(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-176183
(P2017-176183A)
(43)公開日　平成29年10月5日(2017.10.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2B030
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4H045
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		
A01H 1/00	(2006.01)	A01H	1/00	A	

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

(21)出願番号　特願2017-88176(P2017-88176)
(22)出願日　平成29年4月27日(2017.4.27)
(62)分割の表示　特願2014-555784(P2014-555784)の分割
原出願日　平成25年2月1日(2013.2.1)
(31)優先権主張番号　61/594,245
(32)優先日　平成24年2月2日(2012.2.2)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　501035309
ダウ　アグロサイエンシィズ　エルエルシー
アメリカ合衆国　インディアナ州　４６２６８，　インディアナポリス，　ジオンスヴィレ　ロード，　９３３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100126354
弁理士　藤田　尚
(74)代理人　100176094
弁理士　稲田　満

最終頁に続く

(54)【発明の名称】植物トランス活性化相互作用モチーフおよびその使用

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

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＤＮＡ結合ポリペプチド、および
配列番号１０～５８からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチド
を含む合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項２】
ＤＮＡ結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、ＧＡＬ４、ＴＡＬ、ＬｅｘＡ、Ｔｅｔリプレッサー、ＬａｃＲ、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項３】
少なくとも１つの追加のＤＮＡ結合ポリペプチドを含む、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項４】
配列番号２～８および配列番号１００～１２０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項５】
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択される、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項６】
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１７、配列番号２３、配列番号２９、配列番号３５、配列番号４１、配列番号４７、および配列番号５３からなる群から選択される、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項７】
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１８、配列番号２４、配列番号３０、配列番号３６、配列番号４２、配列番号４８、および配列番号５４からなる群から選択される、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項８】
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１９、配列番号２５、配列番号３１、配列番号３７、配列番号４３、配列番号４９、および配列番号５５からなる群から選択される、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項９】
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号２０、配列番号２６、配列番号３２、配列番号３８、配列番号４４、配列番号５０、および配列番号５６からなる群から選択される、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項１０】
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号２１、配列番号２７、配列番号３３、配列番号３９、配列番号４５、配列番号５１、および配列番号５７からなる群から選択される、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項１１】
少なくとも１つの追加のトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項１２】
対象のヌクレオチド配列が第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結している場合、対象のヌクレオチド配列の発現を増加させる合成転写活性化因子融合タンパク質であって、第二のヌクレオチド配列に特異的に結合するＤＮＡ結合ポリペプチド、および
配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列

番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるタンパク質トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチド
を含む融合タンパク質。
【請求項１３】
ＤＮＡ結合ポリペプチド、および
配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも８０％の配列同一性を有するトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチド
を含む合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項１４】
トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも８５％の配列同一性を有する、請求項１３に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項１５】
トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する、請求項１３に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項１６】
トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９５％の配列同一性を有する、請求項１３に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項１７】
合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、
ＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および
配列番号１０～５８からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチド配列
を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。
【請求項１８】
ＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする少なくとも１つの追加のポリヌクレオチド配列を含む、請求項１７に記載の核酸。
【請求項１９】
配列番号１０～５８からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドをコードする少なくとも１つの追加のポリヌクレオチド配列を含む、請求項１７に記載の核酸。
【請求項２０】
第一および第二のポリヌクレオチド配列が遺伝子調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項１７に記載の核酸。
【請求項２１】
第一および第二のポリヌクレオチド配列が第三のポリヌクレオチド配列により分離されている、請求項１７に記載の核酸。
【請求項２２】
宿主細胞のゲノムに組み込まれている、請求項１７に記載の核酸。
【請求項２３】
宿主細胞が植物細胞である、請求項２２に記載の核酸。
【請求項２４】

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

【請求項２５】

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

【請求項２６】

請求項１７に記載の核酸を含むベクター。

【請求項２７】

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

【請求項２８】

植物発現ベクターである、請求項２６に記載のベクター。

【請求項２９】

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

【請求項３０】

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

【請求項３１】

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

【請求項３２】

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

【請求項３３】

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

【請求項３４】

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

【請求項３５】

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

【請求項３６】

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

【請求項３７】

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

【請求項３８】
合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、
配列番号８０～９３、
配列番号８０～９３のうちの１つと実質的に同一であるヌクレオチド配列、
配列番号８０～９３のうちの少なくとも１つに特異的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドの相補体、および
配列番号８０～９３のうちの少なくとも１つに特異的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドの逆相補体
からなる群から選択される少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸。
【請求項３９】
請求項１７に記載の核酸を含む細胞。
【請求項４０】
植物細胞または酵母細胞である、請求項３９に記載の細胞。
【請求項４１】
請求項２９に記載の核酸を含む細胞。
【請求項４２】
植物細胞または酵母細胞である、請求項４１に記載の細胞。
【請求項４３】
請求項３９に記載の細胞を含む植物組織、植物部分、植物商品生産物、または植物体全体。
【請求項４４】
請求項４１に記載の細胞を含む植物組織、植物部分、植物商品生産物、または植物体全体。
【請求項４５】
宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、
ＤＮＡ結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、請求項１７に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。
【請求項４６】
前記核酸を宿主細胞に導入することが、前記核酸を含むベクターを宿主細胞に導入することを含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記核酸が宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
対象のヌクレオチド配列が外来性ヌクレオチド配列である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４９】
対象のヌクレオチド配列が内在性ヌクレオチド配列である、請求項４５に記載の方法。
【請求項５０】
前記核酸を宿主細胞に導入することが、前記核酸を含む植物を、宿主細胞を含む植物と交雑させることを含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項５１】
宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、
ＤＮＡ結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を、請求項１７に記載の核酸を含む宿主細胞に導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。
【請求項５２】
対象のヌクレオチド配列を宿主細胞に導入することが、対象のヌクレオチド配列を含むベクターを宿主細胞に導入することを含む、請求項５１に記載の方法。

【請求項５３】
前記核酸が宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項５１に記載の方法。
【請求項５４】
第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列が、宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項５１に記載の方法。
【請求項５５】
対象のヌクレオチド配列を宿主細胞に導入することが、対象のヌクレオチド配列を含む植物を、宿主細胞を含む植物と交雑させることを含む、請求項５１に記載の方法。
【請求項５６】
宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、ＤＮＡ結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、請求項１７に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。
【請求項５７】
合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、
ＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および
植物遺伝子発現のトランス活性化のための手段をコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。
【請求項５８】
宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、ＤＮＡ結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、請求項５７に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。
【請求項５９】
宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、ＤＮＡ結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を、請求項５７に記載の核酸を含む宿主細胞に導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。
【請求項６０】
配列番号１２１～１２７からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸。
【請求項６１】
請求項６０に記載の核酸に特異的にハイブリダイズ可能である核酸の相補体。
【請求項６２】
請求項６０に記載の核酸に特異的にハイブリダイズ可能である核酸の逆相補体。
【請求項６３】
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択される、請求項６０に記載の核酸。
【請求項６４】
配列番号１２１～１２７からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含むポリペプチド。
【請求項６５】
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択される、請求項６４に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１２年２月２日に提出され、題名が「植物トランス活性化相互作用モチーフおよびその使用」である米国特許仮出願第６１／５９４，２４５号の利益を主張する。
【０００２】
本開示は植物バイオテクノロジーに関する。実施形態は、植物トランス活性化因子由来の新規のまたは合成の転写因子相互作用モチーフを含むポリペプチド（例えば、融合タンパク質）に関する。いくつかの実施形態は、対象の核酸を発現するまたは対象の核酸の発現を増加させるそのようなタンパク質の使用に関する。いくつかの実施形態は、植物トランス活性化因子由来の新規のまたは合成転写因子相互作用モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。特定の例は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む宿主細胞、組織、および／または生物に関する。
【背景技術】
【０００３】
クローニングされ単離された遺伝子の植物細胞への導入（遺伝子形質転換）およびそれに続くトランスジェニック植物の再生は、植物および植物材料の遺伝的改変を行うのに広く使用されている。望ましい形質（例えば、改良された栄養価、増加した収量、有害生物または疾患抵抗性、ストレス耐性、および除草剤抵抗性）を導入するための植物の遺伝子形質転換は現在では一般的に使用されて、望ましい形質を発現する新たな改良されたトランスジェニック植物を生産している。ＤＮＡは典型的には、真核植物細胞の核または色素体ＤＮＡ中に無作為に導入され、次に細胞のＤＮＡに組み込まれた前記ＤＮＡを含有する細胞は単離され、これを使用して安定的に形質転換された植物細胞を生産する。多くの場合、単一の植物種を遺伝的に操作して、複数のコード配列を導入することにより複数の導入された形質を発現させるのが望ましく、この配列には類似する（または同一の）調節エレメントが含まれうる。
【０００４】
導入遺伝子（ならびに内在性遺伝子）の発現は、複数のタンパク質－ＤＮＡおよびタンパク質－タンパク質相互作用を含む機構を通じて制御される。そのような相互作用を通じて、核酸調節エレメント（例えば、プロモーターおよびエンハンサー）は、構成的または特異的な発現パターンをコード配列に与えることができる。例えば、プロモーターは、特定の組織において、特定の発生期間中、または環境刺激に応答して、コード配列の増加した転写をもたらしうる。残念ながら、導入遺伝子発現に対する従来のプロモーターの固有の属性により、宿主細胞においてそのプロモーターを使用して行使することができる発現制御の範囲は制限される。従来のプロモーターの１つの実際的な制約は、プロモーター強度の限界のために、および特に強いプロモーターまたは同じプロモーターの多くのコピーの同一細胞内での同時使用による導入遺伝子発現のサイレンシングのために、導入された遺伝子の発現レベルを微調整するのが難しいことである。内在性または天然の遺伝子の発現を開始または増加させることが望ましいこともある。
【０００５】
トランス活性化因子は、タンパク質－タンパク質相互作用を通じてＤＮＡ転写に関与するいくつかの異なるタンパク質（例えば、ヌクレオソーム再構築複合体、メディエーター複合体、ならびにＴＦＩＩＢ、ＴＢＰ、およびＴＦＩＩＨなどの一般的転写因子）を動員して、ヌクレオソームアセンブリ／ディスアセンブリ、プレ開始複合体形成、プロモータークリアランス、および／または伸長速度に影響を与えることにより転写を開始するまたは転写速度を増強することによって機能するタンパク質である。トランス活性化因子とその結合パートナーのタンパク質－タンパク質相互作用は、「トランス活性化ドメイン（ＴＡＤ）」として知られるトランス活性化因子内の別々の内部構造エレメントを含む。ＴＡＤは、一次配列相同性をほとんど共有しておらず標的に結合した場合のみ明確な構造をと

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

【０００６】

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

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

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

【０００８】

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

【０００９】

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

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

【００１０】

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

【００１１】

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

【００１２】

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

【００１３】

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

【００１４】

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

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

【００１５】

さらに、遺伝子発現を増加させるための、ＥＲＦ２に由来する手段が本明細書に記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ＥＲＦ２に由来する手段」には、配列番号１７～２２および配列番号１２１からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、ＰＴＩ４に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ＰＴＩ４に由来する手段」には、配列番号２３～２８および配列番号１２２からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、ＡｔＥＲＦ１に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ＡｔＥＲＦ１に由来する手段」には、配列番号２９～３４および配列番号１２３からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、ＯＲＣＡ２に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ＯＲＣＡ２に由来する手段」には、配列番号３５～４０および配列番号１２４からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、ＤＲＥＢ１Ａに由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ＤＲＥＢ１Ａに由来する手段」には、配列番号４１～４６および配列番号１２５からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、ＣＢＦ１に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ＣＢＦ１に由来する手段」には、配列番号４７～５２および配列番号１２６からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。遺伝子発現を増加させるための、ＤＯＦ１に由来する手段がさらに記載されている。本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を増加させるための、ＤＯＦ１に由来する手段」には、配列番号５３～５８および配列番号１２７からなる群から選択されるポリペプチドが含まれる。

【００１６】

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

【００１７】

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

ゲノムに無作為に組み込まれても、または所定の位置で組み込まれてもよい。

【００１８】

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

【００１９】

前述のおよび他の特長は、添付の図を参照して進行するいくつかの実施形態の以下の詳細な説明からさらに明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

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

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

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

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

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

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

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

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

いる。
【図９】ＤＯＦ１のＴＡＤ相互作用モチーフに導入されてバリアントＤＯＦ１相互作用モチーフを生じることができる改変を示すアライメントである。天然のＤＯＦ１およびＶＰ１６相互作用モチーフの配列は比較のために収載されている。直接接触は反転表示されている。
【図１０】酵母組込み型ベクター、ｐＨＯ－ｚＢＧ－ＭＥＬ１のマップであり、ＭＥＬ１レポーター遺伝子の上流にＨＡＳ（高親和性部位；Ｈｉｇｈ　Ａｆｆｉｎｉｔｙ　Ｓｉｔｅ）ＺＦＰ結合部位を含有する。ベクターは出芽酵母（S. cerevisiae）ＨＯ遺伝子座に対して標的化され、酵母と細菌の両方において選択のためにＫａｎＭＸ耐性遺伝子を含有していた。
【図１１】酵母において様々な植物トランス活性化相互作用モチーフによる活性化から生じたＭｅｌｌレポーター遺伝子の発現レベルのグラフ図である。
【図１２】プラスミドｐＤＡＢ９８９７のマップであり、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）アクチン２－プロモーターは、植物トランス活性化相互作用モチーフジンクフィンガー融合タンパク質を試験するために使用されるｇｕｓレポーター遺伝子を推進する８直列型ジンクフィンガー（Ｚ６）結合部位５４８～７４９塩基対を転写開始部位の上流に含有する。バイナリーベクターは、標的レポーター植物イベント生産のためのｐａｔ選択可能マーカーを推進するシロイヌナズナ（A. thaliana）ユビキチン－１０プロモーターも含有する。
【図１３】プラスミドｐＤＡＢ１０７８８１のマップである。
【図１４】プラスミドｐＤＡＢ１０７８８２のマップである。
【図１５】プラスミドｐＤＡＢ１０７８８３のマップである。
【図１６】プラスミドｐＤＡＢ１０７８８４のマップである。
【図１７】プラスミドｐＤＡＢ１０７８８５のマップである。
【図１８】プラスミドｐＤＡＢ１０７８８６のマップである。
【図１９】プラスミドｐＤＡＢ１０７８８７のマップである。
【図２０】プラスミドｐＤＡＢ１０６２７２のマップである。
【図２１】プラスミドｐＤＡＢ１０６２３８のマップである。
【図２２】プラスミドｐＤＡＢ１０６２７３のマップである。
【図２３】プラスミドｐＤＡＢ１０６２７４のマップである。
【図２４】プラスミドｐＤＡＢ１０６２７５のマップである。
【図２５】プラスミドｐＤＡＢ１０６２７６のマップである。
【図２６】プラスミドｐＤＡＢ１０６２７７のマップである。
【図２７】プラスミドｐＤＡＢ１０６２７８のマップである。
【図２８】プラスミドｐＤＡＢ１０６２７９のマップである。
【図２９】様々な植物トランス活性化相互作用モチーフ処理について内在性遺伝子発現レベルにより正規化されたｇｕｓ転写物レベルの平均および標準偏差（ダイアモンド）ならびに四分位値（直線と箱）のグラフ図である。様々な植物トランス活性化相互作用モチーフからのｇｕｓレポーター遺伝子の活性化は、空ベクター対照およびＶＰ１６タンパク質のドメインＩＩサブユニットの活性化と比較された。
【図３０】プラスミドｐＧａｌＧＵＳのマップであり、ｇｕｓレポーター遺伝子を推進するシロイヌナズナ（A. thaliana）アクチン－２プロモーターに融合されている６直列型Ｇａｌ４結合部位は、Ｇａｌ４結合タンパク質に融合されている植物トランス活性化相互作用モチーフを試験するために使用される。バイナリーベクターは、標的レポーター植物イベント生産のためのｐａｔ選択可能マーカーを推進するシロイヌナズナ（A. thaliana）ユビキチン－１０プロモーターも含有する。
【図３１】プラスミドｐＴＡＬＧＵＳのマップであり、ｇｕｓレポーター遺伝子を推進するシロイヌナズナ（A. thaliana）アクチン－２プロモーターに融合されている８直列型ＵＰＡ－Ｂｏｘコンセンサス結合部位は、ＴＡＬ結合タンパク質に融合されている植物トランス活性化相互作用モチーフを試験するために使用される。バイナリーベクターは、標

的レポーター植物イベント生産のためのｐａｔ選択可能マーカーを推進するシロイヌナズナ（A. thaliana）ユビキチン－１０プロモーターも含有する。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

配列表

添付の配列表に収載されている核酸配列は、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．８２２に定義される通りに、ヌクレオチド塩基を表す標準文字省略形を使用して示されている。それぞれの核酸配列の１つの鎖のみが示されているが、その相補鎖は表示されている鎖への任意の参照により含まれると理解されている。添付の配列表では：

【００２２】

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

【００２３】

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

【００２４】

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

【００２５】

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

【００２６】

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

【００２７】

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

【００２８】

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

【００２９】

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

【００３０】

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

【００３１】

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

【００３２】

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

【００３３】

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

【００３４】

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

【００３５】

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

いる：ENAFYMHDEAMFEMP

【００３６】

配列番号１５は、ＣＢＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示している：DEETMFGMP

【００３７】

配列番号１６は、ＤＯＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフを示している：EDSFVWPAASFD

【００３８】

配列番号１７～２２は、バリアントＥＲＦ２植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している。

【００３９】

配列番号２３～２８は、バリアントＰＴＩ４植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している。

【００４０】

配列番号２９～３４は、バリアントＡｔＥＲＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【００４１】

配列番号３５～４０は、バリアントＯＲＣＡ２植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【００４２】

配列番号４１～４６は、バリアントＤＲＥＢ１Ａ植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【００４３】

配列番号４７～５２は、バリアントＣＢＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【００４４】

配列番号５３～５８は、バリアントＤＯＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している

【００４５】

配列番号５９～６６は、プラスミドｐＨＯ－ｚＢＧ－ＭＥＬ１の構築のために使用されるプライマーを示している。

【００４６】

配列番号６７は、Ｚ６　ＤＮＡ結合ドメインポリヌクレオチド配列を示している：TGTGGTGGGAGAGGAGGGTGG

【００４７】

配列番号６８は、Ｚ６　ＤＮＡ結合ドメインの８×直列型反復配列を示している：GGTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGGAGTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCTCTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGAGATGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGTCTTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGGGATGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCCTTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGAGGTGTGGTGGGAGAGGAGGGTGGCTTAAGCCGC

【００４８】

配列番号６９～７４は、ｐａｔおよびｐａｌ　ＨＰアッセイにおいて使用されるプライマーおよびプローブを示している。

【００４９】

配列番号７５～７８は、タバコにおけるＰＴＵのＰＣＲ分析のために使用されるプライマーを示している。

【００５０】

配列番号７９は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＶＰ１６由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列を示している：GGCATGACCCATGATCCTGTGTCTTATGGAGCCTTGGATGTTGATGACTTTGAGTTTGAGCAGATGTTCACAGATGCACTGGGCATCGATGACTTTGGTGGA

【００５１】
配列番号８０は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＥＲＦ２由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ３）を示している：AATGACTCTGAGGACATGCTGGTGTATGGTTTGCTCAAGGATGCCTTTCACTTTGACACC
TCCAGCTCAGACCTCTCCTGCCTCTTTGACTTCCCAGCC
【００５２】
配列番号８１は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＰＴＩ４由来の天然の植物トランス活性化相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ３）を示している：TGCCTGACAGAAACTTGGGGAGACTTGCCTCTCAAGGTTGATGACTCTGAGGACATGGTGATCTATGG
TCTGTTGAAGGATGCACTCTCAGTGGGGTGGTCCCCATTCTCTTTCACGGCTGGT
【００５３】
配列番号８２は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＡｔＥＲＦ１由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ３）を示している：TGCTTCACGGAATCCTGGGGAGACCTTCCTTTGAAGGAGAATGACTCTGAGGACAT
GTTGGTGTACGGAATCCTCAATGATGCTTTTCATGGTGGC
【００５４】
配列番号８３は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＯＲＣＡ２由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ３）を示している：TTCAATGAGAATTGTGAAGAAATCATCTCTCCAAACTACGCATCAGAGGACTTGTCTG
ACATCATCTTGACGGACATCTTCAAGGACCAAGACAACTATGAGGATGAG
【００５５】
配列番号８４は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＤＲＥＢ１Ａ由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ３）を示している：GGCTTTGACATGGAAGAAACATTGGTGGAGGCCATCTACACTGCTGAACAGAGCGA
GAATGCCTTCTACATGCATGATGAGGCAATGTTTGAGATGCCATCTCTTCTGGCCAACATGGCTGAGGGAATG
【００５６】
配列番号８５は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＣＢＦ１由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ３）を示している：GAACAGTCAGAAGGTGCTTTCTACATGGATGAAGAGACCATGTTTGGGATGCCAACCCTT
CTGGATAACATGGCAGAGGGA
【００５７】
配列番号８６は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＤＯＦ１由来の天然の植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ３）を示している：TCAGCTGGGAAGGCAGTCTTGGATGATGAGGACAGCTTTGTTTGGCCTGCTGCATCCTTT
GACATGGGTGCCTGCTGGGCTGGAGCTGGCTTTGCTGAC
【００５８】
配列番号８７は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＥＲＦ２由来の例示的なバリアント植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ２）を示している：AATGACTCTGAGGACATGCTGGTGTATGGTTTGCTCAAGGATGATTTC
CACTTTGAGACAATGTTCTCAGACCTGTCCTGCCTCTTTGACTTCCCAGCC
【００５９】
配列番号８８は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＰＴＩ４由来の例示的なバリアント植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ２）を示している：TGCCTGACAGAAACTTGGGGAGACTTGCCTCTCAAGGTTGATGACTTT
GAGTTTGAGATGATGTTCACAGATGCACTCTCAGTGGGGTGGTCCCCATTCTCTTTCACGGCTGGT
【００６０】
配列番号８９は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＡｔＥＲＦ１由来の例示的なバリアント植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ２）を示している：TGCTTCACGGAATCCTGGGGAGACCTTCCTTTGAAGGAGAATGA
CTTTGAGTTTGAAATGTTCACAGATTACGGAATCCTCAATGATGCTTTTCATGGTGGC

【００６１】
配列番号９０は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＯＲＣＡ２由来の例示的なバリアント植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ２）を示している：TTCAATGAGAATTGTGAAGAAATCATCTCTCCAAACTACGCATCAGAGGACTTTGATCTTGAGATGTTGACGGACATCTTCAAGGACCAAGACAACTATGAGGATGAG
【００６２】
配列番号９１は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＤＲＥＢ１Ａ由来の例示的なバリアント植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ２）を示している：GGCTTTGACATGGAAGAAACATTGGTGGAGGCCATCTACACTGCTGAACAGAGCGAGGACTTTGAGTTTGAAGCAATGTTCATGGATTCTCTTCTGGCCAACATGGCTGAGGGAATG
【００６３】
配列番号９２は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＣＢＦ１由来の例示的なバリアント植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ２）を示している：GAACAGTCAGAAGGTGCTTTCTACATGGATGACTTTGAGTTCGAGACAATGTTCATGGACACCCTTCTGGATAACATGGCAGAGGGA
【００６４】
配列番号９３は、Ｚ６ジンクフィンガー結合タンパク質に融合されたＤＯＦ１由来の例示的なバリアント植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフをコードする合成ヌクレオチド配列（ｖ２）を示している：TCAGCTGGGAAGGCAGTCTTGGATGATGAGGACTTTGAGTTTGAAGCCATGTTCACGGACATGGGTGCCTGCTGGGCTGGAGCTGGCTTTGCTGAC
【００６５】
配列番号９４～９８は、ｇｕｓおよびＢＹＥＥＦ　ＨＰアッセイにおいて使用されるプライマーおよびプローブを示している。
【００６６】
配列番号９９は、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子のコンセンサス結合配列から取られ、ＵＰＡ　ＤＮＡ結合ドメインと名付けられた直列型反復配列を示している：TATATAAACCTNNCCCTCT
【００６７】
配列番号１００は、ＥＲＦ２植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDAFHFDTSSSDALGIDDFGG
【００６８】
配列番号１０１は、ＰＴＩ４植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDDSEDMVIYGLLKDALGIDDFGG
【００６９】
配列番号１０２は、ＡｔＥＲＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVENDSEDMLVALGIDDFGG
【００７０】
配列番号１０３は、ＯＲＣＡ２植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVEDLSDIILTDALGIDDFGG
【００７１】
配列番号１０４は、ＤＲＥＢ１Ａ植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVENAFYMHDEAMFEMPALGIDDFGG
【００７２】
配列番号１０５は、ＣＢＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDEETMFGMPALG

IDDFGG

【００７３】

配列番号１０６は、ＤＯＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVEDSFVWPAASFDALGIDDFGG

【００７４】

配列番号１０７は、バリアントＥＲＦ２植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDDFHFETMFSDALGIDDFGG

【００７５】

配列番号１０８は、バリアントＥＲＦ２植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：NDSEDMLVYGLLKDDFHFETMFSDLSCLFDFPA

【００７６】

配列番号１０９は、バリアントＰＴＩ４植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDDFEFEMMFTDALGIDDFGG

【００７７】

配列番号１１０は、バリアントＰＴＩ４植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：CLTETWGDLPLKVDDFEFEMMFTDALSVGWSPFSFTAG

【００７８】

配列番号１１１は、バリアントＡｔＥＲＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVENDFEFEMFTDALGIDDFGG

【００７９】

配列番号１１２は、バリアントＡｔＥＲＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：CFTESWGDLPLKENDFEFEMFTDYGILNDAFHGG

【００８０】

配列番号１１３は、バリアントＯＲＣＡ２植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVEDFDLEMLTDALGIDDFGG

【００８１】

配列番号１１４は、バリアントＯＲＣＡ２植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：FNENCEEIISPNYASEDFDLEMLTDIFKDQDNYEDE

【００８２】

配列番号１１５は、バリアントＤＲＥＢ１Ａ植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVEDFEFEAMFMDALGIDDFGG

【００８３】

配列番号１１６は、バリアントＤＲＥＢ１Ａ植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GFDMEETLVEAIYTAEQSEDFEFEAMFMDSLLANMAEGM

【００８４】

配列番号１１７は、バリアントＣＢＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVDDFEFETMFMDALGIDDFGG

【００８５】

配列番号１１８は、バリアントＣＢＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：EQSEGAFYMDDFEFETMFMDTLLDNMAEG

【００８６】

配列番号１１９は、バリアントＤＯＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：GMTHDPVSYGALDVEDFEFEAMFTDALGIDDFGG

【００８７】

配列番号１２０は、バリアントＤＯＦ１植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ（下線部）を含む追加の例示的な合成トランス活性化ドメインを示している：SAGKAVLDDEDFEFEAMFTDMGACWAGAGFAD

【００８８】

配列番号１２１～１２７は、バリアント植物トランス活性化ドメイン相互作用モチーフ配列を示している。

【００８９】

Ｉ．いくつかの実施形態の概観

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

【００９０】

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

【００９１】

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

【００９２】

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

１６により与えられるよりも、植物細胞において遺伝子転写を大きく増加させることができることが見出された。ＡｔＥＲＦ１、ＯＲＣＡ２、およびＤＯＦ１由来の新規のＴＡＤおよびＴＡＤ相互作用モチーフが与える遺伝子転写の増加は少ないことも見出された。

【００９３】

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

【００９４】

ＩＩ．省略字

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

【００９５】

ＩＩＩ．用語

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

【００９６】

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

【００９７】

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

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

【００９８】

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

【００９９】

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

【０１００】

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

【０１０１】

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

【０１０２】

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

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

【０１０３】

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

【０１０４】

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

【０１０５】

核酸分子は、当業者であれば容易に認識するように、化学的にもしくは生化学的に改変されていることもあれば、または非天然のもしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有していることもある。そのような改変には、例えば、標識、メチル化、天然に存在するヌクレオチドのうちの１つまたは複数の類似物での置換、ヌクレオチド間改変（例えば、非荷電連鎖、例えば、メチルホスホン酸、リン酸トリエステル、ホスホロアミド酸、カルバミン酸、等；荷電連鎖、例えば、ホスホロチオエート、ジチオリン酸、等；懸垂部分、例えば、ペプチド；インターカレーター、例えば、アクリジン、ソラレン、等；キレーター；アルキル化剤；および改変連鎖、例えば、アルファーアノマー核酸、等）が含まれる。用語「核酸分子」には、一本鎖、二本鎖、部分的二重鎖、三重鎖、ヘアピン、環状、およびパドロック（padlocked）立体構造を含む、任意のトポロジー立体構造も含まれる。

【０１０６】

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

【０１０７】

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

照されたい。

【０１０８】

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

【０１０９】

特定のストリンジェンシー度をもたらすハイブリダイゼーション条件は、好ましいハイブリダイゼーション法の性質およびハイブリダイズする核酸配列の組成と長さに応じて変化する。一般的には、ハイブリダイゼーション温度およびハイブリダイゼーションバッファーのイオン強度（特に、Na^+および／またはMg^{++}濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに寄与するが、洗浄回数もストリンジェンシーに影響する。特定のストリンジェンシー度を得るのに必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算は当業者には公知であり、例えば、Sambrook et al. (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11;およびHames and Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985で考察されている。核酸のハイブリダイゼーションに関するさらに詳細な指示と手引きは、例えば、Tijssen, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993;およびAusubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995に見ることができる。

【０１１０】

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

【０１１１】

特定の実施形態では、ストリンジェントな条件は、ＰｅｒｆｅｃｔＨｙｂ（商標）プラスハイブリダイゼーションバッファー（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）中６５℃で１時間のハイブリダイゼーション、続いて０．１×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ中６５℃での４０分間連続洗浄である。

【０１１２】

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

しかし、ヌクレオチド配列は作動可能に連結されるのに連続している必要はない。

【０１１３】

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

【０１１４】

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

【０１１５】

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

【０１１６】

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

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

【０１１７】

「誘導性」プロモーターは、環境制御下にあることがあるプロモーターでもよい。Ward et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366を参照されたい。誘導性プロモーターにより転写を開始することができる環境条件の例には、例えば、限定せずに、嫌気性条件および光の存在が含まれる。誘導性プロモーターを使用すれば、転写速度は誘導物質に応答して増加する。例示的な誘導性プロモーターには、銅に応答するＡＣＥＩ系由来のプロモーター、ベンゼンスルホンアミド除草剤解毒剤（herbicide safener）に応答するトウモロコシ由来のＩｎ２遺伝子、Ｔｎ１０由来のＴｅｔリプレッサー、およびその転写活性が糖質コルチコステロイドホルモンにより誘導することができるステロイドホルモン遺伝子由来の誘導性プロモーター（Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１１８】

組織特異的、組織優先的、細胞型特異的、および誘導性プロモーターは、「非構成的」プロモーターのクラスを構成する。「構成的」プロモーターは、大半の環境条件下で活性であることができるプロモーターである。例示的な構成的プロモーターには、ＣａＭＶ由来の３５Ｓプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、イネアクチン遺伝子由来のプロモーター、ユビキチンプロモーター、ｐＥＭＵ、ＭＡＳ、トウモロコシＨ３ヒストンプロモーター、およびＡＬＳプロモーター、セイヨウアブラナ（Brassica napus）ＡＬＳ３構造遺伝子の５’側Ｘｂａｌ／ＮｃｏＩ断片（または前記Ｘｂａｌ／ＮｃｏＩ断片へのヌクレオチド配列類似性）（国際ＰＣＴ出願第ＷＯ９６／３０５３０号）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１１９】

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

【０１２０】

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

【０１２１】

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

【０１２２】

比較のために配列をアライメントさせるための方法は当技術分野では周知である。様々なプログラムおよびアライメントアルゴリズムが、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet et al. (1988

) 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。配列アライメント法および相同性計算の詳細な検討は、例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10に見出すことができる。

【０１２３】

国立バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ（商標）、Altschul et al. (1990)）は、いくつかの配列解析プログラムと接続して使用するために、国立バイオテクノロジー情報センター（Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）を含むいくつかの供給源からおよびインターネット上で入手可能である。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法の説明は、インターネット上のＢＬＡＳＴ（商標）の「ヘルプ」欄で入手可能である。核酸配列の比較では、ＢＬＡＳＴ（商標）（Ｂｌａｓｔｎ）プログラムの「Ｂｌａｓｔ２配列」機能をデフォルトパラメータを使用して用いることができる。基準配列にはるかに大きな類似性を有する核酸配列は、この方法により評価される場合には、百分率同一性の増加を示すことになる。

【０１２４】

ヌクレオチド配列に関して本明細書で使用される場合、用語「実質的に同一の」とは、８５％を超えて同一である配列のことであってもよい。例えば、実質的に同一のヌクレオチド配列は、基準配列に少なくとも８５．５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一であってもよい。

【０１２５】

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

【０１２６】

いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の脂肪族アミノ酸の、第二の異なる脂肪族アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がＧｌｙ、Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｖａｌ、およびＭｅｔのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｖａｌ、およびＭｅｔから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。特定の例では、第一のアミノ酸がＧｌｙ、Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、およびＶａｌのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、およびＶａｌから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。疎水性脂肪族アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＡｌａ、Ｐｒｏ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、およびＶａｌのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＡｌａ、Ｐｒｏ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、およびＶａｌから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の芳香族アミノ酸の、第二の異なる芳香族アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がＨｉｓ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、およびＴｙｒのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＨｉｓ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、およびＴｙｒから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。非荷電芳香族アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＰｈｅ、Ｔｒｐ、およびＴｙｒのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＰｈｅ、Ｔｒｐ、およびＴｙｒから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

【０１２８】
いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の疎水性アミノ酸の、第二の異なる疎水性アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がＡｌａ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、およびＴｒｐのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＡｌａ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、およびＴｒｐから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。非芳香族、疎水性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＡｌａ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、およびＭｅｔのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＡｌａ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、およびＭｅｔから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。
【０１２９】
いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の極性アミノ酸の、第二の異なる極性アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、およびＧｌｕのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、およびＧｌｕから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。非荷電、極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、およびＰｒｏのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、およびＰｒｏから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。荷電、極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＨｉｓ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、およびＧｌｕのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＨｉｓ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、およびＧｌｕから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。荷電、極性アミノ酸の置換を伴う追加の例では、第一のアミノ酸がＡｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、およびＧｌｕのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＡｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、およびＧｌｕから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。正荷電（塩基性）、極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＨｉｓ、Ａｒｇ、およびＬｙｓのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＨｉｓ、Ａｒｇ、およびＬｙｓから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。正に荷電した極性アミノ酸の置換を伴う追加の例では、第一のアミノ酸がＡｒｇまたはＬｙｓである場合、この第一のアミノ酸はＡｒｇおよびＬｙｓのうちのもう一方のアミノ酸により置き換えられてもよい。負に荷電した（酸性）極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＡｓｐまたはＧｌｕである場合、この第一のアミノ酸はＡｓｐおよびＧｌｕのうちのもう一方のアミノ酸により置き換えられてもよい。正に荷電した極性アミノ酸以外の極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｓｐ、およびＧｌｕのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｓｐ、およびＧｌｕから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。負に荷電した極性アミノ酸以外の極性アミノ酸の置換を伴う特定の例では、第一のアミノ酸がＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、およびＬｙｓのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、およびＬｙｓから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。
【０１３０】
いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の電気的に中性のアミノ酸の、第二の異なる電気的に中性のアミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がＧｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｃｙｓ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、およびＴｙｒのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＧｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｃｙｓ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、およびＴｙｒから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。
【０１３１】
いくつかの実施形態では、保存的置換には、第一の非極性アミノ酸の、第二の異なる非

極性アミノ酸との置換が含まれる。例えば、第一のアミノ酸がＡｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｐｒｏ、およびＭｅｔのうちの１つである場合、この第一のアミノ酸はＡｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｐｒｏ、およびＭｅｔから選択される第二の異なるアミノ酸により置き換えられてもよい。

【０１３２】

多くの例では、第一のアミノ酸を置き換えるために保存的置換において使用される特定の第二のアミノ酸の選択は、第一および第二のアミノ酸の両方が属する前述のクラスの数を最大にするために行いうる。したがって、第一のアミノ酸がＳｅｒ（極性、非芳香族および電気的に中性のアミノ酸）である場合、第二のアミノ酸は別の極性アミノ酸（すなわち、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、またはＧｌｕ）、別の非芳香族アミノ酸（すなわち、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ａｌａ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｖａｌ、またはＭｅｔ）、または別の電気的に中性のアミノ酸（すなわち、Ｇｌｙ、Ｔｈｒ、Ｃｙｓ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、またはＴｙｒ）であってもよい。しかし、この場合の第二のアミノ酸はＴｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、およびＧｌｙのうちの１つであるのが好ましいことがある。なぜならば、これらのアミノ酸は極性、非芳香族性、および電気的中性に従ってすべての分類を共有しているからである。保存的置換において使用される特定の第二のアミノ酸を選択するのに場合により使用してもよい追加の基準は当技術分野では公知である。例えば、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、およびＧｌｙがＳｅｒの保存的置換において使用されるのに利用可能である場合、Ｃｙｓは望ましくない架橋および／またはジスルフィド結合の形成を回避するためには選択から除外するのがよい。同様に、Ｇｌｙは、アルキル側鎖を欠いているので、選択から除外するのがよい。この場合、Ｔｈｒは、例えば、側鎖ヒドロキシル基の機能性を保持するために選択してもよい。しかし、保存的置換において使用される特定の第二のアミノ酸の選択は、最終的には当業者の裁量に任せられる。

【０１３３】

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

【０１３４】

トランス活性化タンパク質：本明細書で使用される場合、用語「トランス活性化タンパク質」（または「トランス活性化因子」または「転写活性化因子タンパク質」または「転写活性化因子融合タンパク質」）とは、核酸エレメントに結合し、この核酸エレメントに作動可能に連結されているポリヌクレオチド（例えば、対象の遺伝子）の転写を開始または増強するポリペプチドのことである。ある種の生物原産であるトランス活性化タンパク質には、例えば、限定せずに、ジンクフィンガーＤＮＡ結合タンパク質、ＵＰＡ　ＤＮＡ結合ドメイン、ＧＡＬ４、およびＴＡＬが含まれる。本発明の特定の実施形態には、ＤＮＡ結合タンパク質由来の少なくとも１つのＤＮＡ結合ドメインおよび植物トランス活性化ドメイン由来の相互作用モチーフを含む合成融合タンパク質トランス活性化因子が含まれる。

【０１３５】

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

【０１３６】
形質転換：本明細書で使用される場合、用語「形質転換」とは、１つまたは複数の核酸分子（複数可）の細胞内への移入のことである。細胞は、核酸分子の細胞ゲノム内への組込みにより、またはエピソーム複製のどちらかにより、核酸分子が細胞によって安定的に複製されるようになると、細胞内に移入された核酸分子により「形質転換」される。本明細書で使用される場合、用語「形質転換」は、核酸分子をそのような細胞に導入することができるすべての技法を包含する。例には、ウイルスベクターでのトランスフェクション、プラスミドベクターでの形質転換、エレクトロポレーション（Fromm et al. (1986) Nature 319:791-3）、リポフェクション（Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7）、マイクロインジェクション（Mueller et al. (1978) Cell 15:579-85）、アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介移入（Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7）、直接ＤＮＡ取込み、および微粒子銃（Klein et al. (1987) Nature 327:70）が含まれるが、これらに限定されない。
【０１３７】
導入遺伝子：外来性核酸配列。いくつかの例では、導入遺伝子は、少なくとも１つの合成転写活性化因子融合タンパク質を含むポリペプチドをコードする配列であってよい。いくつかの例では、導入遺伝子は、少なくとも１つの植物ＴＡＤおよび／または少なくとも１つのバリアントＴＡＤを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードしていてもよい。いくつかの例では、導入遺伝子は対象の遺伝子（例えば、レポーター遺伝子、除草剤抵抗性を与える遺伝子、および農業的に重要な植物形質に寄与する遺伝子）をコードしていてもよい。これらのおよび他の例では、導入遺伝子は、導入遺伝子のコード配列に作動可能に連結された１つまたは複数の調節配列（例えば、プロモーター）を含有していてもよい。本開示の目的のために、用語「トランスジェニック」とは、生物（例えば、植物）を指すのに使用される場合、外来性核酸配列を含む生物のことである。いくつかの例では、外来性核酸配列を含む生物は、核酸配列が分子形質転換技法を経て導入された生物であってよい。他の例では、外来性核酸配列を含む生物は、核酸配列が、例えば、植物において遺伝子移入または他家受粉により導入された生物であってもよい。
【０１３８】
ベクター：本明細書で使用される場合、用語「ベクター」とは、例えば、形質転換細胞を産生するために細胞内に導入することができる核酸分子のことである。ベクターは、宿主細胞においてベクターを複製させる、複製起点などの核酸配列を含みうる。ベクターの例には、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ、および外来性ＤＮＡを細胞内に運ぶウイルスが含まれるが、これらに限定されない。ベクターは、１つまたは複数の遺伝子、アンチセンス分子、および／または選択可能マーカー遺伝子ならびに当技術分野で公知の他の遺伝要素も含んでいてよい。ベクターは細胞を形質導入する、形質転換する、または感染して、それによってベクターによりコードされた核酸分子および／またはタンパク質を細胞に発現させてもよい。ベクターは場合によって、核酸分子の細胞内への進入を達成するのを支援する物質（例えば、リポソーム、タンパク質被覆、等）を含む。
【０１３９】
特に示されるまたは暗示されることがなければ、用語「１つ（ａ）」、「１つ（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、本明細書で使用される場合「少なくとも１つ」を意味する。
【０１４０】
他に特に説明されなければ、本明細書で使用される専門用語および科学用語はすべて、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解されているのと同じ意味を有する。分子生物学における一般用語の定義は、例えば、Lewin B., Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9);およびMeyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見ることができる。

【０１４１】
ＩＶ．植物トランス活性化ドメイン由来の相互作用モチーフ
本開示は、新規の植物ＴＡＤおよびそれ由来のタンパク質－タンパク質相互作用モチーフ、ならびにそれをコードする核酸を提供する。植物タンパク質であるＥＲＦ２（シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana））、ＰＴＩ４（ジャガイモ（Solanum tuberosum））、ＡｔＥＲＦ１（シロイヌナズナ（A. thaliana））、ＯＲＣＡ２（ニチニチソウ（Catharanthus roseus））、ＤＲＥＢ１Ａ（シロイヌナズナ（A. thaliana））、ＣＢＦ１（シロイヌナズナ（A. thaliana））、およびＤＯＦ１（トウモロコシ（Zea mays））から同定され単離されたＴＡＤを使用して、いくつかの実施形態において異種ＴＡＤ内に「交換（swap）」されうる植物ＴＡＤ相互作用モチーフを同定した、またはこれらのＴＡＤを使用してバリアントＴＡＤ相互作用モチーフを産生させた。新たに同定された植物ＴＡＤ、その中の相互作用モチーフ、およびそのバリアントＴＡＤを特定の実施形態において使用すれば（例えば、合成転写活性化因子タンパク質に包含することにより）、対象の遺伝子に新しく望ましい発現調節制御を与えることができる。
【０１４２】
ＶＰ１６のＴＡＤ（Ｖ１６　ＴＡＤ）は特徴付けられており、前述の新規植物ＴＡＤおよび相互作用モチーフの構造領域は、ＶＰ１６　ＴＡＤにおける対応する構造との類似性により言及される。ＶＰ１６　ＴＡＤは２つのサブドメインに分割することができ、それぞれのサブドメインは、ＤＮＡ結合ドメインに繋ぎ止められると独立して自律的に転写を活性化することができる。ＶＰ１６サブドメインは、アミノサブドメイン（または「ＶＰ１６トランス活性化サブドメインＩ」または「$VP16_{412\sim456}$」）およびカルボキシルサブドメイン（または「ＶＰ１６トランス活性化サブドメインＩＩ」または「$VP16_{456\sim490}$」）と呼ばれることもある。ＶＰ１６はその相互作用ドメインを通じて、転写因子ＩＩＢ（ＴＦＩＩＢ）のｐ６２／Ｔｆｂ１サブユニットを含む、転写に関与するいくつかの標的タンパク質と相互作用する。
【０１４３】
ＶＰ１６の活性は、ＴＡＤ内の酸性残基だけではなく、疎水性芳香族アミノ酸にも依存している。例えば、Cress and Triezenberg (1991) Science 251(4989):87-90を参照されたい。しかし、酸性ＶＰ１６　ＴＡＤは、酸性ＴＡＤにおける規則的二次構造の欠如のせいで、他の多くのポリペプチド配列よりも変異誘発に対して寛容性がありうる（Sigler (1988) Nature 333:210-2）。ＶＰ１６　ＴＡＤサブドメインの不定形の性質は、ＴＡＤが様々な結合パートナーとの複数のタンパク質／タンパク質相互作用を媒介するのに寄与している可能性があり（Dyson and Wright (2002) Curr. Opin. Struct. Biol. 12(1):54-60）、ＴＡＤサブドメインは、溶液中に遊離している場合よりも標的タンパク質に結合している場合のほうがより秩序立った構造（例えば、短いαヘリックス（Langlois et al. (2008)、上記））をとる可能性がある。例えば、Garza et al. (2009) Life Sci. 84(7-8):189-93; Jonker et al. (2005) Biochemistry 44(3):827-39; Langlois et al. (2008)、上記を参照されたい。
【０１４４】
いくつかの実施形態には、配列番号１０～１６からなる群から選択される植物ＴＡＤ相互作用モチーフを含む合成転写活性化因子タンパク質が含まれる。いくつかの例示的な合成転写活性化因子タンパク質は、植物ＴＡＤ相互作用モチーフを含み、そのようなタンパク質は、例えば、限定せずに、配列番号２～８および配列番号１００～１０６を含む配列を有しうる。植物ＴＡＤ相互作用モチーフを含む追加の例示的なＴＡＤには、天然のトランス活性化因子ＴＡＤに含まれる天然のＴＡＤ相互作用モチーフ配列を配列番号１０～１６のうちの１つで置き換えることにより操作されたＴＡＤが含まれる。
【０１４５】
本発明のいくつかの実施形態は、保存的アミノ酸置換および／または相同相互作用モチーフ中の類似する位置に見出されるアミノ酸（例えば、基準ＴＡＤ相互作用モチーフを含む天然のタンパク質のオルソログ由来の）での置換を含むバリアントＴＡＤ相互作用モチ

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

【０１４６】

したがって、いくつかの実施形態には、バリアントＴＡＤ相互作用モチーフを含む合成転写活性化因子タンパク質が含まれる。いくつかの例では、バリアントＴＡＤ相互作用モチーフは、配列番号１０～１６のうちの１つのバリアントであってもよい。バリアントＴＡＤ相互作用モチーフは天然のＴＡＤ相互作用配列のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むが、この配列中の１つまたは複数のアミノ酸は、異なる相同ＴＡＤにおける対応する位置に見出されるアミノ酸に変更されている。バリアントＴＡＤ相互作用モチーフは天然のＴＡＤ相互作用配列のアミノ酸配列を有するポリペプチドも含むが、この配列における１つまたは複数のアミノ酸では保存的置換が行われている。バリアントＴＡＤ相互作用モチーフは、例えば、限定せずに、基準ＴＡＤ相互作用モチーフ配列（例えば、配列番号１０～１６から選択される配列）に少なくとも９５％同一である、基準配列に少なくとも９０％同一である、基準配列に少なくとも８５％同一である、基準配列に少なくとも８０％同一である、基準配列に少なくとも７５％同一である、基準配列に少なくとも７０％同一である、基準配列に少なくとも６５％同一である、基準配列に少なくとも６０％同一である、基準配列に少なくとも５５％同一である、基準配列に少なくとも５０％同一である、または基準配列に５０％未満で同一であってもよい。

【０１４７】

バリアントＴＡＤ相互作用モチーフには、例えば、限定せずに、配列番号１７～２２（例示的なバリアントＥＲＦ２　ＴＡＤ相互作用モチーフ）、配列番号２３～２８（例示的なバリアントＰＴＩ４　ＴＡＤ相互作用モチーフ）、配列番号２９～３４（例示的なバリアントＡｔＥＲＦ１　ＴＡＤ相互作用モチーフ）、配列番号３５～４０（例示的なバリアントＯＲＣＡ２　ＴＡＤ相互作用モチーフ）、配列番号４１～４６（例示的なバリアントＤＲＥＢ１Ａ　ＴＡＤ相互作用モチーフ）、配列番号４７～５２（例示的なバリアントＣＢＦ１　ＴＡＤ相互作用モチーフ）、および配列番号５３～５８（例示的なバリアントＤＯＦ１　ＴＡＤ相互作用モチーフ）が含まれる。バリアントＴＡＤ相互作用モチーフを含む例示的なＴＡＤには、天然のトランス活性化因子ＴＡＤに含まれるＴＡＤ相互作用モチーフ配列を配列番号１７～５８からなる群から選択されるバリアントＴＡＤで置き換えることにより操作されたＴＡＤが含まれる。例えば、バリアントＴＡＤ相互作用モチーフを含む例示的なＴＡＤには配列番号１０７～１２０が含まれる。

【０１４８】

前述のポリペプチドのいずれでもおよびすべてをコードする核酸は、ポリペプチドのアミノ酸配列から直ちに同定可能である。例えば、ＴＡＤまたはＴＡＤ相互作用モチーフは、転写されてｍＲＮＡを生成し続いてＴＡＤまたはＴＡＤ相互作用モチーフのアミノ酸に翻訳される天然のポリヌクレオチドによりコードされていてもよい。しかし、当業者であれば、遺伝コードの縮重のせいで、同一のポリペプチドをコードする他に多くの等価のポリヌクレオチドが存在することを認識している。バリアントＴＡＤ相互作用モチーフ（例えば、配列番号１７～５８）は、所望の特定のバリアントのアミノ酸配列からＲＮＡコドン表を参照して容易に決定可能であるポリヌクレオチドによりコードされていてもよい。特定の実施形態では、ＴＡＤ相互作用モチーフ（またはそのバリアント）をコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、例えば、ＴＡＤ相互作用モチーフを含むタンパク質（例えば、融合タンパク質）の発現を最大化または最適化するように、宿主細胞のコドン使用に従って組み立てられるのが望ましいことがある。

【０１４９】

Ｖ．融合タンパク質転写活性化因子

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

【０１５０】

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

【０１５１】

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

【０１５２】

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

【０１５３】

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

【０１５４】
いくつかの例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）におけるモジュラートランス活性化因子であるＧＡＬ４由来のＤＮＡ結合ドメインを含むが、このトランス活性化因子は他の多くの生物におけるトランス活性化因子としても機能する。例えば、Sadowski et al. (1988) Nature 335:563-4を参照されたい。この調節系では、出芽酵母（S. cerevisiae）におけるガラクトース代謝経路の酵素をコードする遺伝子の発現は、利用可能な炭素源により厳密に調節されている（Johnston (1987) Microbiol. Rev. 51:458-76）。これらの代謝酵素の転写制御は、正の調節タンパク質であるＧＡＬ４とＧＡＬ４が特異的に結合する１７ｂｐ対称ＤＮＡ配列（ＵＡＳ）の間の相互作用により媒介される。

【０１５５】
天然のＧＡＬ４は８８１アミノ酸残基からなり、分子量は９９ｋＤａである。ＧＡＬ４は機能的に自律したドメインを含み、その複合活性がインビボでのＧＡＬ４の活性を占める（Ma & Ptashne (1987) Cell 48:847-53); Brent & Ptashne (1985) Cell 43(3 Pt 2): 729-36）。ＧＡＬ４のＮ末端６５アミノ酸がＧＡＬ４　ＤＮＡ結合ドメインを構成する（Keegan et al. (1986) Science 231:699-704; Johnston (1987) Nature 328:353-5）。配列特異的結合は、ＤＮＡ結合ドメインに存在する６個のＣｙｓ残基により配位される２価陽イオンの存在を必要とする。配位陽イオン含有ドメインはＤＮＡヘリックスの主溝との直接接触を介して１７ｂｐ　ＵＡＳのそれぞれの末端で保存されたＣＣＧトリプレットと相互作用してこれを認識する（Marmorstein et al. (1992) Nature 356:408-14）。タンパク質のＤＮＡ結合機能が、活性化ドメインが転写を指示することができるように、Ｃ末端転写活性化ドメインをプロモーターの近傍に配置する。

【０１５６】
合成転写活性化因子融合タンパク質に含まれうる追加のＤＮＡ結合ドメインには、例えば、限定せずに、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子由来の結合配列、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作される合成結合配列（例えば、ＵＰＡ　ＤＮＡ結合ドメイン；配列番号８９）、ＴＡＬ、ＬｅｘＡ（例えば、Brent & Ptashne (1985)上記を参照されたい）、ＬａｃＲ（例えば、Labow et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:3343-56; Baim et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(12):5072-6を参照されたい）、ステロイドホルモン受容体（Elliston et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:11517-121）、Ｔｅｔリプレッサー（米国特許第６，２７１，３４１号）およびテトラサイクリン（Ｔｃ）の存在下ではｔｅｔオペレーター配列に結合するがＴｃの非存在下では結合しない変異Ｔｅｔリプレッサー、ならびにＧＡＬ４、ホルモン受容体およびＶＰ１６の融合物を利用するWang et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(17):8180-4に記載の調節系の構成成分が含まれる。

【０１５７】
いくつかの例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、複数のＴＡＤ相互作用モチーフを含む。例えば、限定せずに、合成転写活性化因子融合タンパク質は２個、３個、４個、またはそれよりも多いＴＡＤ相互作用ドメインを含みうる。いくつかの例では、合成転写活性化因子融合タンパク質は、複数のＤＮＡ結合ドメインを含む。例えば、限定せずに、合成転写活性化因子融合タンパク質は２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個またはそれよりも多いＤＮＡ結合ドメインを含みうる。

【０１５８】
ＶＩ．融合タンパク質転写活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子
いくつかの実施形態では、本開示は、植物ＴＡＤ相互作用モチーフ、バリアントＴＡＤ相互作用モチーフ、植物ＴＡＤ、またはバリアントＴＡＤをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。そのような核酸分子は、ＤＮＡ結合ドメインをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチド配列をさらに含みうる。例えば、いくつかの実施形態における核酸は、２つのポリヌクレオチド配列が単一の融合タンパク質の一部として転写されるように、ＤＮＡ結合ドメインをコードする第二のポリヌクレオ

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

【０１５９】

本発明のいくつかの実施形態において提供される核酸分子では、植物ＴＡＤ相互作用モチーフ、バリアントＴＡＤ相互作用モチーフ、植物ＴＡＤ、またはバリアントＴＡＤをコードする第一のポリヌクレオチド配列の最後のコドンと、ＤＮＡ結合ドメインをコードする第二のポリヌクレオチド配列の最初のコドンは、例えば、イントロンまたは「ＳＴＯＰ」をコードすることなくいかなる数のヌクレオチドトリプレットで分離されていてもよい。同様に、ＤＮＡ結合ドメインをコードする第一のポリヌクレオチド配列をコードするヌクレオチド配列の最後のコドンと植物ＴＡＤ相互作用モチーフ、バリアントＴＡＤ相互作用モチーフ、植物ＴＡＤ、またはバリアントＴＡＤをコードする第二のポリヌクレオチド配列の最初のコドンは、いかなる数のヌクレオチドトリプレットで分離されていてもよい。これらのおよび追加の実施形態では、植物ＴＡＤ相互作用モチーフ、バリアントＴＡＤ相互作用モチーフ、植物ＴＡＤ、またはバリアントＴＡＤをコードする第一のポリヌクレオチド配列の最後（すなわち、核酸配列のもっとも３’側）の最後のコドンとＤＮＡ結合ドメインをコードする第二のポリヌクレオチド配列は、それに直に連続する追加のポリヌクレオチドコード配列の最初のコドンとフェイズレジスター（phase-register）で融合されていてもよく、または合成ヌクレオチドリンカー（例えば、融合を実現するのに使用されていた可能性のあるヌクレオチドリンカー）によりコードされる配列などの短いペプチド配列だけによりそれから分離されていてもよい。そのような追加のポリヌクレオチド配列の例には、例えば、限定せずに、タグ、標的ペプチド、および酵素的切断部位が含まれる。同様に、第一および第二のポリヌクレオチド配列のもっとも５’側（核酸配列において）の最初のコドンは、それに直に連続する追加のポリヌクレオチドコード配列の最後のコドンとフェイズレジスターで融合されていてもよく、または短いペプチド配列だけによりそれから分離されていてもよい。

【０１６０】

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

【０１６１】

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

【０１６２】

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

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

【０１６３】

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

【０１６４】

ＶＩＩ．融合タンパク質転写活性化因子の発現

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

【０１６５】

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

【０１６６】

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

【０１６７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＤＮＡ結合ドメインに作動可能に連結された、少なくとも１つの植物ＴＡＤ相互作用モチーフ、バリアントＴＡＤ相互作用モチーフ、植物ＴＡＤ、またはバリアントＴＡＤを含む融合タンパク質をコードする１つまたは複数のヌクレオチド配列（複数可）に作動可能に連結された調節配列は、核酸分子が増幅されることになる細菌細胞、または核酸分子が発現されることになる植物細胞などの宿主細胞において機能するプロモーター配列でもよい。

【０１６８】

いくつかの実施形態に従った核酸分子において使用するのに適したプロモーターには、誘導性、ウイルス、合成、または構成的であるプロモーターが含まれ、そのすべてが当技術分野では周知である。本発明の実施形態において有用でありうるプロモーターの非限定的例は、米国特許第６，４３７，２１７号（トウモロコシＲＳ８１プロモーター）、米国特許第５，６４１，８７６号（イネアクチンプロモーター）、米国特許第６，４２６，４４６号（トウモロコシＲＳ３２４プロモーター）、米国特許第６，４２９，３６２号（トウモロコシＰＲ－１プロモーター）、米国特許第６，２３２，５２６号（トウモロコシＡ３プロモーター）、米国特許第６，１７７，６１１号（構成的トウモロコシプロモーター）；米国特許第５，３２２，９３８号、米国特許第５，３５２，６０５号、米国特許第５，３５９，１４２号、および米国特許第５，５３０，１９６号（３５Ｓプロモーター）；米国特許第６，４３３，２５２号（トウモロコシＬ３オレオシンプロモーター）、米国特許第６，４２９，３５７号（イネアクチン２プロモーター、およびイネアクチン２イントロン）、米国特許第６，２９４，７１４号（光誘導性プロモーター）、米国特許第６，１４０，０７８号（塩誘導性プロモーター）、米国特許第６，２５２，１３８号（病原体誘導性プロモーター）、米国特許第６，１７５，０６０号（亜リン酸欠乏誘導性プロモーター）、米国特許第６，３８８，１７０号（二方向性プロモーター）、米国特許第６，６３５，８０６号（ガンマコイキシン（coixin）プロモーター）、ならびに米国特許出願第０９／７５７，０８９号（トウモロコシ葉緑体アルドラーゼプロモーター）により提供される。

【０１６９】

追加の例示的なプロモーターには、ノパリンシンターゼ（ＮＯＳ）プロモーター（Ebert et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9）、オクトピンシンターゼ（ＯＣＳ）プロモーター（アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）の腫瘍誘発プラスミド上に担持されている）、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）１９Ｓプロモーターなどのカリモウイルスプロモーター（Lawton et al. (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24）、ＣａＭＶ　３５Ｓプロモーター（Odell et al. (1985) Nature 313:810-2）、ゴマノハグサ（figwort）モザイクウイルス３５Ｓプロモーター（Walker et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8）、スクロースシンターゼプロモーター（Yang and Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8）、Ｒ遺伝子複合体プロモーター（Chandler et al. (1989) Plant Cell 1:1175-83）、クロロフィルａ／ｂ結合タンパク質遺伝子プロモーター、ＣａＭＶ３５Ｓ（米国特許第５，３２２，９３８号、米国特許第５，３５２，６０５号、米国特許第５，３５９，１４２号、および米国特許第５，５３０，１９６号）、ＦＭＶ３５Ｓ（米国特許第６，０５１，７５３号、および米国特許第５，３７８，６１９号）、ＰＣ１ＳＶプロモーター（米国特許第５，８５０，０１９号）、ＳＣＰ１プロモーター（米国特許第６，６７７，５０３号）、およびＡＧＲｔｕ．ｎｏｓプロモーター（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｖ０００８７、Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan et al. (1983) Nature 304:184-7）が含まれる。

【０１７０】

特定の実施形態では、本発明の核酸分子は組織特異的プロモーターを含みうる。組織特異的プロモーターは、生物のその他の組織と比べて、プロモーターが特異的である組織において作動可能に連結されたヌクレオチド配列のより高いレベルの転写を指示するヌクレオチド配列である。組織特異的プロモーターの例には限定せずに、タペータム特異的プロモーター、葯特異的プロモーター、花粉特異的プロモーター（例えば、米国特許第７，１４１，４２４号および国際ＰＣＴ出願第ＷＯ　９９／０４２５８７号を参照されたい）、胚珠特異的プロモーター（例えば、米国特許出願第２００１／０４７５２５　Ａ１号を参照されたい）、果実特異的プロモーター（例えば、米国特許第４，９４３，６７４号および米国特許第５，７５３，４７５号を参照されたい）、および種子特異的プロモーター（例えば、米国特許第５，４２０，０３４号および米国特許第５，６０８，１５２号を参照されたい）が含まれる。いくつかの実施形態では、発生段階特異的プロモーター（例えば

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

【０１７１】

いくつかの実施形態で核酸分子に作動可能に連結されうる追加の調節配列には、プロモーター配列と翻訳リーダー配列として機能するコード配列の間に位置する５’ＵＴＲが含まれる。翻訳リーダー配列は完全にプロセシングされたｍＲＮＡに存在し、一次転写物のプロセシングおよび／またはＲＮＡ安定性に影響しうる。翻訳リーダー配列の例には、トウモロコシおよびペチュニア熱ショックタンパク質リーダー（米国特許第５，３６２，８６５号）、植物ウイルスコートタンパク質リーダー、植物ルビスコリーダー、ならびにその他が含まれる（例えば、Turner and Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36を参照されたい）。５’ＵＴＲの非限定的例は、ＧｍＨｓｐ（米国特許第５，６５９，１２２号）、ＰｈＤｎａＫ（米国特許第５，３６２，８６５号）、ＡｔＡｎｔ１、ＴＥＶ（Carrington and Freed (1990) J. Virol. 64:1590-7）、およびＡＧＲｔｕｎｏｓ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｖ０００８７；およびBevan et al. (1983)、上記）により提供される。

【０１７２】

いくつかの実施形態で核酸分子に作動可能に連結されうる追加の調節配列には、３’非翻訳配列、３’転写終止領域、またはポリアデニル化領域も含まれる。これらの配列はヌクレオチド配列の下流に位置する遺伝要素であり、ポリアデニル化シグナル、および／または転写もしくはｍＲＮＡプロセシングに影響することができる他の調節シグナルを与えるポリヌクレオチドが含まれる。ポリアデニル化シグナルはｍＲＮＡ前駆体の３’末端へのポリアデニル酸ヌクレオチドの付加を引き起こすように植物において機能する。ポリアデニル化配列は、種々の植物遺伝子に、またはＴ－ＤＮＡ遺伝子に由来することが可能である。３’転写終止領域の非限定的例はノパリンシンターゼ３’領域である（ｎｏｓ　３’；Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7）。様々な３’非翻訳領域の使用の例は、Ingelbrecht et al. (1989) Plant Cell 1:671-80に提供されている。ポリアデニル化シグナルの非限定的例には、エンドウ（Pisum sativum）ＲｂｃＳ２遺伝子（Ｐｓ．ＲｂｃＳ２－Ｅ９；Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-9）およびＡＧＲｔｕ．ｎｏｓ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号E01312）由来のシグナルが含まれる。

【０１７３】

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

【０１７４】

本発明の組換え核酸分子またはベクターは、植物細胞などの形質転換された細胞に選択可能な表現型を与える選択可能マーカーを含みうる。選択可能マーカーを使用して、本発明の核酸分子を含む植物または植物細胞を選択することもできる。マーカーは、殺生物剤抵抗性、抗生物質抵抗性（例えば、カナマイシン、ジェネテシン（Ｇ４１８）、ブレオマイシン、およびハイグロマイシン）、または除草剤抵抗性（例えば、グリホサート）をコードしうる。選択可能マーカーの例には、カナマイシン抵抗性を与え、例えば、カナマイシンおよびＧ４１８を使用して選択することができるｎｅｏ遺伝子、ビアラホス抵抗性を与えるｂａｒ遺伝子、グリホサート抵抗性を与える変異ＥＰＳＰシンターゼ遺伝子、ブロモキシニルに対する抵抗性を与えるニトリラーゼ遺伝子、イミダゾリノンまたはスルホニル尿素抵抗性を与える変異アセト乳酸シンターゼ遺伝子（ＡＬＳ）、およびメトトレキサート抵抗性ＤＨＦＲ遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。例えば、限定せずに、アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノトリシン、ピューロマイシン、スペクチノマイシン、リファンピシン、ストレプトマイシン、およびテトラサイクリンを含む化学薬剤に対する抵抗性を与える複数の選択可能マーカーが利用可能である。そのような選択可能マーカーの例は、例えば、米国特許第５，５５０，３１８号、

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

【０１７５】

本発明の核酸分子またはベクターは、スクリーニング可能マーカーもまたは代わりに含みうる。スクリーニング可能マーカーを使用すれば発現をモニターすることができる。例示的なスクリーニング可能マーカーには、様々な発色基質が知られている酵素をコードするβグルクロニダーゼまたはｕｉｄＡ遺伝子（ＧＵＳ）（Jefferson et al. (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405）、植物組織においてアントシアニン色素（赤色）の生成を調節する産物をコードするＲ－ｌｏｃｕｓ遺伝子（Dellaporta et al. (1988) “Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac.” In 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson and R. Appels, eds., Plenum, NY (pp. 263-82)）、βラクタマーゼ遺伝子（Sutcliffe et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3737-41）、様々な発色基質が知られている酵素をコードする遺伝子（例えば、ＰＡＤＡＣ、発色セファロスポリン）、ルシフェラーゼ遺伝子（Ow et al. (1986) Science 234:856-9）、発色カテコールを転換するカテコールジオキシゲナーゼをコードするｘｙｌＥ遺伝子（Zukowski et al. (1983) Gene 46(2-3):247-55）、アミラーゼ遺伝子（Ikatu et al. (1990) Bio/Technol. 8:241-2）、チロシンをＤＯＰＡおよびドパキノンにまで酸化し、次にメラニンに凝縮することができる酵素をコードするチロシナーゼ遺伝子（Katz et al. (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-14）、およびαガラクトシダーゼが含まれる。

【０１７６】

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

【０１７７】

植物中に発現ベクターを導入するためのもっとも広く利用されている方法は、アグロバクテリウム（Agrobacterium）の天然の形質転換システムに基づいている。Ａ．ツメファシエンス（A. tumefaciens）およびＡ．リゾゲネス（A. rhizogenes）は、植物細胞を遺伝的に形質転換する植物病原性土壌細菌である。Ａ．ツメファシエンス（A. tumefaciens）およびＡ．リゾゲネス（A. rhizogenes）のそれぞれのＴｉおよびＲｉプラスミドは、植物の遺伝的形質転換の原因となる遺伝子を担持している。Ｔｉ（腫瘍誘発性）プラスミドはＴ－ＤＮＡとして知られる大きなセグメントを含有しており、このセグメントは形質転換された植物に移される。Ｔｉプラスミドの別のセグメントであるｖｉｒ領域はＴ－ＤＮＡ移入の原因である。Ｔ－ＤＮＡ領域は、それぞれが末端反復ヌクレオチド配列で構成

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

【０１７８】

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

【０１７９】

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

【０１８０】

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

【０１８１】

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

【０１８２】

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

ドプライマーを使用する、例えば、ＰＣＲ増幅により分析することができる。ＰＣＲ遺伝子型判定は、ゲノム内に組み込まれた対象の核酸分子を含有すると予測される単離された宿主植物組織由来のゲノムＤＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅、続いてＰＣＲ増幅産物の標準クローニングおよび配列解析が含まれるがこれらに限定されないと理解されている。ＰＣＲ遺伝子型判定の方法は十分に記載されており（例えば、Rios, G. et al. (2002) Plant J. 32:243-53を参照されたい）、細胞培養物を含む、任意の植物種または組織型に由来するゲノムＤＮＡに適用してもよい。

【０１８３】

アグロバクテリウム（Agrobacterium）依存性形質転換法を使用して形成されるトランスジェニック植物は典型的には、１つの染色体に挿入された単一組換えＤＮＡ配列を含有する。単一組換えＤＮＡ配列は「トランスジェニックイベント」または「組込みイベント」と呼ばれる。そのようなトランスジェニック植物は挿入されたＤＮＡ配列に対してヘテロ接合性である。いくつかの実施形態では、導入遺伝子に関してホモ接合性であるトランスジェニック植物は、単一外来性遺伝子配列を含有する独立した分離個体トランスジェニック植物、例えば、F_0植物をそれ自体と性的に交配させて（自家受粉）F_1種子を生産することにより得られる。生産されたF_1種子の４分の１は、導入遺伝子に関してホモ接合性になる。F_1種子が出芽すれば、典型的には、ヘテロ接合体とホモ接合体の区別を可能にするＳＮＰアッセイまたは熱増幅アッセイ（すなわち、接合状態アッセイ）を使用してヘテロ接合性について試験することが可能である植物をもたらす。

【０１８４】

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

【０１８５】

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

【０１８６】

ＶＩＩＩ．融合タンパク質転写活性化因子を含む植物材料

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

【０１８７】
少なくとも１つの植物ＴＡＤ相互作用モチーフ（および／またはバリアントＴＡＤ相互作用モチーフ）および少なくとも１つのＤＮＡ結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むトランスジェニック植物または植物材料は以下の特徴、植物の細胞における融合タンパク質の発現、植物の細胞の色素体における融合タンパク質の発現、植物の細胞の核における融合タンパク質の発現、植物の細胞における融合タンパク質の局在化、植物の細胞のゲノムにおけるヌクレオチド配列の組込み、植物の細胞の染色体外ＤＮＡにおけるこのヌクレオチド配列の存在、および／または植物の細胞におけるこのヌクレオチド配列に対応するＲＮＡ転写物の存在のうちの１つまたは複数をいくつかの実施形態において示しうる。そのような植物は、コードされた融合タンパク質の発現以外の１つまたは複数の望ましい形質をさらに有しうる。そのような形質には、その発現が植物の細胞における融合タンパク質により調節される、内在性またはトランスジェニックヌクレオチド配列の発現から生じる形質、例えば、限定せずに、昆虫、他の有害生物、および病原体に対する抵抗性；除草剤に対する耐性；増強された安定性、収率、または貯蔵寿命；環境耐性；医薬品製造；工業製品製造；ならびに栄養強化が含まれる。

【０１８８】
本発明に従ったトランスジェニック植物は、本発明の核酸分子で形質転換することができるいかなる植物でもよい。したがって、植物は双子葉植物でも単子葉植物でもよい。本方法において使用可能な双子葉植物の非限定的例には、シロイヌナズナ（Arabidopsis）、アルファルファ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、キャノーラ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、ワタ、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウマメ、コショウ、ピーナッツ、ジャガイモ、カボチャ（pumpkin）、ダイコン、ナタネ、ホウレンソウ、ダイズ、カボチャ（squash）、サトウダイコン、ヒマワリ、タバコ、トマト、およびスイカが含まれる。本方法において使用可能な単子葉植物の非限定的例には、トウモロコシ、タマネギ、イネ、モロコシ、コムギ、ライムギ、アワ、サトウキビ、カラスムギ、ライコムギ、スイッチグラス、およびシバクサが含まれる。本発明に従ったトランスジェニック植物はいかなる形態で使用してもまたは栽培してもよい。

【０１８９】
いくつかの実施形態は、少なくとも１つの植物ＴＡＤ相互作用モチーフ（および／またはバリアントＴＡＤ相互作用モチーフ）および少なくとも１つのＤＮＡ結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする１つまたは複数のヌクレオチド配列を含有する商品生産物、例えば、１つまたは複数のそのようなヌクレオチド配列を含有する組換え植物または種子から生産される商品生産物も提供する。少なくとも１つの植物ＴＡＤ相互作用モチーフ（および／またはバリアントＴＡＤ相互作用モチーフ）および少なくとも１つのＤＮＡ結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする１つまたは複数のヌクレオチド配列を含有する商品生産物には、例えば、限定せずに、食品生産物、粗挽き粉、油、または粉砕もしくは全粒粉またはそのような合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする１つもしくは複数のヌクレオチド配列を含む植物の種子が含まれる。１つまたは複数の商品または商品生産物における本発明の合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする１つまたは複数のヌクレオチド配列が検出されたら、この商品または商品生産物が、本発明の合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする１つまたは複数のヌクレオチド配列を含む植物から少なくとも一部は生産された事実上の証拠である。特定の実施形態では、本発明の商品生産物は、少なくとも１つの植物ＴＡＤ相互作用モチーフ（および／またはバリアントＴＡＤ相互作用モチーフ）および少なくとも１つのＤＮＡ結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸配列の検出可能な量を含む。いくつかの実施形態では、そのような商品生産物は、例えば、トランスジェニック植物を入手し、それから食物または餌を調製することにより生産しうる。

【０１９０】
いくつかの実施形態では、本発明の合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするヌ

クレオチド配列を含む導入遺伝子を含むトランスジェニック植物または種子は、ＲＮＡｉ分子に転写されるトランスジェニックイベント、殺虫タンパク質（例えば、バチルス・チューリンゲンシス（Bacillus thuringiensis）殺虫タンパク質）をコードする遺伝子、除草剤耐性遺伝子（例えば、グリホサートに対する耐性を与える遺伝子）、およびトランスジェニック植物において望ましい表現型（例えば、増加した収量、変化した脂肪酸代謝、または細胞質雄性不稔の回復）に寄与する遺伝子を限定せずに含む、そのゲノムにおける少なくとも１つの他のトランスジェニックイベントも含みうる。

【０１９１】

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

【０１９２】

ＩＸ．融合タンパク質転写活性化因子による発現の調節

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

【０１９３】

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

【０１９４】

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

【０１９５】

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

【０１９６】

本発明のいくつかの実施形態において、少なくとも１つの植物ＴＡＤ相互作用モチーフ（および／またはバリアントＴＡＤ相互作用モチーフ）および少なくとも１つのＤＮＡ結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下にある可能性のあるポリペプチドの非限定的例には、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、変異ＡＬＳ、およびＡＬＳの前駆体（例えば、米国特許第５，０１３，６５９号を参照されたい）；ＣＰ４　ＥＰＳＰＳまたはクラスＩＩＩ　ＥＰＳＰＳなどのＥＰＳＰＳ（例えば、米国特許第４，９７１，９０８号および米国特許第６，２２５，１１４号を参照されたい）；例えば、限定せずに、光合成、ならびに脂肪酸、アミノ酸、油、アロテノイド（arotenoid）、テルペノイド、およびデンプンの合成を含む、色素体において起こる生理的過程を改変する酵素が含まれる。特定の実施形態において合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下にある可能性のあるポリペプチドの他の非限定的例には、ゼアキサンチンエポキシダーゼ、コリンモノオキシゲナーゼ、フェロケラターゼ、オメガ３脂肪酸デサチュラーゼ、グルタミンシンセターゼ、デンプン修飾酵素、必須アミノ酸の合成に関与するポリペプチド、プロビタミンＡ、ホルモン、Ｂｔ毒素、およびタンパク質が含まれる。前述のペプチドをコードするヌクレオチド配列は当技術分野では入手可能であり、そのようなヌクレオチド配列は、少なくとも１つの植物ＴＡＤ相互作用モチーフ（および／またはバリアントＴＡＤ相互作用モチーフ）および作動可能に連結された部位に特異的に結合する少なくとも１つのＤＮＡ結合ドメインを含む合成転写活性化因子融合タンパク質の調節制御下で発現されるＤＮＡ結合ドメインの特異的結合部位に作動可能に連結されうる。

【０１９７】

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

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

【０１９８】

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

【０１９９】

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

（実施例）

【実施例１】

【０２００】

植物トランス活性化相互作用モチーフの同定

７つのタンパク質、ＰＴＩ４（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＣＦ５７８５７．１）、ＥＲＦ２（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿１９９５３３．１）、ＡｔＥＲＦ１（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿５６７５３０．４）、ＯＲＣＡ２（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＣＡＢ９３９４０．１）、ＤＲＥＢ１Ａ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿５６７７２０．１）、ＣＢＦ１（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿５６７７２１．１）、およびＤＯＦ１（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＰ＿００１１０５７０９．１）がＶＰ１６トランス活性化ドメイン（配列番号１）に相同であると同定された。ＶＰ１６トランス活性化ドメイン（配列番号１）のアミノ酸配列は、これらの推定植物転写活性化因子の領域と配列類似性を共有しており、ＶＰ１６配列を使用してそれぞれの活性化因子内でトランス活性化ドメインを位置付けた。これらの植物活性化因子タンパク質の同定されたトランス活性化ドメインは、配列番号２（ＰＴＩ４）、配列番号３（ＥＲＦ２）、配列番号４（ＡｔＥＲＦ１）、配列番号５（ＯＲＣＡ２）、配列番号６（ＤＲＥＢ１Ａ）、配列番号７（ＣＢＦ１）、および配列番号８（ＤＯＦ１）である。次に、ＶＰ１６トランス活性化サブドメインＩＩの相互作用モチーフ（図１、配列番号９）を使用して、植物トランス活性化ドメインから相互作用モチーフを位置付けた。図２は、ＶＰ１６と植物トランス活性化ドメインのアライメントを示しており、新規の相互作用モチーフは反転されている。

【実施例２】

【０２０１】

植物トランス活性化ドメインの同定された相互作用モチーフの改変

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

【０２０２】

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

された相互作用モチーフが生成されると我々は仮定した。

【０２０３】

ＥＲＦ２改変

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

【０２０４】

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

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

【実施例３】

【０２０５】

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

出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）レポーター株

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

【０２０６】

先ず、酵母ＳＳＡレポーターベクターであるｐＮｏｒＭＥＬ１（Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26(6):702-8）の２つの別々の断片がＰＣＲにより増幅された。第一の断片は酵母ＫａｎＭＸ発現カセットを含有し、それぞれに５’ＳｐｅＩ、ＢａｍＨＩ、ＮｈｅＩ、ＰａｃＩ、ＢｇｌＩＩ、ＫｐｎＩ、および３’ＥｃｏＲＩ制限部位を加える、プライマーであるＫａｎＭＸ－Ｆｏｒ（配列番号５９）およびＫａｎＭＸ－Ｒｅｖ（配列番号６０）を使用してｐＮｏｒＭＥＬ１から増幅された。第二の断片は、細菌複製起点により分離されている酵母ＨＯ遺伝子座（Voth et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29(12):E59-9）に外向きに面する相同性アームを含有し、プライマーであるＨＯ－Ｆｏｒ（配列番号６１）およびＨＯ－Ｒｅｖ（配列番号６２）を使用して増幅された。前記２つの断片は、ＥｃｏＲＩ／ＳｐｅＩで消化され、ライゲーションされてＫａｎＭＸ選択可能ＨＯターゲティングベクターを生成した。

【０２０７】

次に、ｐＭＥＬ１α２由来のＭＥＬ１発現カセット（Melcher et al. (2000) Gene 247(1-2):53-61）はＭＥＬ１－Ｆｏｒ（配列番号６３）およびＭＥＬ１－Ｒｅｖ（配列番号６４）で増幅されて、ＫａｎＭＸ選択可能ＨＯターゲティングベクターのＫｐｎＩ部位にクローニングされた。

【０２０８】
最後に、ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）結合部位（高親和性部位（High Affinity Site）を表して「ＨＡＳ」と呼ばれる）は外部ベンダー（ＤＮＡ２．０、Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ、ＣＡ）により新規に合成された。この部位はヒトＣＣＲ５遺伝子をターゲティングするジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）に対する結合部位を含有していた（Perez et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:808-16）。ＨＡＳ断片はプライマーであるＨＡＳ－Ｆｏｒ－Ｆ１（配列番号６５）およびＨＡＳ－Ｆｏｒ－Ｒ１（配列番号６６）を使用してＰＣＲ増幅され、ＭＥＬ１レポーター遺伝子の上流に位置する、ＫａｎＭＸ ＨＯ ＭＥＬ１ベクターのＢａｍＨＩ－ＰａｃＩ部位にクローニングされた。この最終ベクターはｐＨＯ－ｚＢＧ－ＭＥＬ１と命名された（図１０）。

【０２０９】
ｐＨＯ－ｚＢＧ－ＭＥＬ１はＮｏｔＩで直線化されて、ターゲティングのための隣接相同性アームを酵母ＨＯ遺伝子座に曝露させ、製造業者が示すプロトコールを使用して、出芽酵母（S. cerevisiae）株であるＢＹ４７４１ＭＡＴα（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）に形質転換された。手短に言えば、３ｍＬの対数期ＢＹ４７４１培養物はペレット化され、ＴＥＬバッファー（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ ＨＣＬ ｐＨ ８．０、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１００ｍＭ酢酸リチウム）中で洗浄された。酵母細胞ペレットは、３μｇの直線化されたｐＨＯ－ｚＢＧ－ＭＥＬ１を含有する３６０μＬの酵母形質転換液（３３．３％ ＰＥＧ－３３５０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）、０．１Ｍ酢酸リチウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、および１×ＴＥ中０．２ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ））に再懸濁され、４２℃で４０分間熱ショックを受けた。酵母細胞は、１ｍｇ／ＬのＧｅｎｅｔｉｃｉｎ（登録商標）（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を含有するＹＰＤプレート上での選択に先立って、ペレット化され、洗浄され、２時間富栄養培地で増殖させた。抵抗性クローンはＹＰＤ＋Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ（登録商標）プレート上で再画線され、その後の形質転換に使用された。

【０２１０】
酵母ＺＦＰ－転写活性化因子発現カセット構築
インフレームＣＣＲ５ジンクフィンガー結合タンパク質（ＣＣＲ５－ＺＦＰ）－植物トランス活性化相互作用モチーフを含有するＤＮＡ構築物が構築された。配列番号８０～９３に記載されている天然およびバリアント植物トランス活性化相互作用モチーフはＢａｍＨＩ／ＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素断片として動員され、ＣＣＲ５－ＺＦＰドメインをコードする配列の下流に直接クローニングされた（Perez et al. (2008)、上記）。得られたＺＦＰ転写活性化因子発現カセットは、ＧＡＬ１，１０プロモーター（West et al. (1987) Genes Dev. 1:1118-31）およびＣＹＣ１ターミネーター（Osborne et al. (1988) Genes Dev. 2:766-72）を利用し、酵母ｐＲＳ３１５シリーズベクターを基盤としていた。得られたベクターは、ＣＣＲ５－ＺＦＰとのインフレーム融合物として天然およびバリアント植物トランス活性化相互作用モチーフを含有していた。

【０２１１】
さらに、いくつかの対照が含まれた。空ベクター対照ならびに２つの異なるＶＰ－１６転写活性化因子発現カセット、ＳＧＭＯ ＶＰ１６－ＣＣＲ５（配列番号７９）およびＶＰ１６ｖ２ ＣＣＲ５－ＣＣＲ５が研究で使用された。ＶＰ－１６転写活性化因子発現カセットは両方ともＧＡＬ１，１０プロモーターにより推進され、ＣＹＣ１ターミネーターにより停止された。空ベクター対照はＣＣＲ５－ＺＦＰドメインのみを含有し、トランス活性化相互作用モチーフは含有していなかった。

【０２１２】
酵母活性アッセイ
ＢＹ４７４１レポーターライン株の一晩培養物はＹＰＤ＋Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ（登録商標）において増殖され、ＺＦＰ転写活性化因子発現カセットを含有する１μｇのベクターは、９６ウェルフォーマットにおいて標準酵母形質転換プロトコールを使用して送達され

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

【０２１３】

ＭＥＬ１アッセイでは、１１０μＬの酵母細胞のうち１００μＬが１００μＬの水に希釈され、分光光度計を使用して６００ｎｍでの光学密度（OD_{600}）が測定された。残りの１０μＬの酵母細胞は３０℃で１時間９０μＬのＭＥＬ１バッファー（７７ｍＭ Na_2HPO_4、６１ｍＭクエン酸、２ｍｇ／ｍＬ ＰＮＰＧ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ））中でインキュベートされた。反応は１００μＬの１Ｍ Na_2CO_3の添加により停止された。ＭＥＬ１活性はOD_{405}で評価され、ｍＵはOD_{405}とOD_{600}の測定値の比に基づく式を使用して計算された（Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26(6):702-8）。

【０２１４】

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

【０２１５】

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

【０２１６】

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

【０２１７】

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

【０２１８】

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

【実施例４】
【０２１９】
ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインを含むレポーター構築物を含有するタバコにおける植物活性化ドメインの相互作用モチーフの機能
レポーター構築物ｐＤＡＢ９８９７
Ｚ６　ＤＮＡ結合ドメインポリヌクレオチド配列の８直列型反復（配列番号６７；Yoko i et al. (2007) Mol Ther. 15(11):1917-23）は、クローニングを容易にするために、ＳａｃＩＩ部位を５’および３’末端に付加させて新規に合成された（ＩＤＴ、Ｃｏｒａｌｓｖｉｌｌｅ、ＩＡ）。全８Ｘ－Ｚ６結合ドメイン（配列番号６８）は続いて、所望の植物発現エレメントを含有する既存のＧａｔｅｗａｙ（登録商標）エントリーベクターにクローニングされた。８Ｘ－Ｚ６結合部位はＳａｃＩＩ断片上に動員され、バックボーンベクターに見出される独自のＳａｃＩＩ部位を使用して、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）アクチン－２プロモーター（ＡｔＡｃｔ２プロモーターｖ２; An et al. (1996) Plant J. 10:107-21）の直ぐ上流にクローニングされた。それに続いて、ｇｕｓ遺伝子（ＧＵＳ; Jefferson (1989) Nature 342:837-8）は、独自のＮｃｏＩ／ＳａｃＩ部位を使用してシロイヌナズナ（A. thaliana）アクチン－２プロモーターの直接制御下でこのベクターにクローニングされ、ＮｃｏＩ部位のＡＴＧコドンが開始コドンを形成した。Ａｔｕ　ＯＲＦ２３　３’ＵＴＲ（アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）オープンリーディングフレーム－２３、３’非翻訳領域；欧州特許出願第２２２４９３　Ａ１号）を使用して転写を終止させた。
【０２２０】
最終形質転換ベクターであるｐＤＡＢ９８９７（図１２）は、シロイヌナズナ（A. thaliana）ユビキチン－１０プロモーター（Ａｔ　Ｕｂｉ１０プロモーターｖ２(Callis et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:12486-93)）：：ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（ｐａｔ　ｖ３(Wohlleben et al. (1988) Gene 70:25-37)）：：植物選択のためのアグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）オープンリーディングフレーム－１、３’非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ１　３’ＵＴＲ　ｖ３（Huang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22）選択可能マーカーカセットを含有するデスティネーションベクターとのＧａｔｅｗａｙ（登録商標）ライゲーションの結果であった。最終形質転換ベクターは塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）株であるＬＢＡ４４０４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）中に形質転換された。
【０２２１】
ｐＤＡＢ９８９７を用いたタバコのアグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介形質転換
トランスジェニックレポーター植物イベントを起こすため、プチハバナ（Petit Havana）タバコ植物から切り取った葉片（１ｃｍ^2）を、プラスミドであるｐＤＡＢ９８９７を宿すアグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）株であるＬＢＡ４４０４の一晩培養物中でインキュベートし、OD_{600}約１．２ｎｍまで増殖させ、無菌フィルターペーパー上で吸い取り乾燥させ、次に６０×２０ｍｍ皿（１皿あたり５片）中のＭＳ培地（Ｐｈｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｌａｂｓ、Ｓｈａｗｎｅｅ　Ｍｉｓｓｉｏｎ、ＫＳ）および３０ｇ／Ｌスクロース上に置いて、１ｍｇ／Ｌのインドール酢酸および１ｍｇ／Ｌのベンジアミノプリン（benzyamino purine）を添加してＮｅｓｃｏｆｉｌｍ（登録商標）（Ｋａｒｌａｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｃｏｔｔｏｎｗｏｏｄ、ＡＺ）で密封した。４８時間の共培養に続いて、葉片は２５０ｍｇ／Ｌのセフォタキシム（cephotaxime）および５ｍｇ／ＬのＢＡＳＴＡ（登録商標）を有する同じ培地に移された。３～４週間後、小植物は、葉収穫および分子分析に先立ってさらに２～３週間、ＰｈｙｔａＴｒａｙｓ（商標）中の２５０ｍｇ／Ｌのセフォタキシムおよび１０ｍｇ／ＬのＢＡＳＴＡ（登録商標）を有するＭＳ培地に移された。
【０２２２】

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

【０２２３】

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

【０２２４】

ＤＮＡ定量化。得られたゲノムＤＮＡは、Ｑｕａｎｔ－ｉＴ（商標）ＰｉｃｏＧｒｅｅｎ（登録商標）ＤＮＡアッセイキット（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を使用して定量された。２０ｎｇ／μＬから１．２５ｎｇ／μＬ（連続希釈された）に及ぶ５つの予め定量されたＤＮＡ標準が標準曲線作成のために使用された。試料は先ず、アッセイの線形範囲内にあるように１対１０または１対２０の希釈度で希釈され、ゲノムＤＮＡの濃度は製造業者のプロトコールに従って決定された。次に、Ｓｙｎｅｒｇｙ２（商標）プレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ、Ｗｉｎｏｏｓｋｉ、ＶＴ）を使用して蛍光が記録された。ゲノムＤＮＡ濃度は、バックグランド蛍光補正から計算された標準曲線から評価された。次に、ＴＥまたは水を使用して、ＤＮＡは、Ｂｉｏｒｏｂｏｔ３０００（商標）自動化液体ハンドラー（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＰＣＲのために共通の濃度１０ｎｇ／μＬまで希釈された。サザン分析のためのＤＮＡは希釈せずにおいた。

【０２２５】

コピー数評価。推定トランスジェニックイベントは、ＴａｑＭａｎ（登録商標）アッセイ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）に類似する多重ＤＮＡ加水分解プローブアッセイを使用して組込みコンプレキシティ（integration complexity）について分析された。導入遺伝子インサートのコピー数は、ｐａｔ導入遺伝子と内在性タバコ基準遺伝子であるｐａｌ（フェニルアラニンアンモニアリアーゼ；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＢ００８１９９）の両方について配列特異的プライマーおよびプローブを使用して評価された。両遺伝子についてのアッセイは、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）プローブ設計ソフトウェア２．０（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）を使用して設計された。両遺伝子についてのリアルタイムＰＣＲは、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０システム（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を使用して評価された。

【０２２６】

増幅では、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０プローブマスター混合物（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）が、０．４μＭのそれぞれのプライマーおよび０．２μＭのそれぞれのプローブを含有する１０μＬ容積多重反応において１×最終濃度で調製された（表１）。２段階増幅反応は、５８℃で３８秒間、伸長物で実施され、蛍光を取得した。試料はすべて３連で実行され、それぞれの試料の分析に平均Ｃｔ値が使用された。リアルタイムＰＣＲデータの解析は相対定量モジュールによりＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）ソフトウェア（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を使用して実施され、ΔΔＣｔ法に基づいている。単一コピー標準物質由来のｇＤＮＡの試料は結果を正規化するために含まれた。単一コピー標準物質イベントはサザン分析により既

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

【０２２７】

【表１】

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

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

【０２２８】

ＰＴＵ　ＰＣＲ。低コピーイベントは続いて無傷の植物転写単位（ＰＴＵ）についてＰＣＲによりスクリーニングされた。Ｂｌｕ６３６（配列番号７５）およびＢｌｕ６３７（配列番号７６）プライマーを使用して、正確な増幅によりＺ６－Ａｃｔ２／ＧＵＳ／ＡｔＯＲＦ２３　ＰＴＵ（３，７７１ｂｐ）からなる３．７ｋｂ産物が得られた。Ｐｈｕｓｉｏｎ（登録商標）ＧＣマスター混合物（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｅｙ、ＭＡ）は、以下の反応条件、９８℃で３０秒間、続いて９８℃で１０秒間、６７℃で３０秒間、７２℃で２分間、および７２℃で１０分間の最終伸長を３０サイクルで使用された。上で詳述したＰＴＵ　ＰＣＲ反応に加えて、内在性遺伝子であるｃｈｓ（カルコンシンターゼ；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＦＪ９６９３９１．１）の増幅もゲノムＤＮＡ鋳型の品質を確認するために含まれた。３’ＣＨＳフォワード（配列番号７７）および３’ＣＨＳリバース（配列番号７８）プライマーは反応に含まれ、この反応は３５０ｂｐ増幅産物を産生した。２０μＬの反応が使用され、最終濃度はトランスジェニックプライマーでは０．５μＭおよび内在性基準遺伝子では０．２μＭであった。

【０２２９】

サザン分析。試料ごとに、５μｇのゲノムＤＮＡは、３７℃で一晩のインキュベーションにより、制限酵素であるＡｓｅＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）で完全に消化された。消化されたＤＮＡは、製造業者が提唱するプロトコールに従って、Ｑｕｉｃｋ　Ｐｒｅｃｉｐ（商標）溶液（Ｅｄｇｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）での沈殿により濃縮された。次に、ゲノムＤＮＡは６５℃で１時間２５μＬの水中に再懸濁された。再懸濁された試料は、１×ＴＡＥバッファーで調製された０．８％アガロースゲル上にローディングされ、１×ＴＡＥ中１．１Ｖ／ｃｍで一晩電気泳動された。前記ゲルは変性バッファー（０．２Ｍ　ＮａＯＨ／０．６Ｍ　ＮａＣｌ）中に３０分間浸され、続いて中和バッファー（０．５Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ　７．５）／１．５Ｍ　ＮａＣｌ）に３０分間浸された。

【０２３０】

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

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

【０２３１】

ブロットは、Ｒｏｂｂｉｎｓ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｍｏｄｅｌ ４００ハイブリダイゼーションインキュベーター（Ｒｏｂｂｉｎｓ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）を使用してガラス製ローラーボトル中、６５℃で１時間プレハイブリダイゼーション液（ＰｅｒｆｅｃｔＨｙｂ（商標）ｐｌｕｓ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）と一緒にインキュベートされた。プローブは、全コード配列を含有するＰＣＲ断片から調製された。ＰＣＲアンプリコンは、ＱｉａｅｘＩＩ（登録商標）ゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して精製され、Ｒａｎｄｏｍ ＲＴ Ｐｒｉｍｅ－ｉＴ（登録商標）標識キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）により［α^{32}Ｐ］ｄＣＴＰを標識された。ブロットは、プレハイブリダイゼーション液におよそ２００万カウントブロット$^{-1}$ｍＬ$^{-1}$まで直接添加された変性プローブに６５℃で一晩ハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーションに続いて、ブロットは０．１Ｘ ＳＳＣ／０．１％ ＳＤＳを用いて６５℃で４０分間順次洗浄された。最後に、ブロットは記憶蛍光体画像化スクリーンに曝露され、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ（商標）Ｓｔｏｒｍ（商標）８６０撮像システムを使用して撮像された。正確な単一コピー組込みイベントは、単一ハイブリダイゼーションバンドの同定により確かめられた。

【０２３２】

ホモ接合型T_2レポーター植物の生成

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

【０２３３】

植物ＺＦＰ－植物転写活性化因子発現構築物

バリアントまたは天然植物トランス活性化相互作用モチーフを含有する植物ＺＦＰ－転写活性化因子構築物が構築された。クローニングのための制限酵素部位ＢａｍＨＩ／ＳａｃＩが隣接する植物トランス活性化相互作用モチーフ（天然と改変バリアントの両方）が新規に合成された（ＤＮＡ２．０、Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ、ＣＡ）。植物トランス活性化相互作用モチーフはＢａｍＨＩ／ＳａｃＩ断片上に動員され、既存のＧａｔｅｗａｙ（登録商標）Ｅｎｔｒｙバックボーンベクターに見出される独自のＢａｍＨＩ／ＳａｃＩ部位を使用してＺ６ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインの直ぐ下流にクローニングされた（Yokoi et al. (2007)、上記）。この段階が完了すると、ＺＦＰ転写活性化因子構築物（植物トランス活性化相互作用モチーフに融合されたＺ６ ＤＮＡジンクフィンガータンパク質結合ドメインを含有する）は、構成的キャッサバ葉脈モザイクウイルス（Cassava Vein Mosaic Virus）プロモーター（ＣｓＶＭＶプロモーターｖ２; Verdaguer et al. (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39）の制御下に置かれ、アグロバクテリウム・ツメファシ

エンス（A. tumefaciens）由来のＯＲＦ２３　３’ＵＴＲを終端とした。最終形質転換ベクター（表２）は、植物選択のために、シロイヌナズナ（A. thaliana）ユビキチン－３プロモーター（Ａｔ　Ｕｂｉ３プロモーターｖ２; Callis et al. (1995) Genetics, 139 (2):921-39)）／ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼＩＩ（ＨＰＴＩＩ　ｖ１; Gritz et al. (1983) Gene 25(2-3):179-88）／アグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）オープンリーディングフレーム－２４、３’非翻訳領域（Ａｔｕ　ＯＲＦ２４　３‘ＵＴＲ　ｖ２）カセットを含有するデスティネーションベクターとのＧａｔｅｗａｙ（登録商標）媒介ライゲーション（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）から生じた。

【０２３４】

【表２】

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

植物トランス活性化相互作用モチーフ	構築物番号および植物トランス活性化相互作用モチーフ配列			
	天然		改変された	
Pti4	pDAB107881	図13 配列番号81	pDAB106273	図22 配列番号88
AtERF1	pDAB107882	図14 配列番号82	pDAB106274	図23 配列番号89
ORCA2	pDAB107883	図15 配列番号83	pDAB106275	図24 配列番号90
Dreb1a	pDAB107884	図16 配列番号84	pDAB106276	図25 配列番号91
Dof1	pDAB107885	図17 配列番号86	pDAB106277	図26 配列番号93
ERF2	pDAB107886	図18 配列番号80	pDAB106278	図27 配列番号87
Cbf1	pDAB107887	図19 配列番号85	pDAB106279	図28 配列番号92
VP16	pDAB106272	図20 配列番号79	--	--
空ベクター-ジンクフィンガーのみ(トランス活性化相互作用モチーフなし)	pDAB106238	図21	--	--

【０２３５】

最終バイナリーベクターはＤＮＡ塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）株であるＬＢＡ４４０４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に形質転換された。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインは含有するがトランス活性化相互作用モチーフで構成された活性化因子は含まない対照ベクターであるｐＤＡＢ１０６２３８（図２１）が含まれた。この構築物では、ジンクフィンガー結合ドメインは構成的アグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）ＭＡＳプロモーター（Ａｔｕ Ｍａｓプロモーターｖ４；米国特許第５，００１，０６０号、米国特許第５，５７３，９３２号および米国特許第５，２９０，９２４号）の制御下に置かれ、アグロバクテリウム

・ツメファシエンス（A. tumefaciens）由来のＯＲＦ２３　３’ＵＴＲを終端とした。さらに、ベクターは、植物選択のために、シロイヌナズナ（A. thaliana）ユビキチン－３プロモーター／ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼＩＩ／アグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）オープンリーディングフレーム－２４、３’非翻訳領域カセットを含有している。

【０２３６】

植物ＺＦＰ－転写活性化因子構築物を含有する植物イベントを生成するために、T_2レポータータバコ植物から切り取った葉片（１cm^2）を、表２に収載されている１６のプラスミドのうちの１つを宿すアグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）株であるＬＢＡ４４０４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）の一晩培養物中でインキュベートし、OD_{600}約１．２ｎｍまで増殖させ、無菌フィルターペーパー上で吸い取り乾燥させ、次に６０×２０ｍｍ皿（１皿あたり５片）中のＭＳ培地（Ｐｈｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｌａｂｓ、Ｓｈａｗｎｅｅ　Ｍｉｓｓｉｏｎ、ＫＳ）および３０ｇ／Ｌスクロース上に置いて、１ｍｇ／Ｌのインドール酢酸および１ｍｇ／Ｌのベンジアミノプリンを添加してＮｅｓｃｏｆｉｌｍ（登録商標）（Ｋａｒｌａｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｃｏｔｔｏｎｗｏｏｄ、ＡＺ）で密封した。４８時間の共培養に続いて、葉片は２５０ｍｇ／Ｌのセフォタキシムおよび１０ｍｇ／Ｌのハイグロマイシンを有する同じ培地に移された。３～４週間後、小植物は、さらに２～３週間、ＰｈｙｔａＴｒａｙｓ（商標）中の２５０ｍｇ／Ｌのセフォタキシムおよび１０ｍｇ／Ｌのハイグロマイシンを有するＭＳ培地に移され、続いて葉収穫およびｇｕｓ発現分析を行った。合計で２０～３０の植物イベントが、１６の植物転写活性化因子構築物ごとに生成された。

【０２３７】

ｇｕｓ発現分析

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

【０２３８】

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

【０２３９】

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

【０２４０】

ＲＴ－ＰＣＲ。ハイグロマイシン上で選択されたイベントは、両方がＴａｑＭａｎ（登録商標）アッセイに類似している２つのＤＮＡ加水分解プローブアッセイを使用してｇｕｓ遺伝子転写物レベルについて分析された。個々のイベントごとのｇｕｓ　ｍＲＮＡの定常状態レベルは、配列特異的プライマーおよびプローブを使用して評価された。前記ｍＲＮＡは、内在性タバコ基準遺伝子であるＢＹＥＥＦ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＧＩ：９２７３８２）について定常状態レベルのｍＲＮＡを使用して正規化された。両遺伝子についてのアッセイは、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）プローブ設計ソフトウェア２．０

（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を使用して設計された。両遺伝子についてのリアルタイムＰＣＲはＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０システムを使用して評価された。ｇｕｓ増幅では、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０プローブマスター混合物が、０．４μＭのそれぞれのプライマーおよび０．２μＭのプローブを含有する１０μＬ容積多重反応において１×最終濃度で調製された（表３）。

【０２４１】

２段階増幅反応は、５６℃で４０秒間の伸長で実施され、蛍光を取得した。試料はすべて３連で非希釈で実行され、それぞれの試料の分析に平均Ｃｔ値が使用された。ＢＹＥＥＦ増幅では、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０プローブマスター混合物が、０．２５μＭのそれぞれのプライマー（表３）および０．１μＭのＵＰＬ　１１９プローブ（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を含有する１０μＬ容積多重反応において１×最終濃度で調製された。２段階増幅反応は、５８℃で２５秒間、伸長物で実施され、蛍光を取得した。試料はすべて３連で１対１０の希釈で実行され、それぞれの試料の分析に平均Ｃｔ値が使用された。リアルタイムＰＣＲデータの解析は相対定量モジュールを使用するＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）ソフトウェアを使用して実施され、ΔΔＣｔ法に基づいている。次に、様々な植物転写活性化因子処理間での相対的発現レベルが比較された（図２９）。

【０２４２】

【表３】

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

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

【０２４３】

結果

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

【０２４４】

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

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

【実施例５】

【０２４５】

ＧＡＬ４レポーター構築物を含有するタバコにおける相互作用モチーフ機能

ＧＡＬ４結合ドメインを含むレポーター構築物を含有するタバコ系統

レポーター構築物であるｐＧａｌＧＵＳは、下に記載される戦略を使用して構築される。酵母ＧＡＬ４結合配列および２３ｂｐスペーサー領域の６つの直列型繰り返し（Baleja et al. (1997) J. Biomol. NMR 10:397-401に記載されている）は、クローニングを容易にするためにＳａｃＩＩ部位を加えて新規に合成される（ＩＤＴ）。６×Ｇａｌ４結合部位はＳａｃＩＩ断片上に移動され、これを使用して、ＳａｃＩＩでも消化される既存のエントリーベクター由来のＺ６結合部位を置き換える。このクローニング段階は、ＧＡＬ４結合部位を、ｇｕｓ遺伝子の発現を推進するシロイヌナズナ（Arabidopsis）アクチン２プロモーターの直ぐ上流に置く。最終形質転換ベクターであるｐＧａｌＧＵＳ（図３０）は、植物選択に使用されるシロイヌナズナ（Arabidopsis）ユビキチン１０プロモーター－ｐａｔ遺伝子発現カセットを含有するデスティネーションベクターでのＧａｔｅｗａｙ（登録商標）形質転換反応から生じる。最終形質転換ベクターは、塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）株であるＬＢＡ４４０４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に形質転換される。

【０２４６】

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

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

【０２４７】

レポーターイベントのコピー数およびＰＴＵ分析

低コンプレキシティコピー数、ＢＡＳＴＡ（登録商標）抵抗性トランスジェニック植物が生成され、ＴａｑＭａｎ（登録商標）コピー数分析に基づいて同定される。低コンプレキシティイベントのうち、ＰＣＲ分析により決定される場合、サブセットが無傷のＰＴＵを示す。これらのイベントはサザンブロット分析によりさらに分析される。サザンブロット分析に続いて、少なくとも１つの単一コピー、無傷のＰＴＵイベントが選択され、温室で成熟するまで生育され、自家受粉させておく。T_1種子が収集され、表面殺菌され、発芽させる。ｐａｔコピー数分析による接合状態スクリーニングに続いて、ホモ接合型T_1植物が選択され、温室で成熟するまで生育され、自家受粉させておく。次に、T_2種子が収集され、表面殺菌され、発芽させ（既に記載されている通りに）、これを使用して活性化因子試験のためにレポーター植物を生成する。

【０２４８】

植物ＧＡＬ４－転写活性化因子発現構築物

バリアントまたは天然の植物トランス活性化相互作用モチーフを含有する植物ＧＡＬ４－転写活性化因子構築物が構築される。実施例４（「植物ＺＦＰ－植物転写活性化因子発現構築物」）に記載される植物ＺＦＰ－転写活性化因子発現構築物は、ジンクフィンガー結合タンパク質ポリヌクレオチド配列の代わりにＧＡＬ４結合タンパク質ポリヌクレオチド配列を挿入することにより改変される。ヘミコット（hemicot）植物最適化ＧＡＬ４ＤＮＡ結合ドメインポリヌクレオチド配列（Keegan et al. (1986) Science 231(4739):699-704）が、ＮｃｏＩ／ＢａｍＨＩ断片としてジンクフィンガー結合タンパク質ポリヌク

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

【０２４９】

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

【０２５０】

ｇｕｓ発現分析

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

【実施例６】

【０２５１】

ＴＡＬレポーター構築物を含有するタバコにおける相互作用モチーフ機能

ＴＡＬ結合ドメインを含むレポーター構築物を含有するタバコ系統

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

【０２５２】

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

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

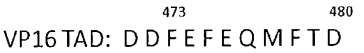
【０２５３】
レポーターイベントのコピー数およびＰＴＵ分析
低コンプレキシティコピー数、ＢＡＳＴＡ（登録商標）抵抗性トランスジェニック植物が生成され、ＴａｑＭａｎ（登録商標）コピー数分析を利用して同定される。低コンプレキシティイベントのうち、ＰＣＲ分析により決定される場合、サブセットが無傷のＰＴＵを示す。これらのイベントはサザンブロット分析によりさらに分析される。サザンブロット分析に続いて、少なくとも１つの単一コピー、無傷のＰＴＵイベントが選択され、温室で成熟するまで生育され、自家受粉させておく。T_1種子が収集され、表面殺菌され、発芽する。ｐａｔコピー数分析による接合状態スクリーニングに続いて、ホモ接合型T_1植物が選択され、温室で成熟するまで生育され、自家受粉させておく。次に、T_2種子が収集され、表面殺菌され、発芽させ（既に記載されている通りに）、これを使用して活性化因子試験のためにレポーター植物を生成する。

【０２５４】
植物ＴＡＬ－転写活性化因子発現構築物
バリアントまたは天然の植物トランス活性化相互作用モチーフを含有する植物ＴＡＬ－転写活性化因子構築物が構築される。実施例４に記載される植物ＺＦＰ－転写活性化因子発現構築物は、ジンクフィンガー結合タンパク質ポリヌクレオチド配列の代わりにＴＡＬ結合タンパク質ポリヌクレオチド配列を挿入することにより改変される。ＤＮＡ結合に必要な１７．５　ＴＡＬ繰り返しは新規に合成され、トウモロコシ(Zea mays)Ｏｐａｑｕｅ－２核局在化配列（nuclear localization sequence）（Van Eenennaam et al. (2004) Metabolic Engineering 6:101-8）に融合される。それぞれのドメインの配列は、ＵＰＡ－ボックスコンセンサス配列について予測されるように、可変残基（１２および１３位）で異なるアミノ酸を利用してＤＮＡ結合を指令する（Boch et al. (2009) Science 326(5959):1509-12）。ヘミコット植物最適化ＴＡＬ　ＤＮＡ結合ドメインポリヌクレオチド配列が、ＮｃｏＩ／ＢａｍＨＩ断片としてジンクフィンガー結合タンパク質ポリヌクレオチド配列の代わりに挿入される。この段階が完了すると、ＴＡＬ－転写活性化因子構築物は構成的キャッサバ葉脈モザイクウイルス（Cassava Vein Mosaic Virus）プロモーターの制御下に置かれ、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）由来のＯＲＦ２３　３’ＵＴＲを終端とする。最終形質転換ベクターは、植物選択のために、シロイヌナズナ（Arabidopsis）ユビキチン３－ＨｐｔＩＩカセットを含有するデスティネーションベクターでのＧａｔｅｗａｙ（登録商標）形質転換から完成される。最終形質転換ベクターは塩基配列決定により確認され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（A. tumefaciens）株であるＬＢＡ４４０４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に形質転換される。

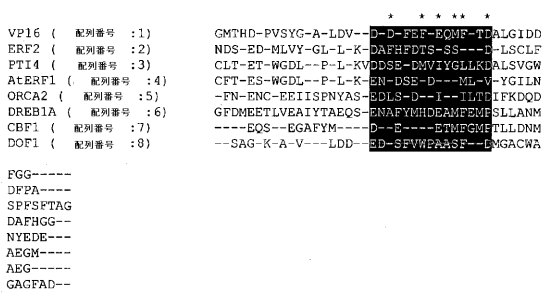
【０２５５】
植物ＴＡＬ－転写活性化因子構築物を含有する植物イベントを産生するために、実施例４に記載される一過性形質転換プロトコールが使用される。合計で２０～３０の植物イベントが、１６のＴＡＬ－転写活性化因子構築物ごとに生成される。

【０２５６】
ｇｕｓ発現分析
ハイグロマイシン上で選択されるイベントは、２つのＤＮＡ加水分解プローブアッセイを使用してｇｕｓ遺伝子転写物レベルについて分析される。個々のイベントごとのｇｕｓｍＲＮＡの定常状態レベルは、配列特異的プライマーとプローブを使用して評価される。前記ｍＲＮＡは、内在性タバコ基準遺伝子、例えば、ＢＹＥＥＦのｍＲＮＡの定常状態レベルを使用して正規化される。両遺伝子のアッセイは実施例４に記載されるプロトコールを使用して設計される。リアルタイムＰＣＲデータの解析は、相対定量モジュールを使用するＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）ソフトウェアを使用して実施され、ΔΔＣｔ法に基づいている。様々な活性化因子構築物の相対的発現レベルが比較される。

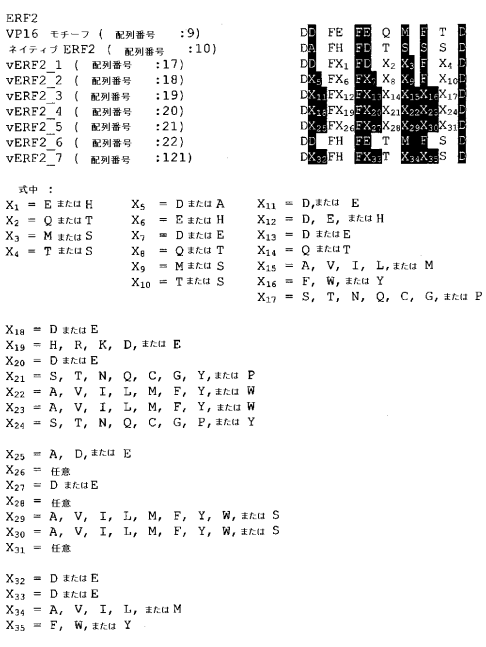
【図１】


473
480
VP16 TAD: D D F E F E Q M F T D
* ** ** *

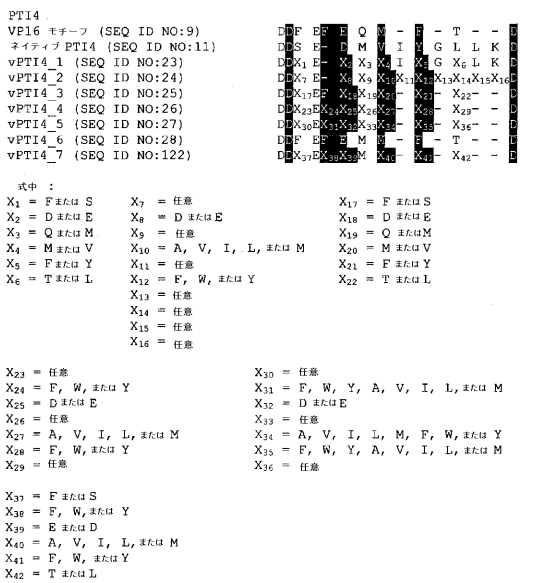
【図２】


VP16 (配列番号 :1) GMTHD-PVSYG-A-LDV--D-D-FEF-EQMF-TF ALGIDD
ERF2 (配列番号 :2) NDS-ED-MLVY-GL-L-K-DAFHFDTS-SS---D-LSCLF
PTI4 (配列番号 :3) CLT-ET-WGDL--P-L-KVDDSE-DMVIYGLLKD ALSVGW
AtERF1 (配列番号 :4) CFT-ES-WGDL--P-L-K-EN-DSE-D---ML-V-YGILN
ORCA2 (配列番号 :5) -FN-ENC-EEIISPNYAS-SDLS-D--I--ILTT IFKDQD
DREB1A (配列番号 :6) GFDMEETLVEAIYTAEQS-ENAFYMHDEAMFEMF SLLANM
CBF1 (配列番号 :7) ----EQS--EGAFYM----D--E----ETMFGMF TLLDNM
DOF1 (配列番号 :8) --SAG-K-A-V---LDD--ED-SFVWPAASF--D MGACWA
FGG-----
DFPA----
SPFSFTAG
DAFHGG--
NYEDE---
AEGM----
AEG-----
GAGFAD--

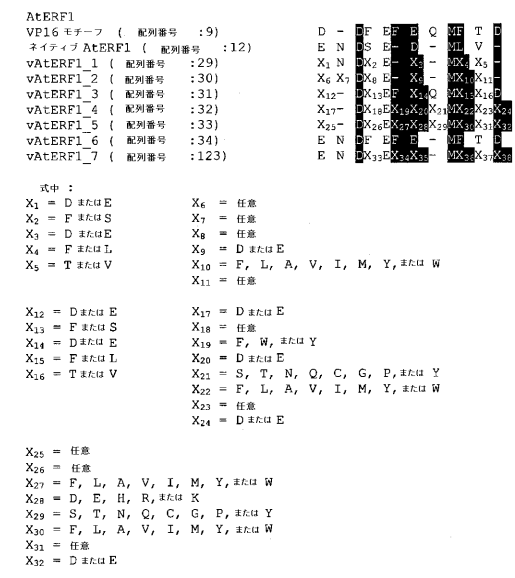
【図３】


ERF2
VP16 モチーフ (配列番号 :9)
ネイティブ ERF2 (配列番号 :10)
vERF2_1 (配列番号 :17)
vERF2_2 (配列番号 :18)
vERF2_3 (配列番号 :19)
vERF2_4 (配列番号 :20)
vERF2_5 (配列番号 :21)
vERF2_6 (配列番号 :22)
vERF2_7 (配列番号 :121)
式中 :
X1 = E または H
X2 = Q または T
X3 = M または S
X4 = T または S
X5 = D または A
X6 = E または H
X7 = D または E
X8 = Q または T
X9 = M または S
X10 = T または S
X11 = D,または E
X12 = D, E, または H
X13 = D または E
X14 = Q または T
X15 = A, V, I, L,または M
X16 = F, W,または Y
X17 = S, T, N, Q, C, G,または P
X18 = D または E
X19 = H, R, K, D,または E
X20 = D または E
X21 = S, T, N, Q, C, G, Y,または P
X22 = A, V, I, L, M, F, Y,または W
X23 = A, V, I, L, M, F, Y,または W
X24 = S, T, N, Q, C, G, P,または Y
X25 = A, D,または E
X26 = 任意
X27 = D または E
X28 = 任意
X29 = A, V, I, L, M, F, Y, W,または S
X30 = A, V, I, L, M, F, Y, W,または S
X31 = 任意
X32 = D または E
X33 = D または E
X34 = A, V, I, L,または M
X35 = F, W,または Y

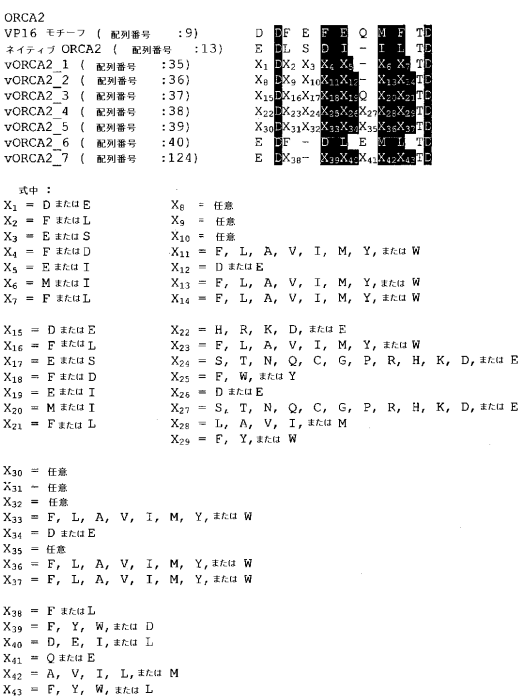
【図４】


PTI4
VP16 モチーフ (SEQ ID NO:9)
ネイティブ PTI4 (SEQ ID NO:11)
vPTI4_1 (SEQ ID NO:23)
vPTI4_2 (SEQ ID NO:24)
vPTI4_3 (SEQ ID NO:25)
vPTI4_4 (SEQ ID NO:26)
vPTI4_5 (SEQ ID NO:27)
vPTI4_6 (SEQ ID NO:28)
vPTI4_7 (SEQ ID NO:122)
式中 :
X1 = F または S
X2 = D または E
X3 = Q または M
X4 = M または V
X5 = F または Y
X6 = T または L
X7 = 任意
X8 = D または E
X9 = 任意
X10 = A, V, I, L,または M
X11 = 任意
X12 = F, W,または Y
X13 = 任意
X14 = 任意
X15 = 任意
X16 = 任意
X17 = F または S
X18 = D または E
X19 = Q または M
X20 = M または V
X21 = F または Y
X22 = T または L
X23 = 任意
X24 = F, W,または Y
X25 = D または E
X26 = 任意
X27 = A, V, I, L,または M
X28 = F, W,または Y
X29 = 任意
X30 = 任意
X31 = F, W, Y, A, V, I, L,または M
X32 = D または E
X33 = 任意
X34 = A, V, I, L, M, F, W,または Y
X35 = F, W, Y, A, V, I, L,または M
X36 = 任意
X37 = F または S
X38 = F, W,または Y
X39 = E または D
X40 = A, V, I, L,または M
X41 = F, W,または Y
X42 = T または L

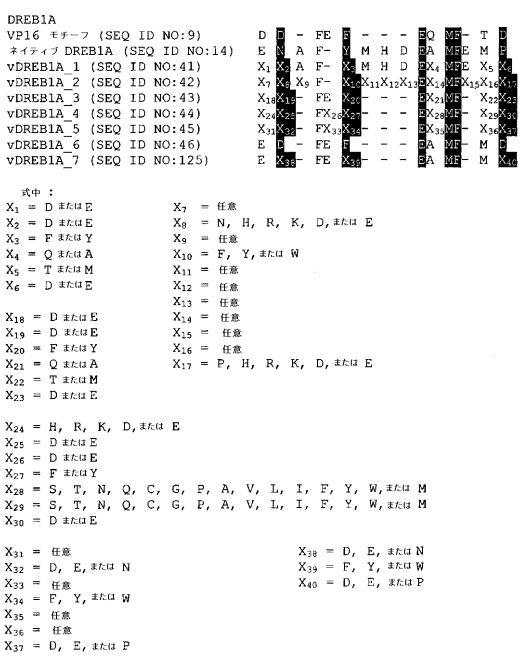
【図５】


AtERF1
VP16 モチーフ (配列番号 :9)
ネイティブ AtERF1 (配列番号 :12)
vAtERF1_1 (配列番号 :29)
vAtERF1_2 (配列番号 :30)
vAtERF1_3 (配列番号 :31)
vAtERF1_4 (配列番号 :32)
vAtERF1_5 (配列番号 :33)
vAtERF1_6 (配列番号 :34)
vAtERF1_7 (配列番号 :123)
式中 :
X1 = D または E
X2 = F または S
X3 = D または E
X4 = F または L
X5 = T または V
X6 = 任意
X7 = 任意
X8 = 任意
X9 = D または E
X10 = F, L, A, V, I, M, Y,または W
X11 = 任意
X12 = D または E
X13 = F または S
X14 = D または E
X15 = F または L
X16 = T または V
X17 = D または E
X18 = 任意
X19 = F, W,または Y
X20 = D または E
X21 = S, T, N, Q, C, G, P,または Y
X22 = F, L, A, V, I, M, Y,または W
X23 = 任意
X24 = D または E
X25 = 任意
X26 = 任意
X27 = F, L, A, V, I, M, Y,または W
X28 = D, E, H, R,または K
X29 = S, T, N, Q, C, G, P,または Y
X30 = F, L, A, V, I, M, Y,または W
X31 = 任意
X32 = D または E
X33 = F または S
X34 = F, W,または Y
X35 = E または D
X36 = F, W, Y,または L
X37 = T または V
X38 = D または E

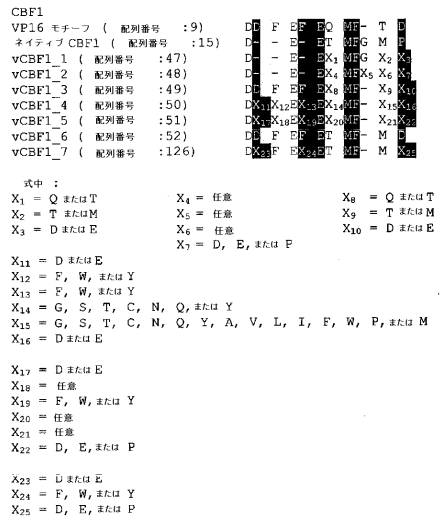
【図６】


ORCA2
VP16 モチーフ (配列番号 :9)
ネイティブ ORCA2 (配列番号 :13)
vORCA2_1 (配列番号 :35)
vORCA2_2 (配列番号 :36)
vORCA2_3 (配列番号 :37)
vORCA2_4 (配列番号 :38)
vORCA2_5 (配列番号 :39)
vORCA2_6 (配列番号 :40)
vORCA2_7 (配列番号 :124)
式中 :
X1 = D または E
X2 = F または L
X3 = E または S
X4 = F または D
X5 = E または I
X6 = M または I
X7 = F または L
X8 = 任意
X9 = 任意
X10 = 任意
X11 = F, L, A, V, I, M, Y, または W
X12 = D または E
X13 = F, L, A, V, I, M, Y, または W
X14 = F, L, A, V, I, M, Y, または W
X15 = D または E
X16 = F または L
X17 = E または S
X18 = F または D
X19 = E または I
X20 = M または I
X21 = F または L
X22 = H, R, K, D, または E
X23 = F, L, A, V, I, M, Y, または W
X24 = S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, または E
X25 = F, W, または Y
X26 = D または E
X27 = S, T, N, Q, C, G, P, R, H, K, D, または E
X28 = L, A, V, I, または M
X29 = F, Y, または W
X30 = 任意
X31 = 任意
X32 = 任意
X33 = F, L, A, V, I, M, Y, または W
X34 = D または E
X35 = 任意
X36 = F, L, A, V, I, M, Y, または W
X37 = F, L, A, V, I, M, Y, または W
X38 = F または L
X39 = F, Y, W, または D
X40 = D, E, I, または L
X41 = Q または E
X42 = A, V, I, L, または M
X43 = F, Y, W, または L

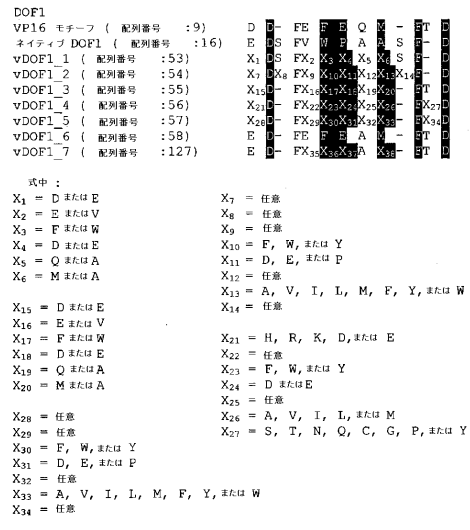
【図７】


DREB1A
VP16 モチーフ (SEQ ID NO:9)
ネイティブ DREB1A (SEQ ID NO:14)
vDREB1A_1 (SEQ ID NO:41)
vDREB1A_2 (SEQ ID NO:42)
vDREB1A_3 (SEQ ID NO:43)
vDREB1A_4 (SEQ ID NO:44)
vDREB1A_5 (SEQ ID NO:45)
vDREB1A_6 (SEQ ID NO:46)
vDREB1A_7 (SEQ ID NO:125)
式中 :
X1 = D または E
X2 = D または E
X3 = F または Y
X4 = Q または A
X5 = T または M
X6 = D または E
X7 = 任意
X8 = N, H, R, K, D, または E
X9 = 任意
X10 = F, Y, または W
X11 = 任意
X12 = 任意
X13 = 任意
X14 = 任意
X15 = 任意
X16 = 任意
X17 = P, H, R, K, D, または E
X18 = D または E
X19 = D または E
X20 = F または Y
X21 = Q または A
X22 = T または M
X23 = D または E
X24 = H, R, K, D, または E
X25 = D または E
X26 = D または E
X27 = F または Y
X28 = S, T, N, Q, C, G, P, A, V, L, I, F, Y, W, または M
X29 = S, T, N, Q, C, G, P, A, V, L, I, F, Y, W, または M
X30 = D または E
X31 = 任意
X32 = D, E, または N
X33 = 任意
X34 = P, Y, または W
X35 = 任意
X36 = 任意
X37 = D, E, または P
X38 = D, E, または N
X39 = F, Y, または W
X40 = D, E, または P

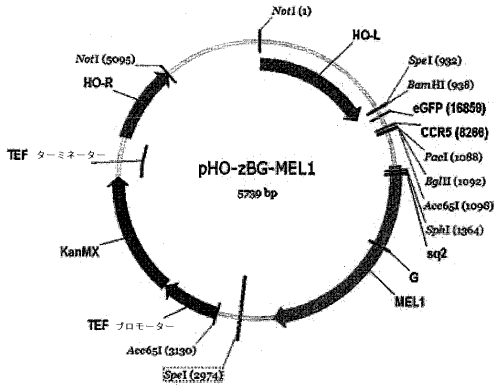
【図８】


CBF1
VP16 モチーフ (配列番号 :9)
ネイティブ CBF1 (配列番号 :15)
vCBF1_1 (配列番号 :47)
vCBF1_2 (配列番号 :48)
vCBF1_3 (配列番号 :49)
vCBF1_4 (配列番号 :50)
vCBF1_5 (配列番号 :51)
vCBF1_6 (配列番号 :52)
vCBF1_7 (配列番号 :126)
式中 :
X1 = Q または T
X2 = T または M
X3 = D または E
X4 = 任意
X5 = 任意
X6 = 任意
X7 = D, E, または P
X8 = Q または T
X9 = T または M
X10 = D または E
X11 = D または E
X12 = F, W, または Y
X13 = F, W, または Y
X14 = G, S, T, C, N, Q, または Y
X15 = G, S, T, C, N, Q, Y, A, V, L, I, F, W, P, または M
X16 = D または E
X17 = D または E
X18 = 任意
X19 = F, W, または Y
X20 = 任意
X21 = 任意
X22 = D, E, または P
X23 = D または E
X24 = F, W, または Y
X25 = D, E, または P

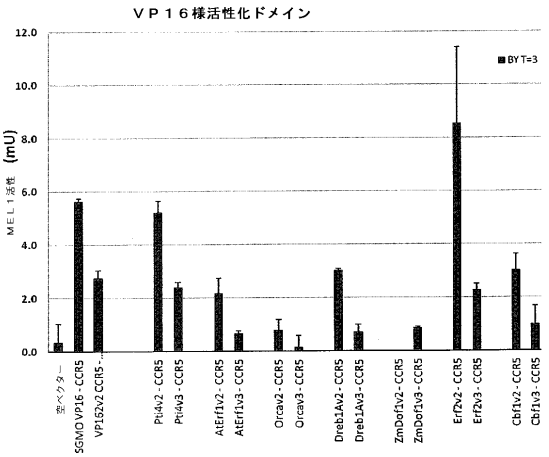
【図９】


DOF1
VP16 モチーフ (配列番号 :9)
ネイティブ DOF1 (配列番号 :16)
vDOF1_1 (配列番号 :53)
vDOF1_2 (配列番号 :54)
vDOF1_3 (配列番号 :55)
vDOF1_4 (配列番号 :56)
vDOF1_5 (配列番号 :57)
vDOF1_6 (配列番号 :58)
vDOF1_7 (配列番号 :127)
式中 :
X1 = D または E
X2 = E または V
X3 = F または W
X4 = D または E
X5 = Q または A
X6 = M または A
X7 = 任意
X8 = 任意
X9 = 任意
X10 = F, W, または Y
X11 = D, E, または P
X12 = 任意
X13 = A, V, I, L, M, F, Y, または W
X14 = 任意
X15 = D または E
X16 = E または V
X17 = F または W
X18 = D または E
X19 = Q または A
X20 = M または A
X21 = H, R, K, D, または E
X22 = 任意
X23 = F, W, または Y
X24 = D または E
X25 = 任意
X26 = A, V, I, L, または M
X27 = S, T, N, Q, C, G, P, または Y
X28 = 任意
X29 = 任意
X30 = F, W, または Y
X31 = D, E, または P
X32 = 任意
X33 = A, V, I, L, M, F, Y, または W
X34 = 任意
X35 = E または V
X36 = F, W, または Y
X37 = D, E, または P
X38 = A, V, I, L, または M

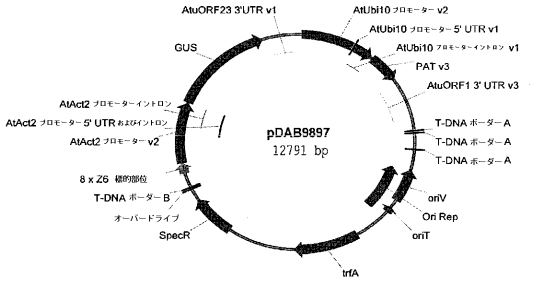
【図１０】



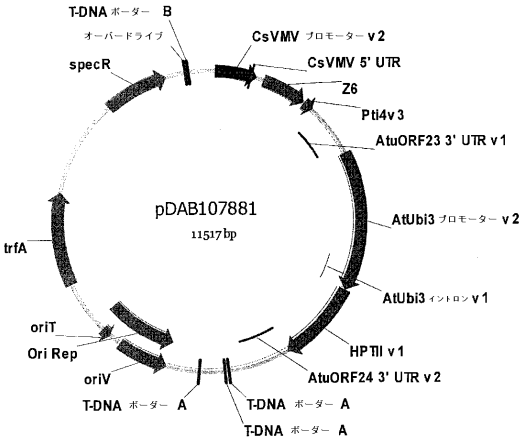
【図１１】



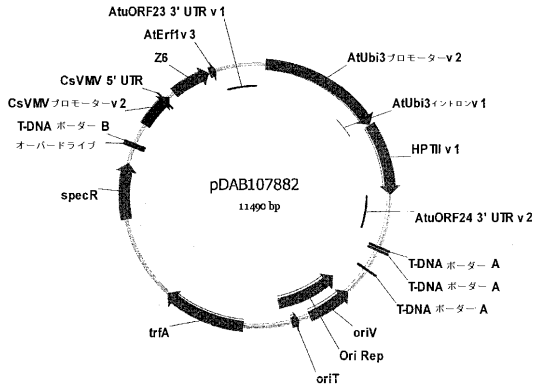
【図１２】



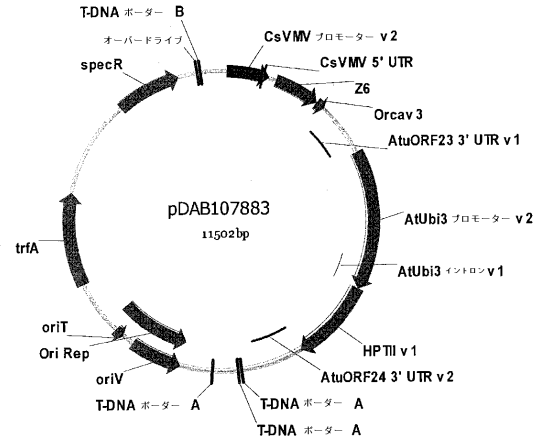
【図１３】



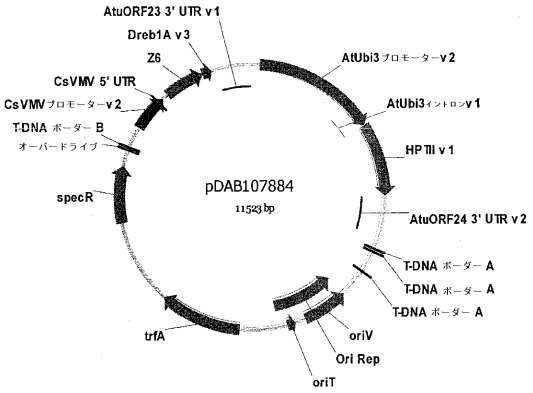
【図１４】



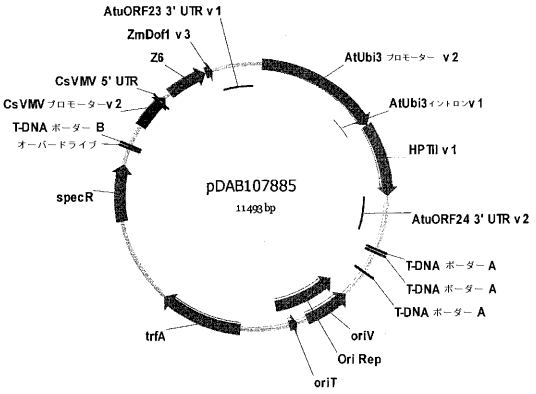
【図１５】



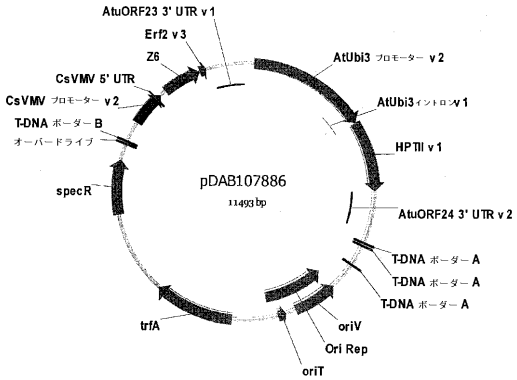
【図１６】



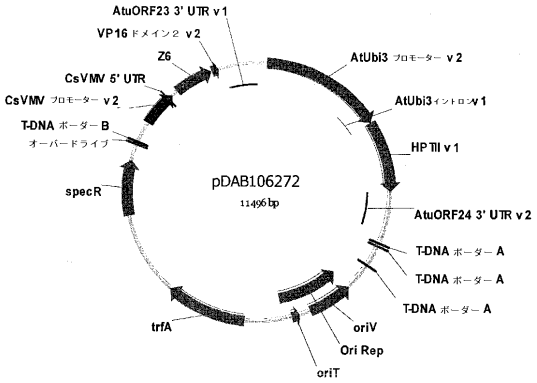
【図１７】



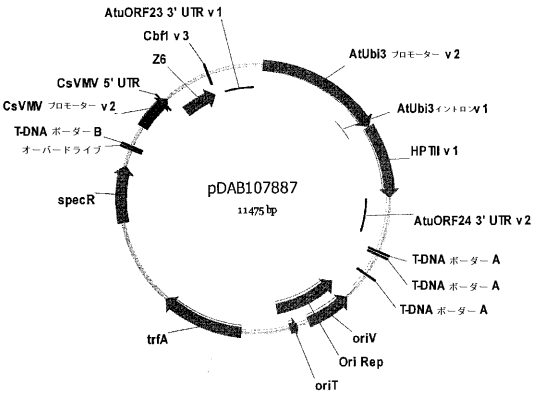
【図１８】



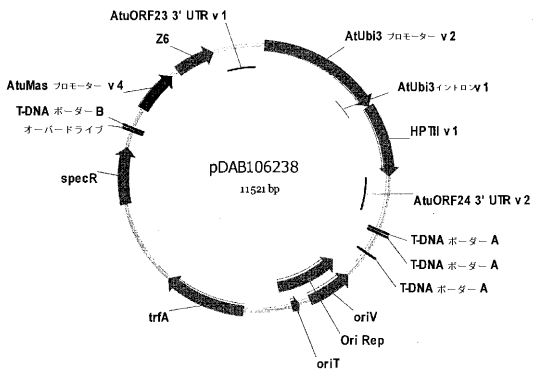
【図２０】



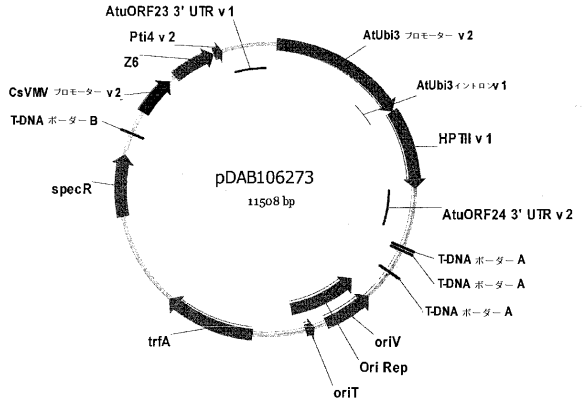
【図１９】



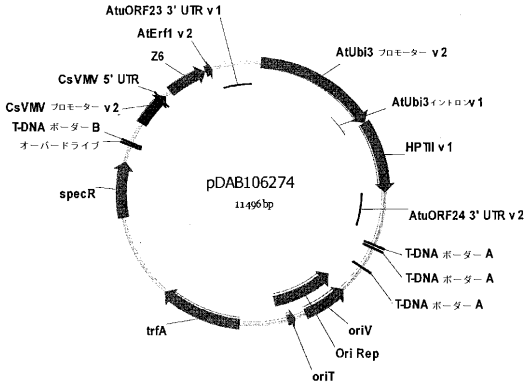
【図２１】



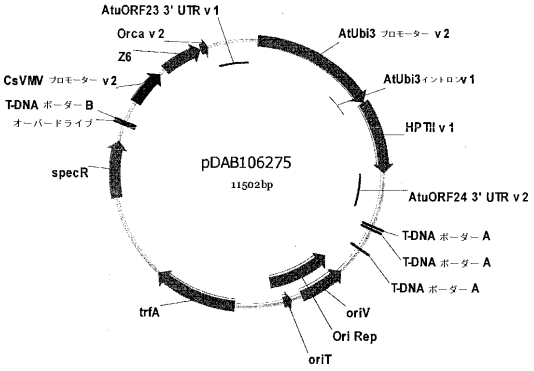
【図２２】



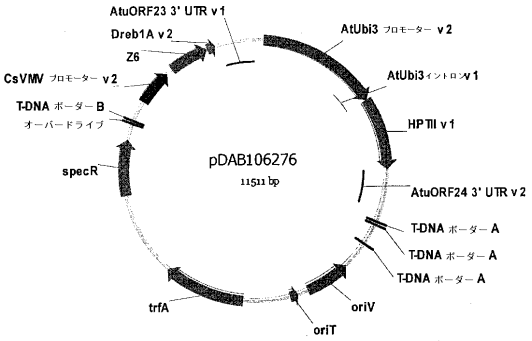
【図２３】



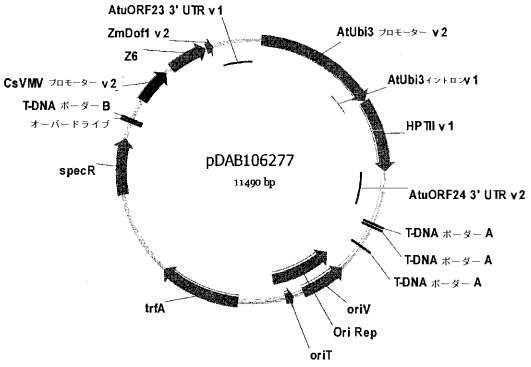
【図２４】



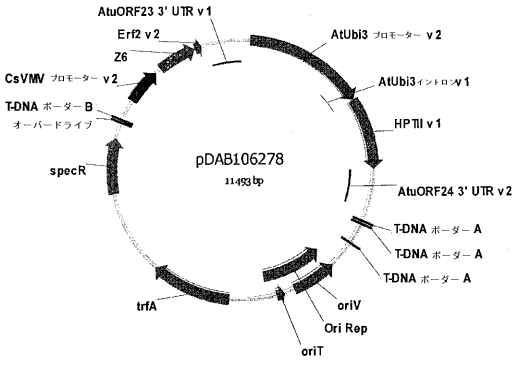
【図２５】



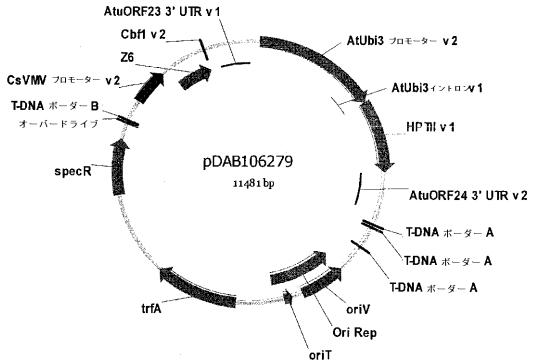
【図２６】



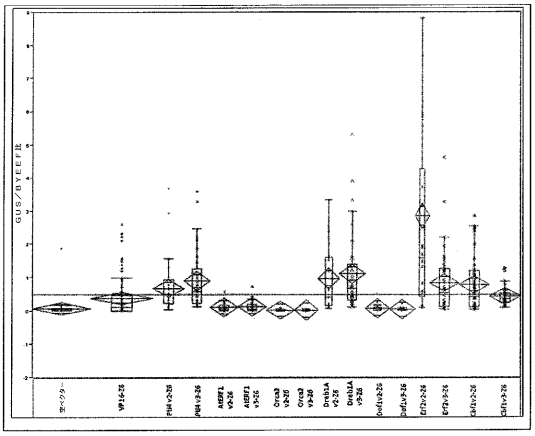
【図２７】



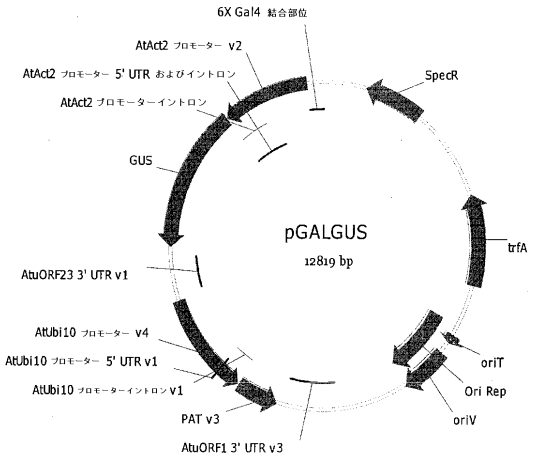
【図２８】



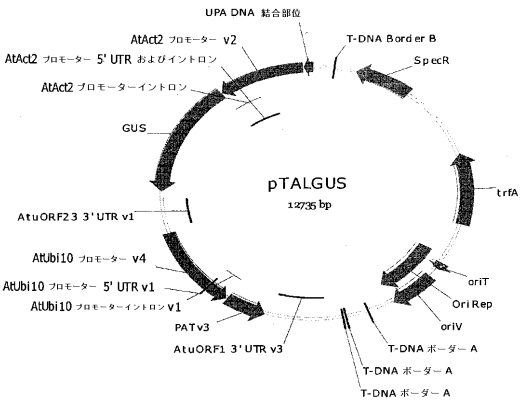
【図２９】



【図３０】



【図３１】



【配列表】
2017176183000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成29年5月24日(2017.5.24)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリヌクレオチドに特異的に結合するＤＮＡ結合ポリペプチド、および　配列番号２３～２８および１２２からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む合成転写活性化因子融合タンパク質であって、
前記ポリヌクレオチドが作動可能に第二のポリヌクレオチドに連結した際に、対象のポリペプチドをコードする前記第二のポリヌクレオチドの発現を増加させる、合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項２】
前記トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１１である、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項３】
ＤＮＡ結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、ＧＡＬ４、ＴＡＬ、ＬｅｘＡ、Ｔｅｔリプレッサー、ＬａｃＲ、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項１または２に記載の合成転写活性化因子融合タンパク

質。
【請求項４】
少なくとも１つの追加のＤＮＡ結合ポリペプチドを含む、請求項１または２に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項５】
少なくとも１つの追加のトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む、請求項１または２に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項６】
配列番号１０１、配列番号１０９および配列番号１１０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
【請求項７】
合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、前記ポリヌクレオチドが、
標的ポリヌクレオチドに特異的に結合するＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする第一のヌクレオチド配列、および
配列番号２３～２８および１２２からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のヌクレオチド配列を含み、
第一および第二のヌクレオチド配列が前記ポリヌクレオチドからインフレームでおよび単一転写物で発現され、さらに
前記合成転写活性化因子融合タンパク質が、標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結している対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させる、核酸分子。
【請求項８】
前記トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１１である、請求項７に記載の核酸分子。
【請求項９】
前記標的ポリヌクレオチドが、配列番号６７、配列番号６８および配列番号９９からなる群から選択される、請求項７に記載の核酸分子。
【請求項１０】
前記ポリヌクレオチドが配列番号８１または配列番号８８と少なくとも８０％同一である、請求項７に記載の核酸分子。
【請求項１１】
前記ポリヌクレオチドが配列番号８１または配列番号８８と少なくとも９０％同一である、請求項７に記載の核酸分子。
【請求項１２】
前記ポリヌクレオチドが配列番号８１または配列番号８８である、請求項７に記載の核酸分子。
【請求項１３】
前記ＤＮＡ結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、ＧＡＬ４、ＴＡＬ、ＬｅｘＡ、Ｔｅｔリプレッサー、ＬａｃＲ、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項７または８に記載の核酸分子。
【請求項１４】
前記ポリヌクレオチドが、ＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする少なくとも１つの追加のヌクレオチド配列を含む、請求項７または８に記載の核酸分子。
【請求項１５】
前記ポリヌクレオチドが、トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドをコードする少なくとも１つの追加のヌクレオチド配列を含む、請求項７または８に記載の核酸分子。
【請求項１６】
前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、遺伝子

調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項７または８に記載の核酸分子。
【請求項１７】
前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドにおいて、第一および第二のヌクレオチド配列が第三のヌクレオチド配列により分離されている、請求項７または８に記載の核酸分子。
【請求項１８】
ベクターである、請求項７または８に記載の核酸分子。
【請求項１９】
選択可能マーカーまたはスクリーニング可能マーカーを含むベクターである、請求項１８に記載の核酸分子。
【請求項２０】
植物発現ベクターである、請求項１８に記載の核酸分子。
【請求項２１】
請求項７～１２のいずれか一項に記載の核酸分子を含む細胞。
【請求項２２】
酵母細胞である、請求項２１に記載の細胞。
【請求項２３】
前記細胞が植物細胞であり、前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、前記植物細胞において機能的なプロモーターに作動可能に連結している、請求項２１に記載の細胞。
【請求項２４】
前記核酸分子が前記植物細胞のゲノム内に組み込まれる、請求項２３に記載の植物細胞。
【請求項２５】
請求項２３に記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物材料。
【請求項２６】
前記植物材料が、植物組織または植物部分である、請求項２５に記載のトランスジェニック植物材料。
【請求項２７】
請求項２３に記載の植物細胞を含む、植物商品生産物。
【請求項２８】
合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むトランスジェニック植物であって、前記ポリヌクレオチドが、
標的ポリヌクレオチドに特異的に結合するＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする第一のヌクレオチド配列、および
配列番号２３～２８および１２２からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のヌクレオチド配列を含み、
前記第一および第二のヌクレオチド配列が前記ポリヌクレオチドからインフレームでおよび単一転写物で発現され、さらに
前記合成転写活性化因子融合タンパク質が、標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結している対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させる、トランスジェニック植物。
【請求項２９】
前記トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１１である、請求項２８に記載のトランスジェニック植物。
【請求項３０】
前記標的ポリヌクレオチドが、配列番号６７、配列番号６８および配列番号９９からなる群から選択される、請求項２８に記載のトランスジェニック植物。
【請求項３１】
前記ポリヌクレオチドが配列番号８１または配列番号８８と少なくとも８０％同一であ

る、請求項２８に記載のトランスジェニック植物。
【請求項３２】
前記ポリヌクレオチドが配列番号８１または配列番号８８と少なくとも９０％同一である、請求項２８に記載のトランスジェニック植物。
【請求項３３】
前記ポリヌクレオチドが配列番号８１または配列番号８８である、請求項２８に記載のトランスジェニック植物。
【請求項３４】
植物細胞において対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させるための方法であって、
前記標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結した対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主植物細胞に、請求項７～１２のいずれか一項に記載の核酸分子を導入し、
それによって前記植物細胞において対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させることを含む方法。
【請求項３５】
前記核酸分子を植物細胞に導入することが、前記分子を用いて植物細胞を形質転換することを含み、前記分子がベクターである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが植物細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
対象のポリペプチドが、前記植物細胞に対して外来性のポリペプチドである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３８】
対象のポリペプチドが、前記植物細胞に対して内在性のポリペプチドである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３９】
前記核酸分子を植物細胞に導入することが、前記核酸分子を含む植物を、前記核酸分子を含まない植物と交雑させ、植物細胞を含む子孫植物を生産することを含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項４０】
植物細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、
標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結している対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を請求項２３に記載の植物細胞に導入し、
それによって植物細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。
【請求項４１】
前記核酸分子を植物細胞に導入することが、前記分子によって前記植物を形質転換することを含み、前記分子がベクターである、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが植物細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項４０に記載の方法。
【請求項４３】
対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結した標的ポリヌクレオチドが、植物細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記核酸分子を植物細胞に導入することが、前記核酸分子を含む植物を前記核酸分子を含まない植物と交雑させて、植物細胞を含む子孫植物を産生することを含む、請求項４０に記載の方法。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２５６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２５６】
ｇｕｓ発現分析　ハイグロマイシン上で選択されるイベントは、２つのＤＮＡ加水分解プローブアッセイを使用してｇｕｓ遺伝子転写物レベルについて分析される。個々のイベントごとのｇｕｓ　ｍＲＮＡの定常状態レベルは、配列特異的プライマーとプローブを使用して評価される。前記ｍＲＮＡは、内在性タバコ基準遺伝子、例えば、ＢＹＥＥＦのｍＲＮＡの定常状態レベルを使用して正規化される。両遺伝子のアッセイは実施例４に記載されるプロトコールを使用して設計される。リアルタイムＰＣＲデータの解析は、相対定量モジュールを使用するＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）ソフトウェアを使用して実施され、ΔΔＣｔ法に基づいている。様々な活性化因子構築物の相対的発現レベルが比較される。

本発明は、以下の態様を含む。
［１］
ＤＮＡ結合ポリペプチド、および　配列番号１０～５８からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む合成転写活性化因子融合タンパク質。
［２］
ＤＮＡ結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、ＧＡＬ４、ＴＡＬ、ＬｅｘＡ、Ｔｅｔリプレッサー、ＬａｃＲ、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［３］
少なくとも１つの追加のＤＮＡ結合ポリペプチドを含む、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［４］
配列番号２～８および配列番号１００～１２０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［５］
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択される、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［６］
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１７、配列番号２３、配列番号２９、配列番号３５、配列番号４１、配列番号４７、および配列番号５３からなる群から選択される、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［７］
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１８、配列番号２４、配列番号３０、配列番号３６、配列番号４２、配列番号４８、および配列番号５４からなる群から選択される、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［８］
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号１９、配列番号２５、配列番号３１、配列番号３７、配列番号４３、配列番号４９、および配列番号５５からなる群から選択される、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。

［９］
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号２０、配列番号２６、配列番号３２、配列番号３８、配列番号４４、配列番号５０、および配列番号５６からなる群から選択される、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［１０］
トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドが配列番号２１、配列番号２７、配列番号３３、配列番号３９、配列番号４５、配列番号５１、および配列番号５７からなる群から選択される、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［１１］
少なくとも１つの追加のトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む、［１］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［１２］
対象のヌクレオチド配列が第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結している場合、対象のヌクレオチド配列の発現を増加させる合成転写活性化因子融合タンパク質であって、第二のヌクレオチド配列に特異的に結合するＤＮＡ結合ポリペプチド、および配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるタンパク質トランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む融合タンパク質。
［１３］
ＤＮＡ結合ポリペプチド、および配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも８０％の配列同一性を有するトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドを含む合成転写活性化因子融合タンパク質。
［１４］
トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも８５％の配列同一性を有する、［１３］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［１５］
トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有する、［１３］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［１６］
トランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドが、配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、および配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９５％の配列同一性を有する、［１３］に記載の合成転写活性化因子融合タンパク質。
［１７］
合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、ＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および配列番号１０～５８からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。
［１８］
ＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする少なくとも１つの追加のポリヌクレオチド配列を含む、［１７］に記載の核酸。
［１９］
配列番号１０～５８からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用ポリペプチドをコードする少なくとも１つの追加のポリヌクレオチド配列を含む、［１７］に記

載の核酸。
［２０］
第一および第二のポリヌクレオチド配列が遺伝子調節エレメントに作動可能に連結されている、［１７］に記載の核酸。
［２１］
第一および第二のポリヌクレオチド配列が第三のポリヌクレオチド配列により分離されている、［１７］に記載の核酸。
［２２］
宿主細胞のゲノムに組み込まれている、［１７］に記載の核酸。
［２３］
宿主細胞が植物細胞である、［２２］に記載の核酸。
［２４］
ＤＮＡ結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、ＧＡＬ４、ＴＡＬ、ＬｅｘＡ、Ｔｅｔリプレッサー、ＬａｃＲ、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、［１７］に記載の核酸。
［２５］
ＤＮＡ結合ポリペプチドが、配列番号６７、配列番号６８、および配列番号９９からなる群から選択される配列に特異的に結合する、［２４］に記載の核酸。
［２６］
［１７］に記載の核酸を含むベクター。
［２７］
選択可能マーカーまたはスクリーニング可能マーカーを含む、［２６］に記載のベクター。
［２８］
植物発現ベクターである、［２６］に記載のベクター。
［２９］
合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、ＤＮＡ結合ポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、および配列番号２～８、配列番号１０～１６、配列番号２２、配列番号２８、配列番号３４、配列番号４０、配列番号４６、配列番号５２、配列番号５８、および配列番号１００～１２０からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも８０％の配列同一性を有するトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、第一および第二のポリヌクレオチド配列が前記核酸からインフレームでおよび単一転写物で発現される、核酸。
［３０］
配列番号８０～９３からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、［２９］に記載の核酸。
［３１］
配列番号８０～９３からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも８５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、［２９］に記載の核酸。
［３２］
配列番号８０～９３からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、［２９］に記載の核酸。
［３３］
配列番号８０～９３からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも９５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、［２９］に記載の核酸。
［３４］
配列番号８０～９３からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも９７％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、［２９］に記載の核酸。
［３５］

配列番号８０～９３からなる群から選択されるヌクレオチド配列に少なくとも９８％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、［２９］に記載の核酸。
［３６］
配列番号８０～９３からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、［２９］に記載の核酸。
［３７］
ＤＮＡ結合ポリペプチドが、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＡＶＲＢＳ３誘導性遺伝子由来のコンセンサス結合配列またはそれから操作された合成結合配列、ＧＡＬ４、ＴＡＬ、ＬｅｘＡ、Ｔｅｔリプレッサー、ＬａｃＲ、およびステロイドホルモン受容体からなる群から選択される、［２９］に記載の核酸。
［３８］
合成転写活性化因子融合タンパク質をコードする核酸であって、配列番号８０～９３、配列番号８０～９３のうちの１つと実質的に同一であるヌクレオチド配列、配列番号８０～９３のうちの少なくとも１つに特異的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドの相補体、および配列番号８０～９３のうちの少なくとも１つに特異的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドの逆相補体からなる群から選択される少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸。
［３９］
［１７］に記載の核酸を含む細胞。
［４０］
植物細胞または酵母細胞である、［３９］に記載の細胞。
［４１］
［２９に記載の核酸を含む細胞。
［４２］
植物細胞または酵母細胞である、［４１］に記載の細胞。
［４３］
［３９］に記載の細胞を含む植物組織、植物部分、植物商品生産物、または植物体全体。
［４４］
［４１］に記載の細胞を含む植物組織、植物部分、植物商品生産物、または植物体全体。
［４５］
宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、ＤＮＡ結合ポリペプチドに特異的に結合する第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている対象のヌクレオチド配列を含む宿主細胞に、［１７］に記載の核酸を導入し、それによって宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させることを含む方法。
［４６］
前記核酸を宿主細胞に導入することが、前記核酸を含むベクターを宿主細胞に導入することを含む、［４５］に記載の方法。
［４７］
前記核酸が宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、［４５］に記載の方法。
［４８］
対象のヌクレオチド配列が外来性ヌクレオチド配列である、［４５］に記載の方法。
［４９］
対象のヌクレオチド配列が内在性ヌクレオチド配列である、［４５］に記載の方法。
［５０］
前記核酸を宿主細胞に導入することが、前記核酸を含む植物を、宿主細胞を含む植物と交雑させることを含む、［４５］に記載の方法。
［５１］
宿主細胞において対象のヌクレオチド配列の発現を増加させるための方法であって、Ｄ

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

［５２］

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

［５３］

前記核酸が宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる、［５１］に記載の方法。

［５４］

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

［５５］

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

［５６］

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

［５７］

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

［５８］

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

［５９］

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

［６０］

配列番号１２１～１２７からなる群から選択されるトランス活性化ドメイン相互作用モチーフポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

［６１］

［６０］に記載の核酸に特異的にハイブリダイズ可能である核酸の相補体。

［６２］

［６０］に記載の核酸に特異的にハイブリダイズ可能である核酸の逆相補体。

［６３］

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

［６４］

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

［６５］

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

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A01H 5/00	***(2006.01)***	Ａ０１Ｈ　5/00	Ａ	
C07K 14/415	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ　14/415		
C07K 14/00	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ　14/00		

(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁
(72)発明者　ペトリノ，ジョゼフ
アメリカ合衆国　４６０７７　インディアナ州，ズィオンスヴィレ，ウッドストック　コート　２７０
(72)発明者　リ，ジャンクアン
アメリカ合衆国　４６０７７　インディアナ州，ズィオンスヴィレ，イーグル　レイク　ドライブ　６２０２
(72)発明者　エバンス，スティーブン，エル.
アメリカ合衆国　４６０７７　インディアナ州，ズィオンスヴィレ，ロックレス　コート　４６５４
(72)発明者　ブルー，ライアン，シー.
アメリカ合衆国　４６０３７　インディアナ州，フィッシャーズ，グレン　アビー　レーン　１００８０

Ｆターム(参考)　2B030 AA02 AB04 AD08 AD20 CA17 CB02
4B065 AA89X AA89Y AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA53 CA60
4H045 AA10 AA20 BA40 BA41 CA30 EA05 EA60 FA74

【外国語明細書】
2017176183000001.pdf