、pDAB111440、pDAB111443、pDAB111437、pDAB111438およびpDAB111439に関する形質転換頻度は、すべて統計的に同等であった。加えて、pDAB111441、pDAB111434およびpDAB111436は、すべて、最低形質転換頻度をもたらすDNA配列と統計的に同等であった。

## 【0272】

コピー数検出のためのqPCRアッセイ。加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子検出をリアルタイムPCRによって行った。AAD-1遺伝子のコピー数を特定するためにアッセイを設計した。11の異なるDNA配列を用いたので、cry1Fa遺伝子は、加水分解プローブアッセイの標的ではなかった。その代わりに、すべてのバックグラウンドに存在するcry1Fa遺伝子カセットの領域を用いた。cry1Fa遺伝子の上流に位置し、ZmUbi1イントロン1の一部（クローニングを助長するポリリンカー、および翻訳開始部位の前にあるコザック配列）からなる領域を同定した。この領域の存在の確認は、cry1Fa遺伝子カセットの存在を示し、コピー数の判定には使用しなかった。これら2つのアッセイ（AAD-1およびCry1Faリンカー）を内部参照アッセイインバーターゼ遺伝子で多重化して、gDNAが各アッセイに確実に存在するようにした。加えて、speR遺伝子の存在を同定するためにアッセイを設計して、どの事象を圃場試験での使用のために次世代に進めるべきかを判定した。ネイティブ事象、およびAAD

－1 遺伝子のコピーを3つ以上含有する事象を、集団から除去し、c r y 1 F a 遺伝子と A A D－1 遺伝子の両方を有する低コピー事象のみをさらなる試験のために C O N V I R O N（商標）および温室に進めた。表17は、各バックグラウンドからの事象に関して行った分析の要約を含む。

【0273】

p D A B 1 1 1 4 3 5 バックグラウンドからの事象（形質転換頻度23%）は、最高の単一コピーおよび低コピー事象率（それぞれ51.4%および91.9%）も有し、事象の24%は、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子についての試験で陽性であった。p D A B 1 1 1 4 3 6 は、最低単一コピー事象百分率（5.3%；1事象）を有し、バックボーン汚染のある事象の百分率も最高であった（52.6%）。

10

【0274】

【表 17】

**表17.**加水分解プローブアッセイを用いて、AAD-1に関してはコピー数決定のために、すべてのバックグラウンドで見られるトウモロコシユビキチンプロモーターとcry1FaのATG開始の間のリンカー領域に関しては存在または不在について、specR遺伝子に関しては存在または不在について、ならびにネイティブトウモロコシ遺伝子、インバーターゼ、に関してはシグナルの相対強度について、事象を分析した。

| プラスミド      | 説明                | % GC  | 分析した<br>AAD-1/GOI<br>+/+事象 | 1コピー<br>事象の数 | 1コピー<br>%             |
|------------|-------------------|-------|----------------------------|--------------|-----------------------|
| pDAB110839 | Cry1Fa HX 遺伝子     | 48.5% | 36                         | 11           | 30.6%                 |
| pDAB110842 | Cry1Fa HX<br>カセット | 48.5% | 42                         | 8            | 19.0%                 |
| pDAB111434 | IRDIG.586.34      | 61.4% | 31                         | 10           | 32.3%                 |
| pDAB111435 | IRDIG.586.35      | 59.8% | 37                         | 19           | 51.4%                 |
| pDAB111436 | IRDIG.586.36      | 64.1% | 19                         | 1            | 5.3%                  |
| pDAB111437 | IRDIG.586.37      | 60.8% | 37                         | 5            | 13.5%                 |
| pDAB111438 | IRDIG.586.38      | 46.9% | 30                         | 7            | 23.3%                 |
| pDAB111439 | IRDIG.586.39      | 48.3% | 33                         | 5            | 15.2%                 |
| pDAB111440 | IRDIG.586.40      | 48.7% | 26                         | 5            | 19.2%                 |
| pDAB111441 | IRDIG.586.41      | 49.1% | 27                         | 6            | 22.2%                 |
| pDAB111442 | IRDIG.586.42      | 48.5% | 32                         | 7            | 21.9%                 |
| pDAB111443 | IRDIG.586.43      | 53.8% | 23                         | 2            | 8.7%                  |
| 合計         |                   | -     | 373                        | 86           | 23%                   |
| pDAB109812 | ZmUbi1/PhiYFP     | -     | 6                          | 2            | 33.3%                 |
| プラスミド      | LC事象の数<br>(PCR)   | % LC  | HC事象の<br>数<br>(PCR)        | SpecR        | % SpecR<br>バック<br>ボーン |
| pDAB110839 | 33                | 91.7% | 3                          | 7            | 19.4%                 |
| pDAB110842 | 35                | 83.3% | 7                          | 3            | 7.1%                  |
| pDAB111434 | 25                | 80.6% | 6                          | 4            | 12.9%                 |
| pDAB111435 | 34                | 91.9% | 3                          | 9            | 24.3%                 |
| pDAB111436 | 15                | 78.9% | 4                          | 10           | 52.6%                 |
| pDAB111437 | 23                | 62.2% | 9                          | 12           | 32.4%                 |
| pDAB111438 | 25                | 83.3% | 5                          | 2            | 6.7%                  |
| pDAB111439 | 23                | 69.7% | 10                         | 3            | 9.1%                  |
| pDAB111440 | 21                | 80.8% | 5                          | 12           | 46.2%                 |
| pDAB111441 | 22                | 81.5% | 5                          | 6            | 22.2%                 |
| pDAB111442 | 22                | 68.8% | 3                          | 6            | 18.8%                 |
| pDAB111443 | 20                | 87.0% | 3                          | 9            | 39.1%                 |
| 合計         | 298               | 80%   | 63                         | 83           | 22%                   |
| pDAB109812 | 5                 | 83.3% | 1                          | 2            | 33.3%                 |

【0275】

様々なcry1F含有バックグラウンドを比較して、単一コピー事象の発生に対するDNA配列の効果の統計的有意性を判定した。加水分解プローブアッセイによって測定してAAD-1の単一コピーを含有した事象の数を、全事象数の百分率として比較し、JMP（商標）統計ソフトウェアを使用して状況変異分析を完了した。状況変異分析により、バックグラウンドpDAB111435、pDAB110839、pDAB111434、pDAB111438、pDAB111441およびpDAB111442によって生じた1コピー事象の数は、1コピー事象の百分率に51.4%~21.9%の幅があるとはいえ、有意性レベル0.05で統計的に同等であった。

【0276】

10

20

30

40

50

タンパク質分析。12のバックグラウンドの各々からの分子分析スクリーニングに合格した低コピー事象すべてを定量的Cry1Fa ELISAアッセイによってタンパク質発現について評価した。図10は、12のバックグラウンドの各々からの事象の平均タンパク質発現を示す。温室内でのHERCULEX（登録商標）におけるCry1Fa発現レベルは、 $60\text{ ng/cm}^2$ であると判定された。バックグラウンドのうちの2つ（pDAB111434およびpDAB111435）は、 $T_0$ 事象のすべてについてHERCULEX（登録商標）のものと同等である平均発現レベルをもたらしたが、いくつかの事象は、相当高いレベルでCry1Faを発現した。HERCULEX（登録商標）バージョンのCry1FaおよびHERCULEX（登録商標）遺伝子カセットをそれぞれ含有するpDAB110839およびpDAB110842バックグラウンドは、それぞれ $43.8\text{ ng/cm}^2$ および $45.1\text{ ng/cm}^2$ の平均Cry1Fa発現レベルをもたらした。他のすべてのバックグラウンドからの $T_0$ 事象についての平均Cry1Fa発現レベルは、pDAB110839およびpDAB110842について見られたものより低かったが、pDAB111437、pDAB111438およびpDAB111439からの特異的事象は、 $60\text{ ng/cm}^2$ より高い発現レベルであると判定された。表18。

【0277】

【表18】

**表18.** $4\text{ ng/cm}^2 \sim 62.8\text{ ng/cm}^2$ の幅がある、様々なバックグラウンドからのCry1Faタンパク質発現のELISA判定。

| バックグラウンド   | 説明            | 試験した事象の数 | 平均発現 ( $\text{ng/cm}^2$ ) |
|------------|---------------|----------|---------------------------|
| pDAB110839 | Cry1Fa HX遺伝子  | 33       | 43.8                      |
| pDAB110842 | Cry1Fa HXカセット | 35       | 45.1                      |
| pDAB111434 | IRDIG.586.34  | 25       | 62.6                      |
| pDAB111435 | IRDIG.586.35  | 33       | 60.8                      |
| pDAB111436 | IRDIG.586.36  | 16       | 30                        |
| pDAB111437 | IRDIG.586.37  | 21       | 36.2                      |
| pDAB111438 | IRDIG.586.38  | 25       | 38.6                      |
| pDAB111439 | IRDIG.586.39  | 23       | 38                        |
| pDAB111440 | IRDIG.586.40  | 21       | 4                         |
| pDAB111441 | IRDIG.586.41  | 22       | 8.5                       |
| pDAB111442 | IRDIG.586.42  | 29       | 19.1                      |
| pDAB111443 | IRDIG.586.43  | 20       | 17                        |
| 合計         |               | 303      | 33.6                      |

【0278】

各バックグラウンドから選択した事象に関してウェスタンブロットを完了して、タンパク質が安定しており、適正なサイズであることを保証した。HERCULEX（登録商標）対照を含めて、殆どのバックグラウンドからの事象で、2つの異なるタンパク質バンドを検出することができた。大きい方のバンド（ $68\text{ kDa}$ ）は、切断型Cry1Faタンパク質に対応し、小さい方の産物（ $66\text{ kDa}$ ）は、完全にプロセシングされた活性Cry1Faコア毒素に対応する。pDAB111434およびpDAB111435事象からのサンプルからなる代表ウェスタンブロットを図11に提供する。

【0279】

受粉。AAD-1 PCR分析によって判定して高度に発現する単一コピー事象であって、cry1Fa遺伝子カセットについて陽性であると判定もされた事象は、 $T_1$ 世代への進行について考慮した。殆どのバックグラウンドに関して、specR遺伝子を含む事象を外した。しかし、バックグラウンドpDAB111437、pDAB111442およびpDAB111443では、specRのない単一コピー事象が十分になかったため、各バックグラウンドからspecRを含む事象を1つだけ含めた。これらの事

象からの植物は、いずれのタイプの圃場試験にも含めず、温室での試験に限定した。加えて、p D A B 1 1 1 4 3 6 バックグラウンドには利用可能な1コピー事象が1つしかなく、そのため4つの多コピー事象を進行に選択した。他の状況では、各バックグラウンドから5事象を、相反様式でB 1 0 4 ドナー事象との交雑受粉のためにT<sub>1</sub>世代に進めた。

### 【0280】

#### 結論

切断型C r y 1 F a タンパク質をコードするであろう複数のDNA配列を評価して、c r y 1 F a DNA配列を予想以上に優れている遺伝子として同定した。この遺伝子を地上鱗翅目防除遺伝子スタックに用いることにする。様々なDNA設計方法論を含む、11の異なるDNA配列を、T<sub>0</sub>世代のトウモロコシで評価した。11のDNA配列すべてを、C r y 1 F a タンパク質の発現のための同一成分からなるバイナリー植物形質転換プラスミドと組み合わせた。DNA配列自体のみを変えた。

### 【0281】

いくつかのパラメータがc r y 1 F a DNA配列による影響を受けた。タンパク質発現には、T<sub>0</sub>集団における平均発現について、(p D A B 1 1 1 4 4 0 バックグラウンドで観察された)  $4 \text{ ng/cm}^2$  という低レベルから、発現の15倍増加を表す  $62.6 \text{ ng/cm}^2$  (p D A B 1 1 1 4 3 4 バックグラウンド) という高レベルまで幅があった。個々の事象を記録して、p D A B 1 1 1 4 3 4 バックグラウンドとp D A B 1 1 1 4 3 5 バックグラウンドの両方で  $120 \text{ ng/cm}^2$  ほどの多量のC r y 1 F a タンパク質を発現させた。形質転換頻度は、それぞれ、4% (p D A B 1 1 1 4 3 6) ~ 23% (p D A B 1 1 0 8 3 9 と p D A B 1 1 1 4 3 5 の両方) の幅があった。形質転換頻度のこの差は、統計的に有意であった。選択に関する別の因子は、品質事象、特に、c r y 1 F a 遺伝子カセットの単一コピーを有する事象の数である。単一コピー事象を有するバックグラウンドには、それぞれ、5% (p D A B 1 1 1 4 3 6) ~ 51% (p D A B 1 1 1 4 3 5) の幅があった。形質転換頻度、DNAコピー数(高品質事象)およびタンパク質発現についてのこの広い範囲は、さらなるスタッキング実験に進めるための単一バックグラウンドの同定のための3つのはっきりと区別できる領域をもたらした。

### 【0282】

p D A B 1 1 1 4 3 4 および p D A B 1 1 1 4 3 5 バックグラウンドからの事象で測定されたC r y 1 F a タンパク質の総合的発現は、他のバックグラウンドより大きかった。さらに、2つのバックグラウンドの各々は、最高C r y 1 F a タンパク質発現レベルを有する個々の事象を有した。これら2つのバックグラウンドからのDNA配列は非常に類似している。p D A B 1 1 1 4 3 4 からのDNA配列を、6塩基以上であるG + CおよびA + Tの並びの数を低減させるように修飾して、p D A B 1 1 1 4 3 5 を創製した。p D A B 1 1 1 4 3 4 のc r y 1 F a 遺伝子とp D A B 1 1 1 4 3 5 のc r y 1 F a 遺伝子間には合計32塩基の差があり、DNAは98.2%同一である。結果として生じるタンパク質発現は、それぞれほぼ同一である ( $62.6$  および  $60.8 \text{ ng/cm}^2$ )。しかし、これら2つのバックグラウンド間には、形質転換効率(5%および23%)の有意な差がある。加えて、加水分解プローブアッセイによって検出して、単一コピー事象生成の品質の差も統計的に有意であった; p D A B 1 1 1 4 3 4 では32.3%、およびp D A B 1 1 1 4 3 5 では51.4%。

### 【0283】

HERCULEX (登録商標) バージョンのc r y 1 F a 遺伝子を含む2つのバックグラウンドである、p D A B 1 1 0 8 3 9 (遺伝子のみ) および p D A B 1 1 0 8 4 2 (遺伝子カセット) 各々が、比較的同等のレベル、それぞれ  $43.8$  および  $45.1 \text{ ng/cm}^2$ 、でC r y 1 F a タンパク質を発現した。これら2つのバックグラウンドは、同一バージョンのDNA配列を有したが、遺伝子に関連した調節エレメントが異なった。p D A B 1 1 0 8 4 2 におけるプロモーターの前にあるポリリンカーは、p D A B 1 1 0 8 3 9 と比較して、24塩基対欠失を含む。異なるバージョンのトウモロコシユビキチン1

プロモーターを、配列が7塩基異なる各バックグラウンドで使用した。プロモーターをA T G翻訳開始に連結させるリーダー配列には5塩基対の食い違いがあり、p D A B 1 1 0 8 3 9バックグラウンドに19の追加の塩基がある。最後に、両方の遺伝子カセットの3' U T R領域は異なり、p D A B 1 1 0 8 3 9バックグラウンドはトウモロコシ (Zea mays) P e r 5 3' U T Rを有するが、p D A B 1 1 0 8 4 2はA. ツメファシエンス (A. tumefaciens) O R F 2 5 3' U T Rを有する。

#### 【0284】

構造的相違に加えて、これら2つのバックグラウンドで検出された形質転換効率および単一コピー事象百分率も異なった。p D A B 1 1 0 8 3 9バックグラウンドは、p D A B 1 1 0 8 4 2バックグラウンド (それぞれ14%および19%) と比較して、統計的に高い形質転換効率 (23%) および単一コピー事象頻度 (30.6%) をもたらした。

10

#### 【0285】

残りのバックグラウンドは、各々、H E R C U L E X (登録商標) 対照より概して低くC r y 1 F aを発現した。p D A B 1 1 1 4 3 6およびp D A B 1 1 1 4 3 7の場合、カルスおよび幼小植物期の間の発現上昇が、集団から単一コピー高発現事象を排除することもあり、その結果、より低い形質転換率となり、C r y 1 F a発現が低減された集団となった。これらの事象からのいくつかの小植物は、最終的には植物健康状態不良をもたらす、葉および茎の赤変と葉および茎構造の重度の萎縮を有すると報告された。これらの配列と、トウモロコシユビキチン1より弱いプロモーターの併用は、より低い全発現の原因となることもあった。p D A B 1 1 1 4 3 6およびp D A B 1 1 1 4 3 7は、タンパク質発現に関して望ましいDNA配列であり得る。

20

#### 【0286】

特定の宿主における導入遺伝子発現に最適なDNA配列を有することは、発現目標の達成に重要であり得る。異なるバックグラウンドからの平均タンパク質発現は、(p D A B 1 1 1 4 4 0で測定された)  $4 \text{ ng} / \text{cm}^2$  という低レベルから (p D A B 1 1 1 4 3 4で測定された)  $62.8 \text{ ng} / \text{cm}^2$  という高レベルまで多岐にわたった。単一事象の発現は、不良なトウモロコシゲノム位置への組み込みが遺伝子設計にかかわらず無発現をもたらす場合があるという条件で、すべてのバックグラウンドで検出された  $0 \text{ ng} / \text{cm}^2$  から、p D A B 1 1 1 4 3 4およびp D A B 1 1 1 4 3 5バックグラウンドでの  $120 \text{ ng} / \text{cm}^2$  という高レベルまで幅があった。しかし、本明細書中の特定の例によって実証したように、組み込みが遺伝子発現に好適な位置で起こると、宿主での最適な発現のために設計した遺伝子を、さほど最適でない遺伝子と比較して有意に高いレベルで発現することができ、この発現レベルには  $10 \text{ ng} / \text{cm}^2$  (p D A B 1 1 1 4 4 0) ~  $120 \text{ ng} / \text{cm}^2$  (p D A B 1 1 4 3 4およびp D A B 1 1 1 4 3 5) の幅がある。

30

【 図 1 】

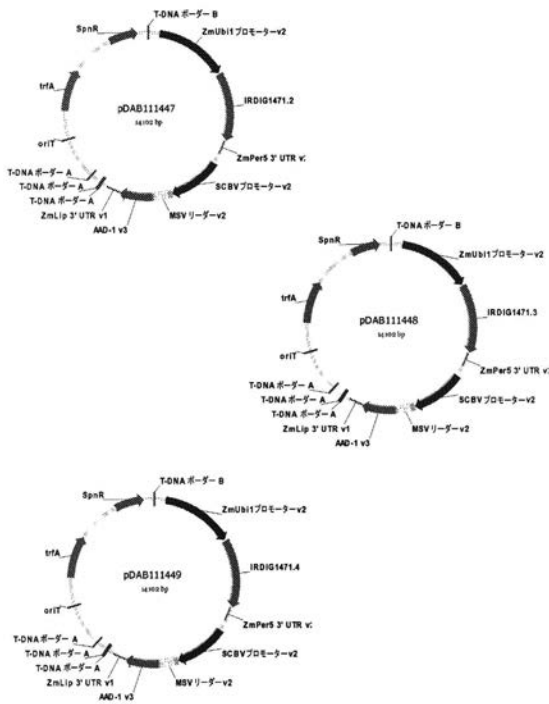


図1

【 図 2 】

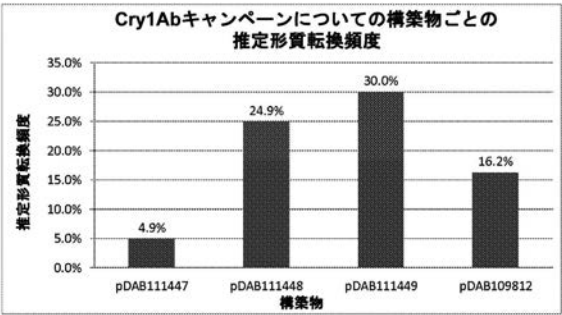


図2

【 図 3 】

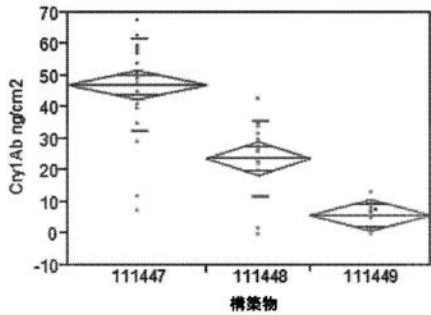


図3

【 図 4 】

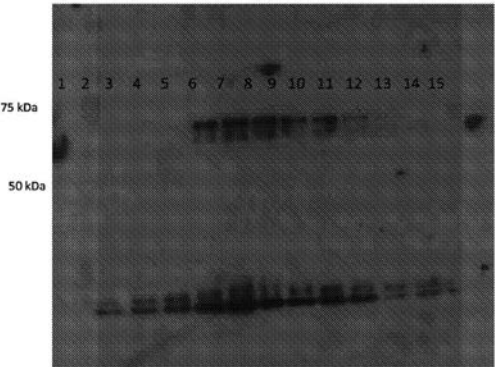
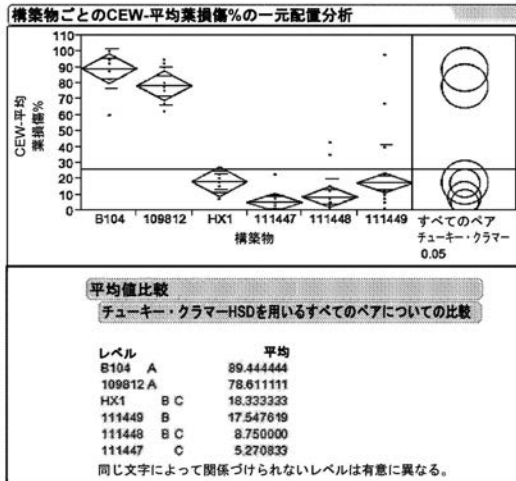


図4

【図 5】



【図 6】

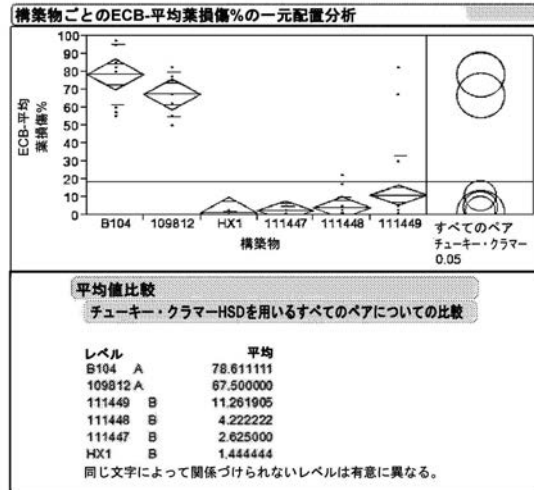


図6

図5

【図 7】

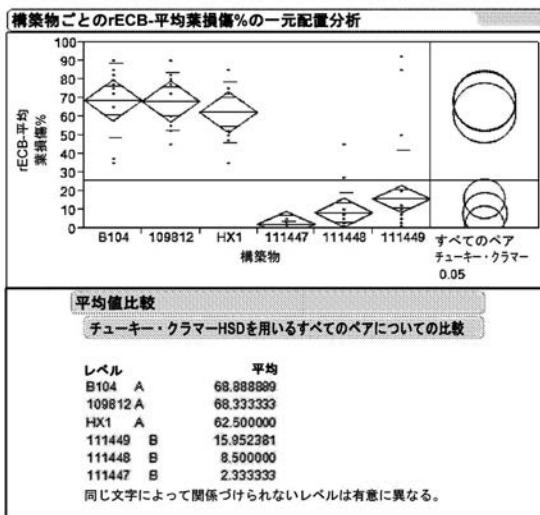


図7

【図 8 - 1】

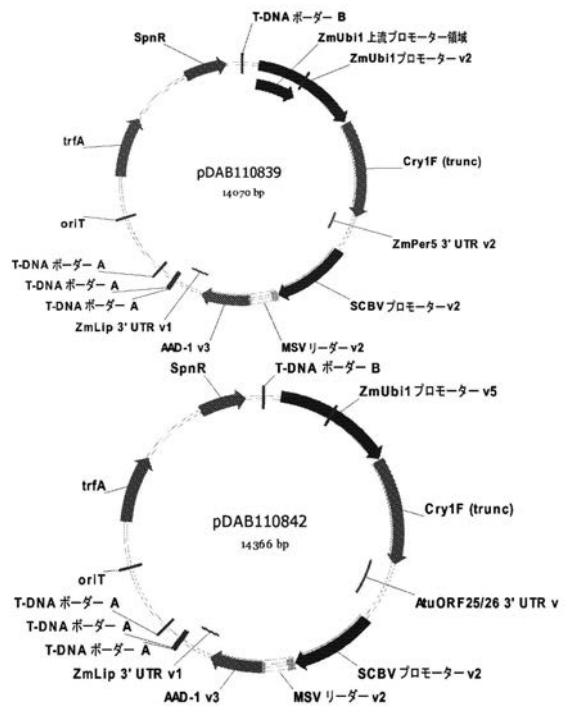


図8

【図 8 - 2】

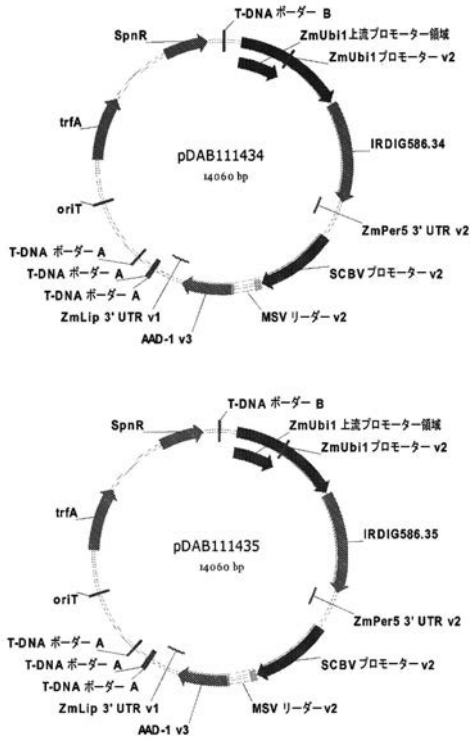


図8続き

【図 8 - 3】

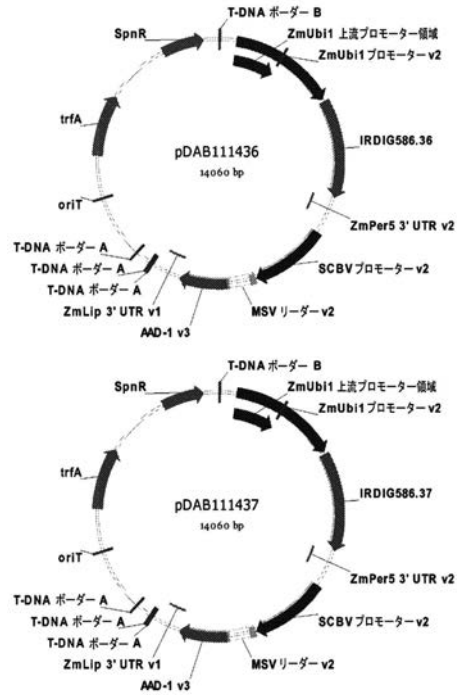


図8続き

【図 8 - 4】

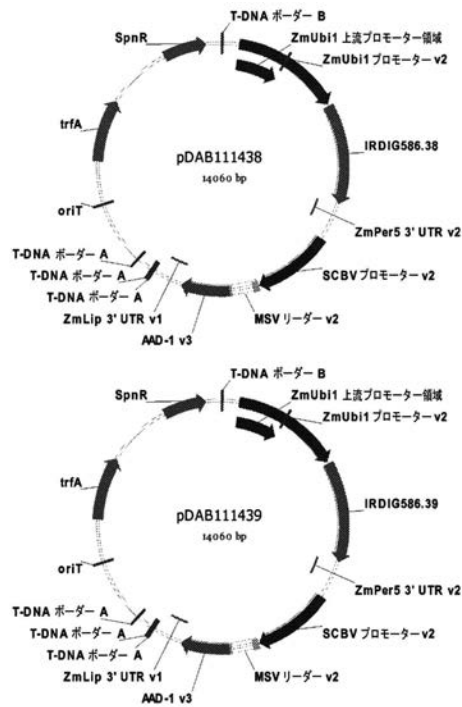


図8続き

【図 8 - 5】

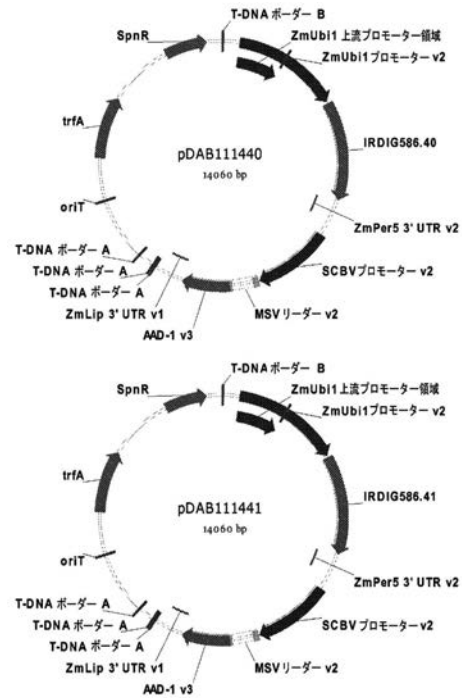
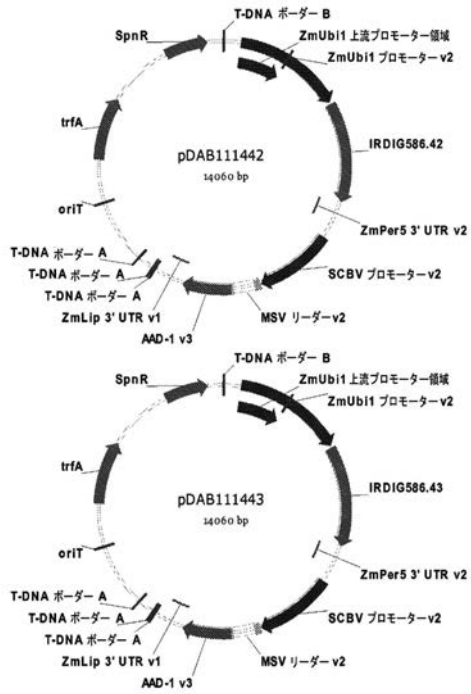


図8続き

【図 8 - 6】



【図 9】

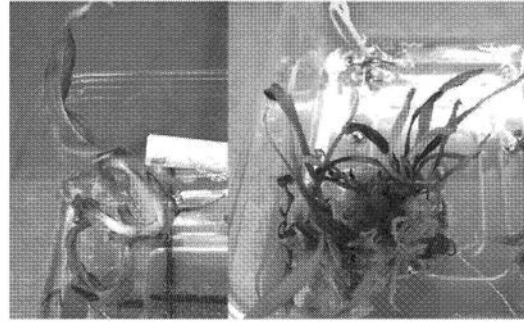


図9

図8続き

【図 1 0】

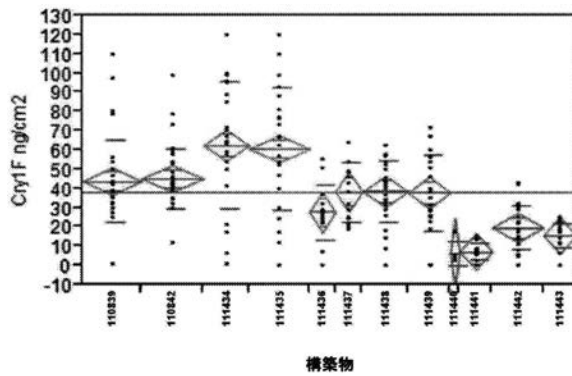


図10

【図 1 1】

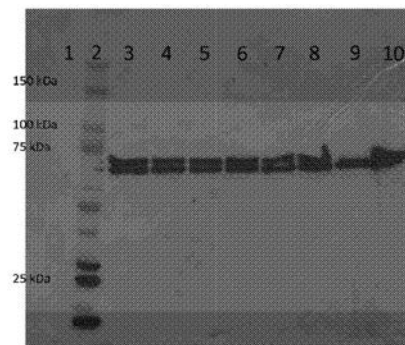


図11

【配列表】

2017504332000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/US2015/011831**

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☐ forming part of the international application as filed:  
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☒ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/US2015/011831**

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A01H 5/00(2006.01)i, C12N 5/04(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>A01H 5/00; C12N 15/63; C07K 14/325; C12N 15/09; C12N 15/82; C12N 15/11; C12N 5/04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean utility models and applications for utility models<br>Japanese utility models and applications for utility models                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: synthetic polynucleotide, polyadenylation, codon optimization, insecticidal protein, plant                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                              | Relevant to claim No.                                                                   |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2012-0266335 A1 (LARRINUA, IGNACIO M. et al.) 18 October 2012<br>See abstract; paragraphs [0027], [0110]-[0111], [0188] and [0206]; claims 1, 4, 7, 14-16 and 18-23; SEQ ID NOs: 1, 3 and 5. | 1-11, 14-25                                                                             |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                 | 12-13                                                                                   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2003-0046726 A1 (KOZIEL, MICHAEL et al.) 6 March 2003<br>See abstract; paragraph [0074]; claims 1, 9, 36, 90-91 and 94.                                                                      | 1-25                                                                                    |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 7741118 B1 (FISCHHOFF, DAVID A. et al.) 22 June 2010<br>See abstract; claims 1-6.                                                                                                            | 1-25                                                                                    |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2012-131619 A1 (METAHELIX LIFE SCIENCES LIMITED) 4 October 2012<br>See abstract; claims 8, 13-15 and 25.                                                                                     | 1-25                                                                                    |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 8309516 B2 (HART, HOPE et al.) 13 November 2012<br>See abstract; claims 1 and 17.                                                                                                            | 1-25                                                                                    |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                         |
| Date of the actual completion of the international search<br>27 April 2015 (27.04.2015)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                 | Date of mailing of the international search report<br><b>27 April 2015 (27.04.2015)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br>International Application Division<br>Korean Intellectual Property Office<br>189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701,<br>Republic of Korea<br>Facsimile No. +82 42 472 7140                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                 | Authorized officer<br>HEO, Joo Hyung<br>Telephone No. +82-42-481-8150                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2015/011831**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2012-0266335 A1                        | 18/10/2012          | AR 086006 A1               | 13/11/2013          |
|                                           |                     | AU 2012-242735 A1          | 31/10/2013          |
|                                           |                     | AU 2012-242735 A2          | 07/11/2013          |
|                                           |                     | CA 2832834 A1              | 18/10/2012          |
|                                           |                     | CN 103597070 A             | 19/02/2014          |
|                                           |                     | EP 2697363 A1              | 19/02/2014          |
|                                           |                     | EP 2697363 A4              | 05/11/2014          |
|                                           |                     | IL 228849 D0               | 31/12/2013          |
|                                           |                     | JP 2014-515609 A           | 03/07/2014          |
|                                           |                     | KR 10-2014-0026479A        | 05/03/2014          |
|                                           |                     | MX 2013012052 A            | 27/05/2014          |
|                                           |                     | UY 34014 A                 | 30/11/2012          |
|                                           |                     | WO 2012-142371 A1          | 18/10/2012          |
| US 2003-0046726 A1                        | 06/03/2003          | AT 221916 T                | 15/08/2002          |
|                                           |                     | AU 2795292 A               | 03/05/1993          |
|                                           |                     | CA 2120514 A1              | 15/04/1993          |
|                                           |                     | CA 2120514 C               | 05/08/2008          |
|                                           |                     | CZ 292953 B6               | 14/01/2004          |
|                                           |                     | CZ 9400769 A3              | 15/03/1995          |
|                                           |                     | DK 0618976 T3              | 02/12/2002          |
|                                           |                     | EP 0618976 A1              | 12/10/1994          |
|                                           |                     | EP 0618976 A1              | 20/03/2002          |
|                                           |                     | EP 0618976 B1              | 07/08/2002          |
|                                           |                     | EP 1209237 A2              | 29/05/2002          |
|                                           |                     | EP 1209237 A3              | 31/07/2002          |
|                                           |                     | EP 1213356 A2              | 12/06/2002          |
|                                           |                     | EP 1213356 A3              | 19/06/2002          |
|                                           |                     | ES 2181678 T3              | 01/03/2003          |
|                                           |                     | JP 2003-189888 A           | 08/07/2003          |
|                                           |                     | RO 110263 B1               | 30/11/1995          |
|                                           |                     | RU 2202611 C2              | 20/04/2003          |
|                                           |                     | SK 283357 B6               | 03/06/2003          |
|                                           |                     | SK 37894 A3                | 05/10/1994          |
|                                           |                     | US 2003-0237117 A1         | 25/12/2003          |
|                                           |                     | US 2006-0021095 A1         | 26/01/2006          |
|                                           |                     | US 2006-0117407 A1         | 01/06/2006          |
|                                           |                     | US 5625136 A               | 29/04/1997          |
|                                           |                     | US 5859336 A               | 12/01/1999          |
|                                           |                     | US 6018104 A               | 25/01/2000          |
|                                           |                     | US 6051760 A               | 18/04/2000          |
|                                           |                     | US 6075185 A               | 13/06/2000          |
|                                           |                     | US 6121014 A               | 19/09/2000          |
|                                           |                     | US 6320100 B1              | 20/11/2001          |
|                                           |                     | US 6403865 B1              | 11/06/2002          |
|                                           |                     | US 6720488 B2              | 13/04/2004          |
|                                           |                     | WO 93-07278 A1             | 15/04/1993          |
| US 7741118 B1                             | 22/06/2010          | AR 243234 A1               | 30/07/1993          |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2015/011831**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
|                                           |                     | AT 206462 T                | 15/10/2001          |
|                                           |                     | AU 5163090 A               | 26/09/1990          |
|                                           |                     | AU 638438 B2               | 01/07/1993          |
|                                           |                     | BR 9007159 A               | 10/12/1991          |
|                                           |                     | CA 2024811 A1              | 25/08/1990          |
|                                           |                     | DE 69033816 D1             | 08/11/2001          |
|                                           |                     | DE 69033816 T2             | 08/08/2002          |
|                                           |                     | DK 0413019 T3              | 12/11/2001          |
|                                           |                     | EP 0385962 A1              | 05/09/1990          |
|                                           |                     | EP 0385962 B1              | 18/07/2001          |
|                                           |                     | EP 0413019 A1              | 20/02/1991          |
|                                           |                     | EP 0413019 B1              | 04/10/2001          |
|                                           |                     | EP 1103616 A2              | 30/05/2001          |
|                                           |                     | EP 1103616 A3              | 27/06/2001          |
|                                           |                     | ES 2164633 T3              | 01/03/2002          |
|                                           |                     | FI 107430 B                | 15/08/2001          |
|                                           |                     | FI 905067 A0               | 15/10/1990          |
|                                           |                     | GR 3036762 T3              | 31/12/2001          |
|                                           |                     | IL 93513 A                 | 14/11/1995          |
|                                           |                     | JP 03364616 B2             | 08/01/2003          |
|                                           |                     | NZ 232654 A                | 23/12/1991          |
|                                           |                     | US 2003-192078 A1          | 09/10/2003          |
|                                           |                     | US 2006-0095988 A1         | 04/05/2006          |
|                                           |                     | US 5500365 A               | 19/03/1996          |
|                                           |                     | US 5880275 A               | 09/03/1999          |
|                                           |                     | WO 90-10076 A1             | 07/09/1990          |
| WO 2012-131619 A1                         | 04/10/2012          | None                       |                     |
| US 8309516 B2                             | 13/11/2012          | AR 066400 A1               | 19/08/2009          |
|                                           |                     | AR 077319 A2               | 17/08/2011          |
|                                           |                     | AU 2008-232826 A1          | 09/10/2008          |
|                                           |                     | AU 2008-232826 B2          | 02/06/2011          |
|                                           |                     | BR PI0809352 A2            | 02/09/2014          |
|                                           |                     | CA 2682227 A1              | 09/10/2008          |
|                                           |                     | CL 2008000912 A1           | 03/10/2008          |
|                                           |                     | CL 9122008 A1              | 03/10/2008          |
|                                           |                     | CN 101679491 A             | 24/03/2010          |
|                                           |                     | CN 101679491 B             | 06/11/2013          |
|                                           |                     | CN 103588865 A             | 19/02/2014          |
|                                           |                     | EP 2137211 A1              | 30/12/2009          |
|                                           |                     | EP 2137211 A4              | 05/05/2010          |
|                                           |                     | MX 2009010062 A            | 13/10/2009          |
|                                           |                     | RU 2009139447 A            | 10/05/2011          |
|                                           |                     | RU 2011146867 A            | 27/05/2013          |
|                                           |                     | RU 2497830 C2              | 10/11/2013          |
|                                           |                     | UA 96187 C2                | 10/10/2011          |
|                                           |                     | US 2010-0017914 A1         | 21/01/2010          |
|                                           |                     | WO 2008-121633 A1          | 09/10/2008          |
|                                           |                     | ZA 200906699 A             | 30/06/2010          |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ウーズレイ, アーロン

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンスビル ロード 9330

(72)発明者 ウォーデン, サラ, イー.

アメリカ合衆国 インディアナ州 46268, インディアナポリス, ジオンスビル ロード 9330

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 AD05 AD20 CA11 CA14 CA17 CB02 CD17

4B065 AA88X AB01 AC14 AC20 BA02 CA48 CA53