

[illegible]

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内で複数の標的配列をダウン制御する方法であって、

(a) 二重鎖 RNA 又はヘアピンを形成することができる修飾された miRNA 前駆体をコードするポリヌクレオチドを含む核酸構築物を細胞に導入するが、その際、修飾された miRNA 前駆体は修飾された miRNA 及び当該修飾された miRNA に相補な配列を含み、但し、修飾された miRNA は、(i) 標的配列に対して完全相補であるか、(ii) GU 塩基対を除く標的配列に対して完全相補であるか、又は (iii) miRNA の 5' エンドから数えて最初の 10 ヌクレオチド中の標的配列に完全相補であるように修飾された miRNA であり、そして

(b) miRNA を生産するのに十分な時間、核酸構築物を発現させるが、その際、修飾された miRNA が標的配列の発現をダウン制御する、方法。

【請求項 2】

核酸構築物が、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

細胞が植物細胞である、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

細胞が、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、及びタバコからなる群から選択される、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

修飾された miRNA が標的配列に結合して、二重鎖 RNA が分割される、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

修飾された miRNA が、標的配列に対して完全相補になるように修飾された植物の miRNA である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

植物 miRNA が、アラビドプシス、トマト、ダイズ、イネ及びトウモロコシからなる群から選択される、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

修飾された miRNA が、GU 塩基対の使用を除いて、標的配列に対して完全相補になるように修飾された植物の miRNA である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

植物 miRNA が、アラビドプシス、トマト、ダイズ、イネ及びトウモロコシからなる群から選択される、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

標的配列が植物病原体の RNA である、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】

プロモーターが病原体により誘導可能なプロモーターである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

標的配列を含む植物病原体が植物ウイルス又は植物ウイロイドである、請求項 10 又は 11 項記載の方法。

【請求項 13】

標的配列がウイルスの必須領域の配列、ウイルスのファミリーの保存された配列及び別のウイルスファミリーのメンバー間の保存された配列からなる群から選択される、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

核酸構築物が 2 つ又はそれより多い修飾 miRNA 前駆体配列を含む、請求項 13 記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 15】

核酸構築物がヘテロ重合体前駆体 *miRNA* 又はホモ重合体前駆体 *miRNA* である、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

標的配列が *RNA* の非コーディング領域である、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

標的配列が *RNA* のコーディング領域である、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 18】

標的配列が *RNA* のスプライス部位を含む、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 19】

核酸構築物が細胞の遺伝子又はトランス遺伝子のイントロンに挿入された、請求項 1 記載の方法。

【請求項 20】

二重鎖 *RNA* 又はヘアピンを形成することができる修飾された *miRNA* 前駆体をコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸であって、但し、修飾された *miRNA* 前駆体は修飾された *miRNA* 及び当該修飾された *miRNA* に相補な配列を含み、但し、修飾された *miRNA* は、(i) 標的配列に対して完全相補であるか、(ii) *GU* 塩基対を除く標的配列に対して完全相補であるか、又は (iii) *miRNA* の 5' エンドから数えて最初の 10 ヌクレオチド中の標的配列に完全相補であるように修飾された *miRNA* である、単離された核酸。

20

【請求項 21】

ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項 20 記載の単離された核酸。

【請求項 22】

修飾された *miRNA* が、標的配列に対して完全相補になるように修飾された植物の *miRNA* である、請求項 20 又は 21 記載の単離された核酸。

【請求項 23】

植物 *miRNA* が、アラビドプシス、トマト、ダイズ、イネ及びトウモロコシからなる群から選択される、請求項 22 記載の単離された核酸。

30

【請求項 24】

修飾された *miRNA* が、*GU* 塩基対の使用を除いて、標的配列に対して完全相補になるように修飾された植物の *miRNA* である、請求項 20 記載の単離された核酸。

【請求項 25】

植物 *miRNA* が、アラビドプシス、トマト、ダイズ、イネ及びトウモロコシからなる群から選択される、請求項 24 記載の単離された核酸。

【請求項 26】

標的配列が植物病原体の *RNA* である、請求項 20 乃至 25 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

40

【請求項 27】

プロモーターが病原体により誘導可能なプロモーターである、請求項 26 記載の単離された核酸。

【請求項 28】

標的配列を含む植物病原体が植物ウイルス又は植物ウイロイドである、請求項 26 又は 27 項記載の単離された核酸。

【請求項 29】

標的配列がウイルスの必須領域の配列、ウイルスのファミリーの保存された配列及び別のウイルスファミリーのメンバー間の保存された配列からなる群から選択される、請求項 2

50

8 記載の単離された核酸。

【請求項 30】

核酸構築物が 2 つ又はそれより多い修飾 miRNA 前駆体配列を含む、請求項 29 記載の単離された核酸構築物。

【請求項 31】

核酸構築物がヘテロ重合体前駆体 miRNA 又はホモ重合体前駆体 miRNA である、請求項 30 記載の単離された核酸。

【請求項 32】

標的配列が RNA の非コーディング領域である、請求項 20 乃至 25 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

10

【請求項 33】

標的配列が RNA のコーディング領域である、請求項 20 乃至 25 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

【請求項 34】

標的配列が RNA のスプライス部位を含む、請求項 20 乃至 25 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

【請求項 35】

請求項 20 乃至 34 のいずれか 1 項記載の単離された核酸を含む細胞。

【請求項 36】

細胞が植物細胞である、請求項 35 記載の細胞。

20

【請求項 37】

植物が、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、及びタバコからなる群から選択される、請求項 36 記載の細胞。

【請求項 38】

単離された核酸構築物が細胞の遺伝子又はトランス遺伝子のイントロンに挿入された、請求項 35 乃至 38 のいずれか 1 項記載の細胞。

【請求項 39】

請求項 20 乃至 34 のいずれか 1 項記載の単離された核酸を含むトランスジェニック植物。

30

【請求項 40】

植物が、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、及びタバコからなる群から選択される、請求項 39 記載のトランスジェニック植物。

【請求項 41】

単離された核酸が細胞の遺伝子又はトランス遺伝子のイントロンに挿入された、請求項 39 又は 40 記載の細胞。

【請求項 42】

請求項 39 乃至 41 のいずれか 1 項記載のトランスジェニック植物の種子。

40

【請求項 43】

細胞内で複数の標的配列をダウン制御する方法であって、

(a) 互いに作動可能に連結された 2 つ又はそれより多いポリヌクレオチドを含む核酸構築物を細胞に導入するが、各ポリヌクレオチドは二重鎖 RNA 又はヘアピンを形成することができる修飾された miRNA 前駆体をコードし、各修飾された miRNA 前駆体は修飾された miRNA 及び当該修飾された miRNA に相補な配列を含み、但し、各修飾された miRNA は、(i) 標的配列に対して完全相補であるか、(ii) GU 塩基対を除く標的配列に対して完全相補であるか、又は (iii) miRNA の 5' エンドから数えて最初の 10 ヌクレオチド中の標的配列に完全相補であるように修飾された miRNA であり、そして

(b) 2 つ又はそれより多い miRNA s を生産するのに十分な時間、核酸構築物を発

50

現させるが、その際、各修飾された *miRNA* が標的配列の発現をダウン制御する、方法。

【請求項 44】

核酸構築物が、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項 43 記載の方法。

【請求項 45】

細胞が植物細胞である、請求項 43 又は 44 記載の方法。

【請求項 46】

細胞が、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、及びタバコからなる群から選択される、請求項 45 記載の方法。

10

【請求項 47】

修飾された *miRNA* が標的配列に結合して、二重鎖 *RNA* が分割される、請求項 43 乃至 46 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 48】

修飾された *miRNA* が、標的配列に対して完全相補になるように修飾された植物の *miRNA* である、請求項 47 記載の方法。

【請求項 49】

植物 *miRNA* が、アラビドプシス、トマト、ダイズ、イネ及びトウモロコシからなる群から選択される、請求項 48 記載の方法。

20

【請求項 50】

修飾された *miRNA* が、*GU* 塩基対の使用を除いて、標的配列に対して完全相補になるように修飾された植物の *miRNA* である、請求項 49 記載の方法。

【請求項 51】

植物 *miRNA* が、アラビドプシス、トマト、ダイズ、イネ及びトウモロコシからなる群から選択される、請求項 50 記載の方法。

【請求項 52】

核酸構築物がヘテロ重合体前駆体 *miRNA* 又はホモ重合体前駆体 *miRNA* である、請求項 43 乃至 51 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 53】

標的配列が植物病原体の *RNA* である、請求項 52 記載の方法。

30

【請求項 54】

プロモーターが病原体により誘導可能なプロモーターである、請求項 53 記載の方法。

【請求項 55】

標的配列を含む植物病原体が植物ウイルス又は植物ウイロイドである、請求項 53 又は 54 項記載の方法。

【請求項 56】

標的配列がウイルスの必須領域の配列、ウイルスのファミリーの保存された配列及び別のウイルスファミリーのメンバー間の保存された配列からなる群から選択される、請求項 55 記載の方法。

40

【請求項 57】

標的配列が *RNA* の非コーディング領域である、請求項 43 乃至 51 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 58】

標的配列が *RNA* のコーディング領域である、請求項 43 乃至 51 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 59】

標的配列が *RNA* のスプライス部位を含む、請求項 43 乃至 51 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 60】

50

核酸構築物が細胞の遺伝子又はトランス遺伝子のイントロンに挿入された、請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 6 1】

互いに作動可能に連結された 2 つ又はそれより多いポリヌクレオチドを含む単離された核酸であって、各ポリヌクレオチドは二重鎖 RNA 又はヘアピンを形成することができる修飾された miRNA 前駆体をコードし、但し、修飾された miRNA 前駆体は修飾された miRNA 及び当該修飾された miRNA に相補な配列を含み、但し、各修飾された miRNA は、(i) 標的配列に対して完全相補であるか、(i i) GU 塩基対を除く標的配列に対して完全相補であるか、又は (i i i) miRNA の 5' エンドから数えて最初の 10 ヌクレオチド中の標的配列に完全相補であるように修飾された miRNA である、単離された核酸。

10

【請求項 6 2】

ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項 6 1 記載の単離された核酸。

【請求項 6 3】

修飾された miRNA が、標的配列に対して完全相補になるように修飾された植物の miRNA である、請求項 6 1 又は 6 2 記載の単離された核酸。

【請求項 6 4】

植物 miRNA が、アラビドプシス、トマト、ダイズ、イネ及びトウモロコシからなる群から選択される、請求項 6 3 記載の単離された核酸。

20

【請求項 6 5】

修飾された miRNA が、GU 塩基対の使用を除いて、標的配列に対して完全相補になるように修飾された植物の miRNA である、請求項 6 4 記載の単離された核酸。

【請求項 6 6】

植物 miRNA が、アラビドプシス、トマト、ダイズ、イネ及びトウモロコシからなる群から選択される、請求項 6 5 記載の単離された核酸。

【請求項 6 7】

核酸構築物がヘテロ重合体前駆体 miRNA 又はホモ重合体前駆体 miRNA である、請求項 6 1 乃至 6 6 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

【請求項 6 8】

標的配列が植物病原体の RNA である、請求項 6 7 記載の単離された核酸。

30

【請求項 6 9】

プロモーターが病原体により誘導可能なプロモーターである、請求項 6 8 記載の単離された核酸。

【請求項 7 0】

標的配列を含む植物病原体が植物ウイルス又は植物ウイロイドである、請求項 6 7 又は 6 8 項記載の単離された核酸。

【請求項 7 1】

標的配列がウイルスの必須領域の配列、ウイルスのファミリーの保存された配列及び別のウイルスファミリーのメンバー間の保存された配列からなる群から選択される、請求項 7 0 記載の単離された核酸構築物。

40

【請求項 7 2】

標的配列が RNA の非コーディング領域である、請求項 6 1 乃至 6 6 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

【請求項 7 3】

標的配列が RNA のコーディング領域である、請求項 6 1 乃至 6 6 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

【請求項 7 4】

標的配列が RNA のスプライス部位を含む、請求項 6 1 乃至 6 6 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

50

【請求項 75】

請求項 61 乃至 74 のいずれか 1 項記載の単離された核酸を含む細胞。

【請求項 76】

細胞が植物細胞である、請求項 75 記載の細胞。

【請求項 77】

植物が、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、及びタバコからなる群から選択される、請求項 76 記載の細胞。

【請求項 78】

単離された核酸構築物が細胞の遺伝子又はトランス遺伝子のイントロンに挿入された、請求項 75 乃至 77 のいずれか 1 項記載の細胞。

10

【請求項 79】

請求項 61 乃至 74 のいずれか 1 項記載の単離された核酸を含むトランスジェニック植物。

【請求項 80】

植物が、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、及びタバコからなる群から選択される、請求項 79 記載のトランスジェニック植物。

【請求項 81】

単離された核酸構築物が細胞の遺伝子又はトランス遺伝子のイントロンに挿入された、請求項 79 又は 80 記載の細胞。

20

【請求項 82】

請求項 79 乃至 81 のいずれか 1 項記載のトランスジェニック植物の種子。

【請求項 83】

標的配列を含む RNA がウイルスの遺伝子サイレンシングサプレッサーをコードする、請求項 10 記載の方法。

【請求項 84】

標的配列を含む RNA が HC-Pro 及び P69 からなる群から選択されるポリヌクレオチドをコードする、請求項 83 記載の方法。

【請求項 85】

標的配列を含む RNA がウイルスの遺伝子サイレンシングサプレッサーをコードする、請求項 26 記載の単離された核酸。

30

【請求項 86】

標的配列を含む RNA が HC-Pro 及び P69 からなる群から選択されるポリヌクレオチドをコードする、請求項 85 記載の単離された核酸。

【請求項 87】

標的配列を含む RNA がウイルスの遺伝子サイレンシングサプレッサーをコードする、請求項 53 記載の方法。

【請求項 88】

標的配列を含む RNA が HC-Pro 及び P69 からなる群から選択されるポリヌクレオチドをコードする、請求項 87 記載の方法。

40

【請求項 89】

標的配列を含む RNA がウイルスの遺伝子サイレンシングサプレッサーをコードする、請求項 68 記載の単離された核酸。

【請求項 90】

標的配列を含む RNA が HC-Pro 及び P69 からなる群から選択されるポリヌクレオチドをコードする、請求項 89 記載の単離された核酸。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

50

発明の分野

【0001】 本発明の分野は、一般に、植物分子生物学及び植物バイオテクノロジーに関する。より特定すれば、本発明の分野は、標的遺伝子の発現を抑圧するか又は標的遺伝子をダウン制御するための構築物及び方法に関する。

発明の背景

【0002】

【0002】 RNA干渉は、短い干渉RNAs (siRNAs) により媒介される動物内の配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを意味する (Fire et al. (1998) Nature 391: 806 - 811)。植物内の対応するプロセスは、一般に、転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) 又はRNAサイレンシングと呼ばれ、真菌においては鎮圧 (quelling) とも呼ばれる。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を妨害するために用いられた進化上保存された細胞防御機構であると考えられ、一般には、別種の叢 (flora) と門 (phyla) により共有される (Fire (1999) Trends Genet. 15: 358 - 363)。外来遺伝子発現からのそのような防御は、ウイルス感染に由来するか、或いはウイルスゲノムRNAの相同な単鎖RNAを特異的に破壊する細胞応答による宿主ゲノムへのトランスポゾン要素のランダムな組み込みに由来する、二重鎖RNAs (dsRNAs) の生産に応答して進化してきたのかもしれない。細胞内のdsRNAの存在は、今のところ完全に特性決定されなければならない機構によりRNAi応答を誘発する。

10

20

【0003】

【0003】 小RNAi分子の新規なクラスは、動物から植物にわたり多数の真核生物において遺伝子発現を制御することに関与する。これらの短いRNAs又はマイクロRNAs (miRNAs; miRs) はメッセンジャーRNAsを標的としてそれらの翻訳を抑制するか又はそれらの分解を誘導するために特異的に塩基対合する20 - 22ヌクレオチド長の分子である。最近の報告は、脊椎動物、シノラブディスエレガンス、ドロソフィラ及びアラビドプシスサリアナからの多数のmiRNAsを同定した (Bartel (2004) Cell 116: 281 - 297; He and Hannon (2004) Nature Reviews Genetics 5: 522 - 531)。

【0004】

【0004】 ウイルス、例えば、カブモザイクウイルス (TuMV) 及びカブ黄化モザイクウイルス (TYMV) は、甚だしい穀物の損失を全世界で引き起こし、農業に対して重大な経済的衝撃を有する (Morch et al. (1998) Nucleic Acids Res 16: 6157 - 6173; Skotnicki et al. (1992) Arch Virol 127: 25 - 35; Tomlinson (1987) Ann Appl Biol 110: 661 - 681)。全てではないがほとんどの (most if not all) 植物ウイルスは宿主の転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) 機構を抑圧することができ一つ又はそれより多くの蛋白質をコードして、宿主細胞においてそれらの複製の成功を保証する。PTGSはウイルスゲノムの複製において中間体として生産される二重鎖RNAsの分解を誘発することによりウイルスに対して防御するために植物宿主が用いる機構である (Bernstein et al. (2001) Nature 409: 363 - 366; Hamilton and Baulcombe (1999) Science 286: 950 - 952; Zamore et al. (2000) Cell 31: 25 - 33)。

30

40

【0005】

【0005】 ウイルス遺伝子を含む特定の遺伝子の活性の低下 (遺伝子サイレンシング、又は遺伝子抑圧とも呼ばれる) は、植物において遺伝子操作するいくつかの側面に関して望まれる。標的遺伝子の広い選択に対して遺伝子抑圧を誘導し、そして高い効率にて標的遺伝子の有効なサイレンシングをもたらす、方法及び構築物に関する要求が存在する。

【0006】

発明の概要

50

【0006】 一つの側面によれば、本発明は、細胞内で標的配列をダウン制御する方法、及びこの方法における使用のための核酸構築物、並びに当該核酸構築物における使用のためのポリヌクレオチドを提供する。当該方法は、標的配列を阻害するmiRNAを生産することのできる核酸構築物を細胞に導入し、そして当該miRNAを生産するのに十分な時間、当該核酸構築物を発現させることを含む。当該核酸構築物は、二重鎖RNA又はヘアピンを形成することのできる修飾されたmiRNA前駆体をコードするポリヌクレオチドを含み、但し、当該修飾されたmiRNA前駆体は修飾されたmiRNA及び修飾されたRNAに相補な配列を含み、修飾されたmiRNAは、(i)標的配列に完全相補であるか又は(ii)GU塩基対合を除いて標的配列に完全相補のように修飾されたmiRNAである。当業界で知られるとおり、pre-miRNAは、二重鎖領域が極めて短く、例えば21-25bpの長さを超えないいくつかの場合に、ヘアピンを形成する。当該核酸構築物は、さらに、ポリヌクレオチドに対して作動可能に連結したプロモーターを含んでよい。当該細胞は植物細胞であってよく、単子葉又は双子葉の何れかであり、限定ではないが、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、タバコを含む。プロモーターは病原体誘導性プロモーター又は他の誘導可能なプロモーターであってよい。修飾されたmiRNAの標的RNAへの結合は、標的RNAの分割を導く。標的RNAの標的配列は、コーディング配列、イントロン又はスプライス部位であってよい。

10

【0007】

【0007】 別の側面によれば、本発明は、修飾された植物miRNAをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供し、当該修飾前駆体は二重鎖RNA又はヘアピンを形成することができ、そして修飾されたmiRNA及び修飾されたmiRNAに相補な配列を含み、但し、修飾されたmiRNAは、(i)標的配列に完全相補であるか又は(ii)GU塩基対合を除いて標的配列に完全相補のように修飾されたmiRNAである。ポリヌクレオチドの発現は、標的配列の発現を阻害する成熟miRNAを提供するように宿主細胞内でプロセッシングを受ける(processed)miRNA前駆体を生産する。当該ポリヌクレオチドは核酸構築物であってよく又は修飾された植物miRNA前駆体であってよい。当該核酸構築物は、さらに、ポリヌクレオチドへ作動可能のように連結されたプロモーターを含んでよい。修飾されたmiRNAの標的RNAへの結合は、標的RNAの分割を導く。標的RNAの標的配列はコーディング配列、非コーディング配列又はスプライス部位であってよい。

20

30

【0008】

【0008】 別の側面によれば、本発明は、複数の標的配列を抑圧するための核酸構築物を提供する。当該核酸構築物は、少なくとも2から45まで又はそれより多いポリヌクレオチドを含み、各々が二重鎖RNA又はヘアピンを形成することのできるmiRNA前駆体をコードする。各miRNAは実質上標的に相補性であるか又は上記のとおり標的に相補のように修飾される。いくつかの態様において、構築物中の前駆体miRNAsをコードするポリヌクレオチドの各々は、個別に単一のプロモーターの制御下に配置される。いくつかの態様において、前駆体miRNAsをコードする複数のポリヌクレオチドは、単一のプロモーター制御下に配置され得るように、共に作動可能のように連結される。プロモーターは、複数のmiRNAsの構築物へ作動可能のように連結してよく、又は単一のプロモーターに作動可能に連結されるようにして複数のmiRNAsの構築物を宿主ゲノムに挿入してよい。プロモーターは、病原体誘導可能なプロモーターであるか又は他の誘導可能なプロモーターであってよい。いくつかの態様において、複数のポリヌクレオチドが互いに連結されることにより、発現されたときに単一の転写物を形成する。核酸構築物中のポリヌクレオチドの発現は、複数のmiRNA前駆体を生成し、宿主細胞内でプロセッシングを受けることにより、複数の成熟miRNAsを提供し、各々が標的配列の発現を阻害する。一つの態様において、成熟miRNAの各々の標的RNAの各々への結合は、標的RNAの各々の分割を導く。標的RNAの標的配列は、コーディング配列、非コーディング配列又はスプライス部位であってよい。

40

50

【 0 0 0 9 】

[0 0 0 9] 別の側面によれば、本発明は、細胞内で複数の標的配列をダウン制御する方法を提供する。当該方法は、複数の *miRNA* を生産することのできる核酸構築物を細胞内へ導入し、そして複数の *miRNAs* を生産するのに十分な時間、当該核酸構築物を発現させるが、その際、*miRNAs* の各々が標的配列の発現を阻害する。当該核酸構築物は、少なくとも 2 から 45 まで又はそれより多いポリヌクレオチドを含み、各々が二重鎖 *RNA* 又はヘアピンを形成することのできる *miRNA* 前駆体をコードする。各 *miRNA* は実質上標的に相補性であるか又は上記のとおり標的に相補なように修飾される。いくつかの態様において、構築物中の前駆体 *miRNAs* をコードするポリヌクレオチドの各々は、個別に単一のプロモーターの制御下に配置される。いくつかの態様において、前駆体 *miRNAs* をコードする複数のポリヌクレオチドは、上記のとおり、単一のプロモーター制御下にあり得るように、共に作動可能なように連結される。いくつかの態様においては、複数のポリヌクレオチドが互いに連結されることにより、発現されたときに単一の転写物を形成する。いくつかの態様において、構築物は、ヘテロ重合体 *pre-miRNA* であるか又はホモ - 重合体 *pre-miRNA* であってよい。核酸構築物中のポリヌクレオチドの発現は、複数の *miRNA* 前駆体を生成し、宿主細胞内でプロセッシングを受けることにより、複数の成熟 *miRNAs* を提供し、各々が標的配列の発現を阻害する。一つの態様において、成熟 *miRNA* の各々の標的 *RNA* の各々への結合は、標的 *RNA* の各々の分割を導く。標的 *RNA* の標的配列は、コーディング配列、非コーディング配列又はスプライス部位であってよい。

10

20

【 0 0 1 0 】

[0 0 1 0] さらに側面によれば、本発明は、本発明の単離されたポリヌクレオチド又は核酸構築物を含む細胞を提供する。いくつかの態様において、本発明の単離されたポリヌクレオチド又は核酸構築物は、細胞の遺伝子又はトランス遺伝子のイントロンに挿入されてよい。細胞は植物細胞であってよく、単子葉又は双子葉の何れかであり、限定ではないが、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、タバコを含む。

【 0 0 1 1 】

[0 0 1 1] 別の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチド又は核酸構築物を含むトランスジェニック植物を提供する。いくつかの態様において、本発明の単離されたポリヌクレオチド又は核酸構築物は、トランスジェニック植物の遺伝子又はトランス遺伝子のイントロンに挿入されてよい。トランスジェニック植物は、植物細胞であってよく、単子葉又は双子葉の何れかであり、限定ではないが、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ベニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、タバコを含む。

30

【 0 0 1 2 】

[0 0 1 2] さらに側面によれば、本発明は、細胞内で標的配列の発現を阻害する方法を提供し、(a) 第 1 及び第 2 オリゴヌクレオチドを含む修飾植物 *miRNA* 前駆体を含む核酸構築物を細胞内に導入するが、その際、第 1 及び第 2 オリゴヌクレオチドの少なくとも一つが前駆体に対して異種であり、第 1 のオリゴヌクレオチドは標的配列に対して実質上同一の *RNA* 配列をコードし、そして第 2 のオリゴヌクレオチドは標的配列に対して実質上相補な *miRNA* をコードするが、前駆体は *miRNA* をコードし；そして (b) *miRNA* を生産するのに十分な時間、核酸構築物を発現するが、その際、*miRNA* は標的配列の発現を阻害することを含む。

40

【 0 0 1 3 】

[0 0 1 3] 別の側面によれば、本発明は、修飾された植物 *miRNA* 前駆体を含む単離されたポリヌクレオチドを提供し、当該修飾前駆体は第 1 及び第 2 のオリゴヌクレオチドを含み、但し、第 1 及び第 2 オリゴヌクレオチドの少なくとも一つが前駆体に対して異種であり、第 1 のオリゴヌクレオチドは標的配列に対して実質上同一の *RNA* 配列をコー

50

とし、そして第2のオリゴヌクレオチドは標的配列に対して実質上相補なmiRNAをコードし、ポリヌクレオチドの発現が標的配列の発現を阻害するmiRNAを生産する。本発明は、この単離されたポリヌクレオチドを含む細胞にも関する。当該細胞は、植物細胞であってよく、単子葉又は双子葉の何れかであり、限定ではないが、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ペニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、タバコを含む。

【0014】

【0014】さらなる側面によれば、本発明は、本明細書において記載された何れかのような、細胞内で標的配列の発現を阻害する方法を提供するが、さらに、形質転換された植物を生産することを含み、当該植物はmiRNAをコードする核酸構築物を含む。本発明は、そのような方法により生産された植物にも関する。植物は、単子葉又は双子葉の何れかであり、限定ではないが、トウモロコシ、コムギ、イネ、オオムギ、エンバク、モロコシ属、キビ、ヒマワリ、ペニバナ、ワタ、ダイズ、カノーラ、アルファルファ、アラビドプシス、タバコを含む。

10

【0015】

詳細な説明

【0054】最近発見された小RNAsは、遺伝子発現を制御することにおいて重要な役割を担う。開花を含む多くの発生プロセスは小RNAsにより制御される。植物中において小RNAsを生産するトランスジェニック構築物を用いることにより、植物の遺伝子の遺伝子発現における変化を操作することが、今は可能である。

20

【0016】

【0055】発明は、標的とされた配列を抑圧するために有用な方法及び組成物を提供する。当該組成物は、あらゆる種類の植物細胞及び他の細胞において用いることができ、適切なプロセッシング成分（例えば、RNA干渉成分）を含み、例えば、無脊椎及び脊椎動物の細胞を含む。上記組成物及び方法は、アラビドプシスにおいて発見された内生miRNAサイレンシングプロセスに基づき、類似の戦略を用いて組成物の数及び当該方法が用いられる生物を拡大することができる。当該方法は、あらゆる真核細胞系において働くように適合させることができる。さらに、本明細書に記載された組成物及び方法は、個々の細胞、培養液中の細胞又は組織、又は生物中においてインビボにて、又は生物の器官又は他の部分において使用することができる。

30

【0017】

【0056】上記組成物は、標的配列の領域に実質上の相補生を有するmiRNAをコードすることにより標的配列を抑圧する。当該miRNAはRNAに転写された際に、細胞によりプロセッシングを受けてmiRNAを生じ、のちに標的配列の発現を抑圧するヘアピン構造を形成すると予測される核酸構築物中に提供される。

【0018】

【0057】あらゆる特定の標的配列に関するmiRNAをコードするように、核酸構築物が提供される。コードされたmiRNAが標的配列を選択的に標的化して抑圧するように、あらゆるmiRNAを構築物に挿入することができる。

【0019】

【0058】標的配列を抑圧する方法が提供される。当該方法は、上記の構築物を用い、標的配列の領域に対してmiRNAがデザインされて構築物中に挿入される。細胞への導入に際して、生産されたmiRNAは標的配列の発現を抑圧する。標的配列は内生植物配列、又は植物中の異種トランス遺伝子であり得る。標的遺伝子は植物病原体由来の遺伝子であってもよく、例えば、病原ウイルス、線虫、昆虫、又は糸状菌(mold)又は真菌である。

40

【0020】

【0059】上記構築物及び/又はmiRNAを含む植物、細胞、及び種子が提供される。典型的には、上記細胞は植物からの細胞になるが、他の真核細胞も意図され、限定ではないが、酵母、昆虫、線虫、又は動物の細胞を含む。植物細胞は、単子葉及び双子葉か

50

らの細胞を含む。発明は、上記構築物及び／又はm i R N Aを含む植物及び種子も提供する。当該構築物を含むウイルス及び原核細胞も提供される。

【 0 0 2 1 】

[0 0 6 0] 単位、接頭辞及び符号はそれらのS Iで認められた形態にて記載されてよい。他に示さない限り、核酸は左から右へ5'から3'方向に書かれる；アミノ酸配列は左から右へアミノからカルボキシルの方向に、それぞれ書かれる。明細書内に列挙される数値範囲は、範囲を規定する数を含み、そして規定された範囲内の各整数を含む。アミノ酸は、本明細書においては、一般に知られる3文字符号によるか又はI U P A C - I U B バイオケミカルノメンクラチャーコミッションにより推奨される1文字標記により呼ばれる。ヌクレオチドは、同様に、それらの一般に認められる1文字コードにより呼ばれる。他に提供しない限り、本明細書において使用される、ソフトウェア、電気用語及び電子用語は、New I E E E S t a n d a r d D i c t i o n a r y o f E l e c t r i c a l a n d E l e c t r o n i c s T e r m s (5 版、1 9 9 3) に定義されるとおりである。以下に定義される用語は、全体として明細書に対する引用により完全に定義される。

10

【 0 0 2 2 】

[0 0 6 1] 本明細書において使用される「核酸構築物」又は「構築物」は、宿主細胞に導入される単離されたポリヌクレオチドを意味する。この構築物は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、及び／又は修飾されたヌクレオチドのあらゆる組み合わせを含んでよい。当該構築物はR N Aを形成するように転写されてよく、R N Aは二重鎖R N A及び／又はヘアピン構造を形成することができてよい。この構築物は、細胞内で発現されるか、又は単離されるか又は合成により生産してよい。当該構築物は、さらに、プロモーター、又は構築物の操作又は発現を促進させる他の配列を含んでよい。

20

【 0 0 2 3 】

[0 0 6 2] 本明細書において使用される「抑圧」又は「サイレンシング」又は「阻害」は、野生型生物におけるその正常な発現レベルに比較しての、標的配列の生成物の発現のダウン制御を示すために交換可能に使用される。抑圧は、野生型発現レベルに比較して、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%低下した発現を含む。

30

【 0 0 2 4 】

[0 0 6 3] 本明細書において使用される「コードする(e n c o d e s)」又は「コードすること(e n c o d i n g)」は、R N A及び／又はポリペプチドを生じるようにプロセッシングを受けることができるD N A配列を意味する。

【 0 0 2 5 】

[0 0 6 4] 本明細書において使用される「発現(e x p r e s s i o n)」又は「発現すること(e x p r e s s i n g)」は、導入された構築物、内生D N A配列、又は安定に取り込まれた異種D N A配列からのR N A転写物の生成を意味する。当該用語は、上記のD N A前駆体の何れかから生じたm R N Aから生産されたポリペプチドも意味してよい。

40

【 0 0 2 6 】

[0 0 6 5] 本明細書において使用される、核酸に関しての「異種(h e t e r o l o g o u s)」は、外来種を起源とする核酸であるか、又は合成によりデザインされたか、又は同じ種からであるなら、意図的なヒトの介在により組成物及び／又は遺伝子座におけるその天然形態からは実質上修飾された核酸である。異種蛋白質は、外来種を起源としてよく、あるいは、同じ種を起源とするなら、意図的なヒトの介在によりその起源の形態から実質上修飾される。

【 0 0 2 7 】

[0 0 6 6] 「宿主細胞」は、導入された核酸構築物を含み且つ構築物の複製及び／又は発現を支える細胞を意味する。宿主細胞は、原核細胞、例えば、エシェリヒアコリであ

50

るか、又は真核細胞、例えば真菌、酵母、昆虫、両生類、線虫、又は哺乳類の細胞であってよい。あるいは、宿主細胞は、単子葉或いは双子葉植物の細胞であってよい。

【0028】

[0067] 用語「導入された」は、核酸又は蛋白質の細胞への提供を意味する。導入されたは、核酸の原核細胞又は真核細胞への取り込みに対する言及を含み、核酸は細胞のゲノムに取り込まれてよく、そして核酸又は蛋白質の細胞への一過性の供給に対する言及を含む。導入されたは、安定な又は一過性の形質転換方法、並びに有性交配に対する言及を含む。

【0029】

[0068] 用語「単離された」は、物質、例えば、核酸又は蛋白質を意味し、(1) 通常はその天然に生じる環境において見いだされる物質に付随するか又はと相互作用する成分を実質上又は本質的に含まないか又は(2) 当該物質がその天然に生じる環境にあるなら、当該物質は、意図的なヒトの介在により組成物に変化されるか及び/又は当該物質に関して天然の位置とは異なる細胞内の位置に置かれたものである。

【0030】

[0069] 本明細書において使用される「miRNA」は、オリゴリボヌクレオチドを意味し、標的配列転写物を含むポリヌクレオチドの発現を抑圧するか又は標的RNAをダウン制御する。「miRNA前駆体」は、成熟miRNAを生産するようにプロセッシングを受ける大きなポリヌクレオチドを意味し、そしてRNA前駆体をコードし、そしてmiRNAを含むRNA転写物をコードする。「成熟miRNA」はmiRNA前駆体のプロセッシングにより生じたmiRNAを意味する。「miRNA鋳型」は、miRNAをコードする核酸構築物中の単一又は複数のオリゴヌクレオチド領域である。miRNAの「バックサイド」領域は、miRNA鋳型に実質相補なポリヌクレオチド構築物の部分であり、そしてmiRNA鋳型と塩基対を形成すると予測される。miRNA鋳型とバックサイドは、二重鎖ポリヌクレオチドを形成してよく、ヘアピン構造を含む。天然のmiRNAsに関して知られるとおり、成熟miRNA及びその相補体はミスマッチを含みバルジを形成してよく、即ち、完全相補である必要はない。

【0031】

[0070] 本明細書にて使用される、句「標的配列」及び「目的の配列」は交換可能に使用される。標的配列は、発現の抑圧のために選択される核酸配列を意味するために使用され、そしてポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに限定されない。標的配列は、miRNAに実質上又は完全に相補な配列を含む。標的配列はRNA又はDNAであることができ、そして標的配列を含むポリヌクレオチドを意味してもよい。

【0032】

[0071] 本明細書にて使用される「核酸」は、ポリヌクレオチドを意味し、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の単鎖又は二重鎖重合体を含む。核酸は断片又は修飾されたヌクレオチドを含んでもよい。

【0033】

[0072] 「核酸ライブラリー」は、単離されたDNA又はRNAのコレクションを意味し、特定された生物のゲノムの或いはその生物からの組織の全転写フラクションを含み、そして実質上は表す。例示の核酸ライブラリー、例えばゲノムライブラリー及びcDNAライブラリーの構築は、標準の分子生物学の文献、例えば、Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, アカデミックプレス社、サンディエゴ、CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., 編纂、Current Protocols, グリーンパブリッシングアソシエイト社とジョンワイリーアンドソンス社のジョイントベンチャー(1994)に教示される。

【0034】

[0073] 本明細書にて使用される「作動可能に連結される」は、少なくとも2つの

10

20

30

40

50

配列の機能性連結に対する言及を含む。作動可能に連結されたは、プロモーターと第2の配列の間の連結を含み、プロモーター配列は第2の配列に相当するDNA配列の転写を開始して介在する。

【0035】

[0074] 本明細書にて使用される「植物」は、植物又は植物の部分を意味し、限定ではないが、植物細胞、植物組織、例えば、葉、幹、根、花及び種子を含む。

【0036】

[0075] 本明細書にて使用される「ポリペプチド」は、蛋白質、蛋白質断片、修飾された蛋白質、アミノ酸配列及び合成アミノ酸配列を意味する。ポリペプチドはグリコシル化されているか又はされていない。

10

【0037】

[0076] 本明細書にて使用される「プロモーター」は、RNAポリメラーゼ及びその他の蛋白質の転写を開始するための認識及び結合に關与するDNAの領域に対する言及を含む。

【0038】

[0077] 用語「選択的にハイブリダイズする」は、ストリンジェント条件下で、非標的核酸配列へのそのハイブリダイゼーションよりも検出上高い程度での（例えば、バックグラウンドの少なくとも2倍）特定の核酸標的配列への核酸配列のハイブリダイゼーションに対する言及、及び非標的核酸の実質上の排除に対する言及を含む。選択的にハイブリダイズする配列は、典型的には、互いに、約少なくとも80%同一性、又は90%配列同一性を有し、100%配列同一性（即ち、完全相補）を含む。

20

【0039】

[0078] 用語「ストリンジェントな条件」又は「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、プローブがその標的配列に選択的にハイブリダイズする条件に対する言及を含む。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして別の状況下では異なることになる。ハイブリダイゼーションのストリンジェント及び/又は洗浄条件を制御することにより、プローブに対して100%相補な標的配列を同定することができる（相同プロービング）。或いは、配列中のいくつかのミスマッチングが低い程度の類似性を検出することを可能にするように、ストリンジェント条件を適合させることができる。一般に、プローブは約1000ヌクレオチドの長さより短く、任意には、500ヌクレオチドより短い長さである。

30

【0040】

[0079] 典型的には、ストリンジェント条件は塩濃度が約1.5M Naイオン未満、典型的には約0.01から1.0M Naイオン濃度（又は他の塩）であり、pH7.0から8.3の条件であり、温度は短いプローブに関しては少なくとも約30（例えば、10から50ヌクレオチド）であり、そして長いプローブに関しては少なくとも約60（例えば、50を超えるヌクレオチド）である。ストリンジェント条件は、不安定剤、例えばホルムアルデヒドの添加により達成してもよい。例示の低いストリンジェンシー条件は、30から35%のホルムアルデヒド、1M NaCl, 1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）のバッファー溶液による37におけるハイブリダイゼーション、及び1Xから2XのSSC（20X SSC = 3.0M NaCl / 0.3Mクエン酸3ナトリウム）による50から55における洗浄を含む。例示の中度のストリンジェンシー条件は、40から45%のホルムアルデヒド、1M NaCl, 1% SDS中の37におけるハイブリダイゼーション、及び0.5Xから1XのSSCによる55から60における洗浄を含む。例示の高ストリンジェンシー条件は、50%のホルムアルデヒド、1M NaCl, 1% SDS中の37におけるハイブリダイゼーション、及び0.1XのSSCによる65から65における洗浄を含む。

40

【0041】

[0080] 特異性は、典型的には、ハイブリダイゼーション後の洗浄の函数であり、必須の因子は最終洗浄溶液のイオン強度と温度である。DNA-RNAハイブリッドに關

50

しては、 T_m をMeinkoth and Wahl ((1984) Anal Biochem 138:267-284) の等式から近似することができる： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{フォーム}) - 500/L$ ；式中、Mは単価カチオンのモル濃度であり、%GCはDNA中のグアノシンとシトシンのヌクレオチドのパーセンテージであり、%形態はハイブリダイゼーション溶液中のホルムアルデヒドのパーセンテージであり、そしてLは塩基対中のハイブリッドの長さである。 T_m は、相補標的配列の50%が完全に適合したプローブにハイブリダイズする温度である（規定されたイオン強度とpH下で）。 T_m はミスマッチ1%ごとに約1℃低下する；即ち、 T_m 、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄条件は、所望の同一性の配列へハイブリダイズするように調節可能である。例えば、90%の同一性の配列を求めるなら、 T_m は10℃低下させることができる。一般に、ストリンジェント条件は、規定されたイオン強度とpHにおける特定の配列及びその相補体に関して、熱融点（ T_m ）よりも約5℃低く選択される。しかしながら、厳密な（severely）ストリンジェント条件は、熱融点（ T_m ）の1、2、3、又は4℃下でハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を利用することができる；中度のストリンジェント条件は、熱融点（ T_m ）の6、7、8、9、又は10℃下でハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を利用することができる；低いストリンジェント条件は、熱融点（ T_m ）の11、12、13、14、15、又は20℃下でハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を利用することができる。等式、ハイブリダイゼーション及び洗浄組成物、及び所望の T_m を用いることにより、当業者は、ハイブリダイゼーション及び/又は溶液中のストリンジェントの変化が本質的に記載されることを理解する。ミスマッチの所望の程度が45%（水溶液）よりも低いあるいは32%（ホルムアルデヒド溶液）よりも低い T_m をもたすなら、高い温度が使用できるようにSSC濃度を増加させることが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションに対する大規模なガイドは、Tijensen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, パート1、2章、「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」、エルセビア、ニューヨーク（1993）；及びCurrent Protocols in Molecular Biology, 2章、Ausubel et al., 編纂、グリーンパブリッシングアンドワイリーインターサイエンス、ニューヨーク（1995）に見いだされる。ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄の溶液は、少なくとも10、30、60、90、120、又は240分間適用可能である。

【0042】

【0081】 本明細書にて使用される「トランスジェニック」は、異種ポリヌクレオチドを含む植物又は細胞に対する言及を含む。一般に、異種ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが連続する世代に伝わるように、安定にゲノムに取り込まれる。トランスジェニックは、本明細書においては、あらゆる細胞、細胞系、カルス、組織、植物部分又は植物を含むように使用され、その遺伝子型は最初にそう変更されたトランスジェニック並びに有性交配又は初期トランスジェニックからの非性的増殖により創製されたものを含む、異種核酸の存在により変更された。本明細書にて使用される用語「トランスジェニック」は、慣用の植物育種法によるか又は天然に生じる事象、例えばランダムな受精、非組換えウイルス感染、非組換え細菌形質転換、非組換えトランスポジョン、又は自発変異による、ゲノム（染色体又は染色体外）の変更を含まない。

【0043】

【0082】 本明細書にて使用される「ベクター」は、発明のポリヌクレオチドの細胞への導入に使用される核酸に対する言及を含む。発現ベクターは、その中に挿入された核酸の転写を許容する。

【0044】

【0083】 ポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子の選択された領域に対して実質同一

か、実質相同か、又は実質相補性を有してよい。本明細書にて使用される「実質同一」及び「実質相同」は、互いに配列同一性又は相同性を有する配列を指す。一般に、実質同一又は実質相同な配列は、約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%配列同一性を有し、パーセント配列同一性は全配列に基づき、そしてデフォルトパラメーターを用いたGAPアライメントにより決定される(GCG, GAPバージョン10、アクセルリス、サンディエゴ、CA)。GAPは、Needleman and Wunsch((1970) J Mol Biol 48:443-453)の計算式を用いることにより、マッチの数を最大にして且つ配列ギャップの数を最小にする2つの全配列のアライメントを見いだす。100%同一性を有する配列が同一である。「実質相補」は、互いに相補の配列を意味し、そして互いに塩基対合することができる。相補配列を記載するに際しては、第1配列中の全てのヌクレオチドが第2配列と塩基対合するなら、これらの配列は完全相補性である。

10

【0045】

[0084] フォワードジェネティックアプローチを通して、アラビドプシスにおいて発生上の表現型を授与するマイクロRNAを同定した。このmiRNA、miR172a-2(Park et al. (2002) Curr Biol 12:1484-1495)は、過剰に発現されたときに、初期開花を引き起こし、そして花の器官の同一性を欠く。miR172a-2の予測された標的は、APETALA2-様転写因子の小さなサブファミリーである(Okamura et al. (1997) Oroc Acad Sci Natl USA 94:7076-7081)。miR172a-2の過剰発現は、このファミリーの少なくとも一つのメンバーをダウン制御する。さらに、AP2-様標的遺伝子の一つ、At2g28550の過剰発現は開花の遅延を引き起こす。この結果は、At2g28550及び他の標的遺伝子、At5g60120の機能損失の分析と関連して、miR172a-2により標的とされたAP2-様遺伝子の少なくともいくつかが開花抑制因子として正常に機能することを示す。MiR172-a2を過剰発現するEAT-D系は光周期に対して野生型の応答性を有する。miRNAをコードするゲノム領域も同定され(配列番号:1)、そして標的配列に対してその他のmiRNAsが挿入され得るカセットを生産するため(配列番号:3)、及び当該カセットをクローン化してmiRNAを発現させるのに有用な発現ベクター(配列番号:4)を生産するために使用された。当該発現ベクターは、miRNAをコードする1.4kb領域を含む。この領域の発現は、標的遺伝子の発現を抑圧するmiRNAを生産するために細胞内でプロセッシングされる。或いは、当該miRNAを合成により生産して細胞に直接に導入してよい。

20

30

【0046】

[0085] 一つの態様において、標的に実質相補なmiRNAをコードする核酸構築物を細胞に導入することを含む、標的配列の抑圧の方法が提供される。いくつかの態様において、当該miRNAは約10-200ヌクレオチド、約10-15、15-20、19、20、21、22、23、24、25、26、27、25-30、30-50、50-100、100-150、又は約150-200ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、当該核酸構築物はmiRNAをコードする。いくつかの態様において、当該核酸構築物は、二重鎖RNA又はmiRNAを含むヘアピン構造を形成するかもしれないポリヌクレオチド前駆体をコードする。いくつかの態様においては、配列番号:3のヌクレオチド39-59及び107-127を、それぞれ、miRNAのバックサイド及びmiRNA鋳型により置換する。いくつかの態様においては、この新規な配列が、配列番号:1の均等な領域を置き換える。さらなる態様においては、この新規な配列が、配列番号:44の均等な領域を置き換える。

40

【0047】

[0086] いくつかの態様においては、当該核酸構築物は修飾された内生の植物miRNA前駆体を含み、但し、標的配列に向けられたmiRNAを生産するようにデザインされた配列により、上記内生miRNAコード領域を置き換えるように、当該前駆体は修

50

飾される。いくつかの態様において、miRNA前駆体の鋳型はmiR172a miRNA前駆体である。いくつかの態様において、miR172a前駆体はアラビドプシスサリアナ、トマト、ダイズ、イネ又はトウモロコシ由来である。いくつかの態様において、miRNA前駆体は、配列番号：1、配列番号：3又は配列番号：44である。

【0048】

[0087] 別の態様において、上記方法は

【0049】

[0088] 細胞内で標的配列の発現を阻害する方法であって、

(a)細胞へ、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む核酸構築物を導入するが、但し、当該ポリヌクレオチドは、以下の順序で

(i)配列番号：3のヌクレオチド1-38の領域内の少なくとも約20から38までの連続するヌクレオチド、

(ii)10から約50の連続するヌクレオチドの第1オリゴヌクレオチドであって、第2オリゴヌクレオチドに対して実質相補な第1オリゴヌクレオチド、

(iii)配列番号：3のヌクレオチド60-106の領域内の少なくとも約20から47までの連続するヌクレオチド、

(iv)約10から約50の連続するヌクレオチドの第2オリゴヌクレオチドであって、miRNAをコードして、且つ、標的配列に対して実質相補である第2オリゴヌクレオチド、及び

(v)配列番号：3のヌクレオチド128-159の領域内の少なくとも約20から32までの連続するヌクレオチド；

を含み、但し、当該ポリヌクレオチドはヘアピンを形成することのできるRNA前駆体をコードし、そして

(b)miRNAを生産するのに十分な時間、上記核酸構築物を発現させるが、その際、miRNAが標的配列の発現を阻害することを含む方法を含む。

【0050】

[0089] 別の態様において、上記方法は、遺伝子の標的配列を選択し、そして標的配列に実質相補なmiRNAをコードするポリヌクレオチドを含む核酸構築物をデザインすることを含む。いくつかの態様において、標的配列は、遺伝子のあらゆる領域から選択される。いくつかの態様において、標的配列は、遺伝子のコーディング領域から選択される。いくつかの態様において、標的配列は、停止コドンから約50から約200ヌクレオチド上流の領域から選択され、停止コドンの約50-75、75-100、100-125、125-150、又は150-200ヌクレオチド上流の領域を含む。さらなる態様において、標的配列及び/又はmiRNAは、上記ポリヌクレオチド及びアラビドプシスサリアナ内のApetela2-様遺伝子のEAT抑圧のプロセスに基づく。いくつかの態様においては、配列番号：3のヌクレオチド39-59及び107-127を、miRNAの鋳型のバックサイド(第1オリゴヌクレオチド)及びmiRNA鋳型(第2オリゴヌクレオチド)によりそれぞれ置換する。いくつかの態様において、この新規な配列は、配列番号：1の均等な領域を置き換える。さらなる態様において、この新規な配列は、配列番号：44の均等な領域を置き換える。

【0051】

[0090] いくつかの態様において、miRNA鋳型(即ち、miRNAをコードするポリヌクレオチド)は、及びそれによりmiRNAが、標的配列に関していくつかのミスマッチを含んでよい。いくつかの態様において、miRNA鋳型は、標的配列に比較して1のヌクレオチドミスマッチを有し、例えば、miRNA_s鋳型は標的配列に比較して1、2、3、4、5、又はそれより多くのミスマッチを有し得る。この程度のミスマッチは、標的配列の相補体に対するmiRNA鋳型の同一性パーセントを決定することにより記載してもよい。例えば、miRNA鋳型は、標的配列の相補体に比較して、およそ少なくとも70%、75%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、

10

20

30

40

50

84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98%、99%、又は100%を含む同一性パーセントを有してよい。

【0052】

[0091] いくつかの態様において、miRNA鑄型（即ち、miRNAをコードするポリヌクレオチド）及びそれによりmiRNAは、miRNAバックサイドに関していくつかのミスマッチを含んでよい。いくつかの態様において、miRNA鑄型は、miRNAバックサイドに比較して1のヌクレオチドミスマッチを有し、例えば、miRNA s鑄型はmiRNAバックサイドに比較して1、2、3、4、5、又はそれより多くのミスマッチを有し得る。この程度のミスマッチは、miRNAバックサイドの相補体に対するmiRNA鑄型の同一性パーセントを決定することにより記載してもよい。例えば、miRNA鑄型は、miRNAバックサイドの相補体に比較して、およそ少なくとも70%、75%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98%、99%、又は100%を含む同一性パーセントを有してよい。

10

【0053】

[0092] いくつかの態様において、標的配列は、植物病原体から選択される。病原体の標的配列に対するmiRNAを含む植物又は細胞は、病原体に対して感度が低下するか及び/又は耐性が増加することが予測される。いくつかの態様において、miRNAは、作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む核酸構築物によりコードされる。いくつかの態様において、プロモーターは病原体誘導可能なプロモーターである。

20

【0054】

[0093] 別の態様において、上記方法は、配列番号：3のポリヌクレオチド内のmiRNAコード配列を標的遺伝子の標的領域に実質相補なmiRNAをコードする配列で置き換えることを含む。

【0055】

[0094] 別の態様において、標的配列の発現を細胞中で阻害する方法が提供されるが、

30

(a) 第1及び第2のオリゴヌクレオチドを含む修飾された植物miRNA前駆体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む核酸構築物を細胞に導入し、その際、第1又は第2オリゴヌクレオチドの少なくとも一方が前駆体に対して異種であり、第1オリゴヌクレオチドは第2オリゴヌクレオチドに実質相補であり、そして第2オリゴヌクレオチドは標的配列に実質相補なmiRNAをコードし、前駆体はヘアピンを形成でき；そして

(b) miRNAを生産するのに十分な時間、核酸構築物を発現させるが、その際、miRNAは標的配列の発現を阻害することを含む。

【0056】

[0095] 別の態様において、標的配列の発現を細胞中で阻害する方法が提供されるが、

40

(a) 第1及び第2のオリゴヌクレオチドを含む修飾された植物miR172 miRNA前駆体をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む核酸構築物を細胞に導入し、その際、第1又は第2オリゴヌクレオチドの少なくとも一方が前駆体に対して異種であり、第1オリゴヌクレオチドは第2オリゴヌクレオチドに実質相補であり、そして第2オリゴヌクレオチドは標的配列に実質相補なmiRNAをコードし、前駆体はヘアピンを形成でき；そして

(b) miRNAを生産するのに十分な時間、核酸構築物を発現させるが、その際、miRNAは標的配列の発現を阻害することを含む。

50

【0057】

【0096】 いくつかの態様において、修飾された植物miR172 miRNA前駆体は、修飾されたアラビドプシスmiR172 miRNA前駆体であるか、又は修飾されたトウモロコシmiR172 miRNA前駆体又は等などである。

【0058】

【0097】 別の態様において、標的配列を抑圧するための核酸構築物が提供される。当該核酸構築物は、標的に実質相補である。当該核酸構築物は、標的に実質相補なmiRNAをコードする。いくつかの態様において、当該核酸構築物は、さらに、miRNAをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。いくつかの態様においては、プロモーターを欠く核酸構築物をデザインして、宿主ゲノム中で組み込みに際してプロモーターに作動可能に連結されることになるように、導入される。いくつかの態様において、当該核酸構築物は、組換えを用いて組み込まれ、部位特異的組換えを含む。例えば、PCT国際公開出願番号WO99/25821は引用により本明細書に編入されるが、参照されたい。いくつかの態様において、上記核酸構築物はRNAである。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、部位特異的組換え部位を含む少なくとも一つの組換え部位を含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、構築物の組み込み、修飾、又はクローン化を促進させるために、少なくとも一つの組換え部位を含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、miRNA前駆体に隣接して2つの部位特異的組換え部位を含む。いくつかの態様において、部位特異的組換え部位は、FRT部位、lox部位、又はatt分析とを含み、attB, attL, attP又はattR部位を含む。例えば、PCT国際公開出願番号WO99/25821、及び米国特許5,888,732, 6,143,557, 6,171,861, 6,270,969, 及び6,277,608は引用により本明細書に編入されるが、参照されたい。

【0059】

【0098】 いくつかの態様において、上記核酸構築物は、修飾された異種植物miRNA前駆体を含み、前駆体はmiRNAコード領域を、標的配列に向けられたmiRNAを生産するようにデザインされた配列により置換するように修飾されている。いくつかの態様において、当該miRNA前駆体鑄型は、miR172a miRNA前駆体である。いくつかの態様において、miR172a前駆体は、双子葉又は单子葉由来である。いくつかの態様において、miR172a前駆体は、アラビドプシスサリアナ、トマト、ダイズ、イネ又はトウモロコシ由来である。いくつかの態様において、miRNA前駆体は、配列番号：1、配列番号：3、又は配列番号：44である。

【0060】

【0099】 別の態様において、当該核酸構築物は、修飾された植物miRNA前駆体をコードするポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチドを含み、修飾された前駆体は第1及び第2のオリゴヌクレオチドを含み、第1又は第2オリゴヌクレオチドの少なくとも一方は前駆体に相補性であり、第1オリゴヌクレオチドは第2オリゴヌクレオチドに対して実質相補であり、そして第2オリゴヌクレオチドは標的配列に実質相補なmiRNAを含み、前駆体はヘアピンを形成することができる。

【0061】

【0100】 別の態様において、上記核酸構築物は、修飾された植物miR172 miRNA前駆体をコードするポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチドを含み、修飾された前駆体は第1及び第2のオリゴヌクレオチドを含み、第1又は第2オリゴヌクレオチドの少なくとも一方は前駆体に相補性であり、第1オリゴヌクレオチドは第2オリゴヌクレオチドに対して実質相補であり、そして第2オリゴヌクレオチドは標的配列に実質相補なmiRNAを含み、前駆体はヘアピンを形成することができる。いくつかの態様において、修飾された植物miR172 miRNA前駆体は、修飾されたアラビドプシスmiR172 miRNA前駆体であるか、又は修飾されたトウモロコシmiR172 miRNA前駆体又は等などである。

【0062】

【 0 1 0 1 】 いくつかの態様において、m i R N A は、約 1 0 - 2 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 - 1 5、1 5 - 2 0、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 5 - 3 0、3 0 - 5 0、5 0 - 1 0 0、1 0 0 - 1 5 0、又は約 1 5 0 - 2 0 0 ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、当該核酸構築物は m i R N A をコードする。いくつかの態様において、当該核酸構築物は、二重鎖 R N A 又は m i R N A を含むヘアピン構造を形成するかもしれないポリヌクレオチド前駆体をコードする。いくつかの態様においては、配列番号：3 のヌクレオチド 3 9 - 5 9 及び 1 0 7 - 1 2 7 を、それぞれ、m i R N A のバックサイド及び m i R N A 鋳型により置換する。いくつかの態様においては、この新規な配列が、配列番号：1 の均等な領域を置き換える。さらなる態様においては、この新規な配列が、配列番号：4 4 の均等な領域を置き換える。いくつかの態様において、標的領域は、標的配列の何れかの領域から選択される。いくつかの態様において、標的領域は、非翻訳領域から選択される。いくつかの態様において、標的領域は、コーディング領域から選択される。いくつかの態様において、標的領域は、停止コドンから約 5 0 - 2 0 0 ヌクレオチド上流の領域から選択され、約 5 0 - 7 5、7 5 - 1 0 0、1 0 0 - 1 2 5、1 2 5 - 1 5 0、又は 1 5 0 - 2 0 0 ヌクレオチド上流の領域を含む。さらなる態様において、標的領域及び / 又は m i R N A は、上記ポリヌクレオチド及びアラビドプシスサリアナ内の A p e t e l a 2 - 様配列の E A T 抑圧のプロセスに基づく。

10

【 0 0 6 3 】

【 0 1 0 2 】 別の態様において、上記核酸構築物は、以下の順序で、以下を含む、配列番号：3 のヌクレオチド 1 - 3 8 の領域内の少なくとも 2 0 から 3 8 までの連続するヌクレオチド、約 1 0 から約 5 0 の連続するヌクレオチドの第 1 オリゴヌクレオチドであって、第 1 オリゴヌクレオチドは第 2 オリゴヌクレオチドに対して実質相補であって、配列番号：3 のヌクレオチド 6 0 - 1 0 6 の領域内の少なくとも約 2 0 から 4 7 までの連続するヌクレオチド、約 1 0 から約 5 0 の連続するヌクレオチドの第 2 オリゴヌクレオチドであって、第 2 オリゴヌクレオチドは m i R N A をコードして、且つ、第 2 オリゴヌクレオチドは標的配列に対して実質相補である、及び配列番号：3 のヌクレオチド 1 2 8 - 1 5 9 の領域内の少なくとも約 2 0 から 3 2 までの連続するヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドはヘアピンを形成することのできる R N A 前駆体をコードする。

20

【 0 0 6 4 】

【 0 1 0 3 】 いくつかの態様において、導入されたポリヌクレオチドを含む、及び / 又は発明の方法により生産された、細胞、植物及び種子が提供される。当該細胞は、原核細胞及び真核細胞を含み、限定ではないが、細菌、酵母、真菌、ウイルス、無脊椎動物、脊椎動物、及び植物の細胞を含む。発明の植物、植物細胞、及び種子は、裸子植物 (g y n o s p e r m s)、単子葉及び双子葉を含み、限定ではないが、例えば、イネ、コムギ、エンバク、オオムギ、キビ、モロコシ属、ダイズ、ヒマワリ、ベニバナ、カノーラ、アルファルファ、ワタ、アラビドプシス、及びタバコを含む。

30

【 0 0 6 5 】

【 0 1 0 4 】 いくつかの態様において、上記細胞、植物及び / 又は種子は、修飾された植物 m i R N A 前駆体を含む核酸構築物を含み、当該前駆体は、標的配列に対して向けられた m i R N A を生産するようにデザインされた配列により、内生 m i R N A コーディング領域を置き換えるように修飾されている。いくつかの態様において、m i R N A 前駆体鋳型は、m i R 1 7 2 a m i R N A 前駆体である。いくつかの態様において、m i R 1 7 2 a 前駆体は双子葉又は単子葉由来である。いくつかの態様において、m i R 1 7 2 a 前駆体はアラビドプシスサリアナ、トマト、ダイズ、イネ又はトウモロコシ由来である。いくつかの態様において、m i R N A 前駆体は、配列番号：1、配列番号：3、又は配列番号：4 4 である。いくつかの態様において、m i R N A 前駆体は、配列番号：1、配列番号：3、又は配列番号：4 4 によりコードされる。いくつかの態様において、当該核酸構築物は、部位特異的組換え部位を含む少なくとも一つの組換え部位を含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、構築物の修飾又はクローン化を促進させるために、少なくとも一つの組換え部位を含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、m i R

40

50

N A 前駆体に隣接して 2 つの部位特異的組換え部位を含む。いくつかの態様において、部位特異的組換え部位は、F R T 部位、l o x 部位、又は a t t 分析とを含み、a t t B , a t t L , a t t P 又は a t t R 部位を含む。例えば、P C T 国際公開出願番号 W O 9 9 / 2 5 8 2 1、及び米国特許 5 , 8 8 8 , 7 3 2 , 6 , 1 4 3 , 5 5 7 , 6 , 1 7 1 , 8 6 1 , 6 , 2 7 0 , 9 6 9 , 及び 6 , 2 7 7 , 6 0 8 は引用により本明細書に編入されるが、参照されたい。

【 0 0 6 6 】

[0 1 0 5] さらなる態様において、標的 R N A をダウン制御する方法が提供され、標的 R N A の領域に相補な m i R N A をコードする核酸構築物を細胞に導入することを含む。いくつかの態様において、当該 m i R N A は標的 R N A の領域に対して完全相補である。いくつかの態様において、m i R N A は、相補であって、G - U 塩基対、即ち G U の揺らぎの使用を含み、他の点では完全相補である。いくつかの態様において、m i R N A の最初の 1 0 ヌクレオチド (m i R N A の 5 ' エンドから数えて) は標的 R N A の領域に対して完全相補であり、そして残りのヌクレオチドは標的 R N A とのミスマッチ及び / 又はバルジを含んでよい。いくつかの態様において、m i R N A は、約 1 0 - 2 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 - 1 5、1 5 - 2 0、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 5 - 3 0、3 0 - 5 0、5 0 - 1 0 0、1 0 0 - 1 5 0、又は約 1 5 0 - 2 0 0 ヌクレオチドを含む。標的 R N A 中の相補配列への m i R N A の結合は、標的 R N A の分割をもたらす。いくつかの態様において、m i R N A は m i R N A が標的 R N A の標的配列に対して完全相補であるように修飾されている m i R N A である。いくつかの態様において、m i R N A は m i R N A が標的 R N A の標的配列に完全相補であるように修飾されている内生植物 m i R N A である。いくつかの態様において、m i R N A をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターへ作動可能に連結される。いくつかの態様において、上記核酸構築物は m i R N A に作動可能に連結されたプロモーターを含む。

10

20

【 0 0 6 7 】

[0 1 0 6] いくつかの態様において、上記核酸構築物は m i R N A をコードする。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、m i R N A に作動可能に連結されたプロモーターを含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、m i R N A を含む二重鎖 R N A 又はヘアピン構造を形成するかもしれないポリヌクレオチドをコードする。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、m i R N A を含む二重鎖 R N A 又はヘアピン構造を形成するかもしれないポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、m i R N A が標的 R N A の標的配列に完全相補であるように修飾されている内生植物 m i R N A 前駆体を含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、m i R N A 前駆体に対して作動可能に連結されたプロモーターを含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、約 5 0 ヌクレオチドから約 3 0 0 0 ヌクレオチド、約 5 0 - 1 0 0、1 0 0 - 1 5 0、1 5 0 - 2 0 0、2 0 0 - 2 5 0、2 5 0 - 3 0 0、3 0 0 - 3 5 0、3 5 0 - 4 0 0、4 0 0 - 4 5 0、4 5 0 - 5 0 0、5 0 0 - 6 0 0、6 0 0 - 7 0 0、7 0 0 - 8 0 0、8 0 0 - 9 0 0、9 0 0 - 1 0 0 0、1 0 0 0 - 1 1 0 0、1 1 0 0 - 1 2 0 0、1 2 0 0 - 1 3 0 0、1 3 0 0 - 1 4 0 0、1 4 0 0 - 1 5 0 0、1 5 0 0 - 1 6 0 0、1 6 0 0 - 1 7 0 0、1 7 0 0 - 1 8 0 0、1 8 0 0 - 1 9 0 0、1 9 0 0 - 2 0 0 0、2 0 0 0 - 2 1 0 0、2 1 0 0 - 2 2 0 0、2 2 0 0 - 2 3 0 0、2 3 0 0 - 2 4 0 0、2 4 0 0 - 2 5 0 0、2 5 0 0 - 2 6 0 0、2 6 0 0 - 2 7 0 0、2 7 0 0 - 2 8 0 0、2 8 0 0 - 2 9 0 0 又は 2 9 0 0 - 3 0 0 0 ヌクレオチドを含む。

30

40

【 0 0 6 8 】

[0 1 0 7] いくつかの態様において、宿主ゲノム中への組み込みに際してプロモーターに作動可能に連結されるようになる、プロモーターを欠く核酸構築物がデザインされて、導入される。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、部位特異的組換えを含む組換えを用いて組み込まれる。いくつかの態様において、核酸構築物は R N A である。いくつかの態様において、核酸構築物は部位特異的組換え部位を含む少なくとも一つの組換え

50

部位を含む。いくつかの態様において、核酸構築物は、構築物の組み込み、修飾又はクローン化を促進するために少なくとも一つの組換え部位を含む。いくつかの態様において、核酸構築物は、miRNA前駆体に隣接して2つの部位特異的組換え部位を含む。

【0069】

[0108] 別の態様において、上記方法は、標的RNAの領域に相補なmiRNAをコードする核酸構築物を細胞に導入し、そしてmiRNAを生産するのに十分な時間、当該核酸構築物を発現させることを含むが、その際、miRNAが標的RNAをダウン制御する。いくつかの態様において、miRNAは標的RNAの領域に完全相補である。いくつかの態様において、miRNAは、相補であって、G-U塩基対、即ちGUの揺らぎの使用を含み、他の点では完全相補である。

10

【0070】

[0109] 別の態様において、上記方法は、標的RNAを選択し、miRNAを選択し、標的RNAの配列（又はそのDNA）をmiRNAの配列と比較し、そしてヌクレオチド配列がmiRNAのヌクレオチド配列と類似であるような標的RNA（又はそのDNA）の領域を同定し、それが標的RNAの同定された領域のヌクレオチド配列に相補であるようにmiRNAのヌクレオチド配列を修飾し、そして修飾されたmiRNAを含む核酸構築物を調製することを含む。いくつかの態様において、上記miRNAは標的RNAの同定された領域に完全相補である。いくつかの態様において、上記miRNAは、相補であって、G-U塩基対、即ちGUの揺らぎの使用を含み、他の点では完全相補である。いくつかの態様において、核酸構築物は、miRNAを含む二重鎖RNA又はヘアピン構造を形成するかもしれないポリヌクレオチドをコードする。いくつかの態様において、核酸構築物は、miRNA前駆体、即ち、この態様に従い修飾されていたpre-miRNAを含む。

20

【0071】

[0110] 別の態様において、上記方法は、標的RNAを選択し、標的RNA内でヌクレオチド配列とを選択し、miRNAを選択し、それが標的RNAの同定された領域のヌクレオチド配列に相補であるようにmiRNAのヌクレオチド配列を修飾し、そして修飾されたmiRNAを含む核酸構築物を調製することを含む。いくつかの態様において、上記miRNAは標的RNAの同定された領域に完全相補である。いくつかの態様において、上記miRNAは、相補であって、G-U塩基対、即ちGUの揺らぎの使用を含み、他の点では完全相補である。いくつかの態様において、核酸構築物は、miRNAを含む二重鎖RNA又はヘアピン構造を形成するかもしれないポリヌクレオチドをコードする。いくつかの態様において、核酸構築物は、miRNA前駆体、即ち、この態様に従い修飾されていたpre-miRNAを含む。

30

【0072】

[0111] いくつかの態様において、miRNAはマイクロRNA登録に開示されたmiRNAであり、今は、miRBase Sequence Databaseとしても知られる（Griffiths-Jones（2004）Nucleic Acids Res 32, Database issue: D109-D11; <http://microrna.sanger.ac.uk/>）。いくつかの態様において、miRNAは、ath-MIR156a, ath-MIR156b, ath-MIR156c, ath-MIR156d, ath-MIR156e, ath-MIR156f, ath-MIR156g, ath-MIR156h, ath-MIR157a, ath-MIR157b, ath-MIR157c, ath-MIR157d, ath-MIR158a, ath-MIR158b, ath-MIR159a, ath-MIR159b, ath-MIR159c, ath-MIR160a, ath-MIR160b, ath-MIR160c, ath-MIR161, ath-MIR162a, ath-MIR162b, ath-MIR163, ath-MIR164a, ath-MIR164b, ath-MIR164c, ath-MIR165a, ath-MIR165b, ath-MIR166a, ath-MIR166b, ath-MIR166c, ath-MIR166d, ath-MIR

40

50

50

, o s a - M I R 1 7 2 c , o s a - M I R 1 7 3 d , o s a - M I R 3 9 0 , o s a - M I R 3 1 9 a , o s a - M I R 3 1 9 b , o s a - M I R 3 9 3 , o s a - M I R 3 9 3 b , o s a - M I R 3 9 4 , o s a - M I R 3 9 5 b , o s a - M I R 3 9 5 c , o s a - M I R 3 9 5 d , o s a - M I R 3 9 5 e , o s a - M I R 3 9 5 g , o s a - M I R 3 9 5 h , o s a - M I R 3 9 5 i , o s a - M I R 3 9 5 j , o s a - M I R 3 9 5 k , o s a - M I R 3 9 5 l , o s a - M I R 3 9 5 m , o s a - M I R 3 9 5 n , o s a - M I R 3 9 5 o , o s a - M I R 3 9 5 r , o s a - M I R 3 9 5 q , o s a - M I R 3 9 5 c , o s a - M I R 3 9 5 a , o s a - M I R 3 9 5 f , o s a - M I R 3 9 5 p , o s a - M I R 3 9 6 a , o s a - M I R 3 9 6 b , o s a - M I R 3 9 6 c , o s a - M I R 3 9 7 a , o s a - M I R 3 9 7 b , o s a - M I R 3 9 8 a , o s a - M I R 3 9 8 b , o s a - M I R 3 9 9 a , o s a - M I R 3 9 9 b , o s a - M I R 3 9 9 c , o s a - M I R 3 9 9 d , o s a - M I R 3 9 9 e , o s a - M I R 3 9 9 f , o s a - M I R 3 9 9 g , o s a - M I R 3 9 9 h , o s a - M I R 3 9 9 i , o s a - M I R 3 9 9 j , o s a - M I R 3 9 9 k , o s a - M I R 4 0 8 , o s a - M I R 4 1 3 , o s a - M I R 4 1 4 , o s a - M I R 4 1 5 , o s a - M I R 4 1 6 , o s a - M I R 4 1 7 , o s a - M I R 4 1 8 , o s a - M I R 4 1 9 , o s a - M I R 4 2 6 , o s a - M I R 4 3 7 , o s a - M I R 4 3 9 , o s a - M I R 4 3 9 c , o s a - M I R 4 3 9 d , o s a - M I R 4 3 8 e , o s a - M I R 4 3 9 f , o s a - M I R 4 3 9 g , o s a - M I R 4 3 9 h , o s a - M I R 4 4 0 , o s a - M I R 4 4 1 a , o s a - M I R 4 4 1 c , o s a - M I R 4 4 2 , o s a - M I R 4 4 3 , o s a - M I R 4 4 5 d , o s a - M I R 4 4 6 , z m a - M I R 1 5 6 a , z m a - M I R 1 5 6 b , z m a - M I R 1 5 6 c , z m a - M I R 1 5 6 d , z m a - M I R 1 5 6 e , z m a - M I R 1 5 6 f , z m a - M I R 1 5 6 g , z m a - M I R 1 5 6 h , z m a - M I R 1 5 6 i , z m a - M I R 1 5 6 j , z m a - M I R 1 5 6 k , z m a - M I R 1 5 9 a , z m a - M I R 1 5 9 b , z m a - M I R 1 5 9 c , z m a - M I R 1 5 9 d , z m a - M I R 1 6 0 a , z m a - M I R 1 6 0 b , z m a - M I R 1 6 0 c , z m a - M I R 1 6 0 d , z m a - M I R 1 6 0 e , z m a - M I R 1 6 0 f , z m a - M I R 1 6 1 l , z m a - M I R 1 6 2 , z m a - M I R 1 6 4 a , z m a - M I R 1 6 4 b , z m a - M I R 1 6 4 c , z m a - M I R 1 6 4 d , z m a - M I R 1 6 6 a , z m a - M I R 1 6 6 b , z m a - M I R 1 6 6 c , z m a - M I R 1 6 6 d , z m a - M I R 1 6 6 e , z m a - M I R 1 6 6 e , z m a - M I R 1 6 6 f , z m a - M I R 1 6 6 g , z m a - M I R 1 6 6 h , z m a - M I R 1 6 6 i , z m a - M I R 1 6 6 j , z m a - M I R 1 6 6 k , z m a - M I R 1 6 6 m , z m a - M I R 1 6 7 a , z m a - M I R 1 6 7 b , z m a - M I R 1 6 7 c , z m a - M I R 1 6 7 d , z m a - M I R 1 6 7 e , z m a - M I R 1 6 7 f , z m a - M I R 1 6 7 g , z m a - M I R 1 6 7 h , z m a - M I R 1 6 8 a , z m a - M I R 1 6 8 b , z m a - M I R 1 6 9 a , z m a - M I R 1 6 9 b , z m a - M I R 1 6 9 c , z m a - M I R 1 6 9 d , z m a - M I R 1 6 9 e , z m a - M I R 1 6 9 f , z m a - M I R 1 6 9 g , z m a - M I R 1 6 9 i , z m a - M I R 1 6 9 j , z m a - M I R 1 6 9 k , z m a - M I R 1 7 1 a , z m a - M I R 1 7 1 b , z m a - M I R 1 7 1 c , z m a - M I R 1 7 1 d , z m a - M I R 1 7 1 e , z m a - M I R 1 7 1 f , z m a - M I R 1 7 1 g , z m a - M I R 1 7 1 h , z m a - M I R 1 7 1 i , z m a - M I R 1 7 1 j , z m a - M I R 1 7 1 k , z m a - M I R 1 7 2 a , z m a - M I R 1 7 2 b , z m a - M I R 1 7 2 c 又は z m a - M I R 1 7 2 d , z m a - M I R 1 7 2 e , z m a - M I R 3 1 9 a , z m a - M I R 3 1 9 b , z m a - M I R 3 1 9 d , z m a - M I R 3 9 3 , z m a - M I R 3 9 4 a , z m a - M I R 3 9 4 b , z m a - M I R 3 9 5 a , z m a - M I R 3 9 5 b , z m a - M I R 3 9 5 c , z m a - M I R 3 9 5 d , z m a - M I R 3 9 6 a , z m a - M I R 3 9 6 b , z m a - M I R 3 9 9 a , z m a - M I R 3 9 9 b , z m a - M I R 3 9 9 c , z m a - M I R 3 9 9 d , z m a - M I R 3 9 9 e , z m a - M I R 3 9 9 f , z m a - M I R 4 0 8 である。

【 0 0 7 3 】

[0 1 1 2] いくつかの態様において、m i R N A はジェンバンク (U S A) 、 E M B L (欧州) 又は D D B J (日本) において開示された m i R N A である。いくつかの態様において、m i R N A は以下のジェンバンク受け入れ番号の一つから選択される： A J 5 0 5 0 0 3 , A J 5 0 5 0 0 2 , A J 5 0 5 0 0 1 , A J 4 9 6 8 0 5 , A J 4 9 6 8 0 4 , A J 4 9 6 8 0 3 , A J 4 9 6 8 0 2 , A J 4 9 6 8 0 1 , A J 5 0 5 0 0 4 , A J 4 9 3 6 5 6 , A J 4 9 3 6 5 5 , A J 4 9 3 6 5 4 , A J 4 9 3 6 5 3 , A J 4 9 3 6 5 2 , A J 4 9 3 6 5 1 , A J 4 9 3 6 5 0 , A J 4 9 3 6 4 9 , A J 4 9 3 6 4 8 , A J 4 9 3 6 4 7 , A J 4 9 3 6 4 6 , A J 4 9 3 6 4 5 , A J 4 9 3 6 4 4 , A J 4 9 3 6 4 3 , A J 4 9 3 6 4 2 , A J 4 9 3 6 4 1 , A J 4 9 3 6 4 0 , A J 4 9 3 6 3 9 , A J 4 9 3 6 3 8 , A J 4 9 3 6 3 7 , A J 4 9 3 6 3 6 , A J 4 9 3 6 3 5 , A J 4 9 3 6 3 4 , A J 4 9 3 6 3 3 , A J 4 9 3 6 3 2 , A J 4 9 3 6 3 1 , A J 4 9 3 6 3 0 , A J 4 9 3 6 2 9 , A J 4 9 3 6 2 8 , A J 4 9 3 6 2 7 , A J 4 9 3 6 2 6 , A J 4 9 3 6 2 5 , A J 4 9 3 6 2 4 , A J 4 9 3 6 2 3 , A J 4 9 3 6 2 2 , A J 4 9 3 6 2 1 , A J 4 9 3 6 2 0 , A Y 6 1 5 3 7 4 , A Y 6 1 5 3 7 3 , A Y 7 3 0 7 0 4 , A Y 7 3 0 7 0 3 , A Y 7 3 0 7 0 2 , A Y 7 3 0 7 0 1 , A Y 7 3 0 7 0 0 , A Y 7 3 0 6 9 9 , A Y 7 3 0 6 9 8 , A Y 5 9 9 4 2 0 , A Y 5 5 1 2 5 9 , A Y 5 5 1 2 5 8 , A Y 5 5 1 2 5 7 , A Y 5 5 1 2 5 6 , A Y 5 5 1 2 5 5 , A Y 5 5 1 2 5 4 , A Y 5 5 1 2 5 3 , A Y 5 5 1 2 5 2 , A Y 5 5 1 2 5 1 , A Y 5 5 1 2 5 0 , A Y 5 5 1 2 4 9 , A Y 5 5 1 2 4 8 , A Y 5 5 1 2 4 7 , A Y 5 5 1 2 4 6 , A Y 5 5 1 2 4 5 , A Y 5 5 1 2 4 4 , A Y 5 5 1 2 4 3 , A Y 5 5 1 2 4 2 , A Y 5 5 1 2 4 1 , A Y 5 5 1 2 4 0 , A Y 5 5 1 2 3 9 , A Y 5 5 1 2 3 8 , A Y 5 5 1 2 3 7 , A Y 5 5 1 2 3 6 , A Y 5 5 1 2 3 5 , A Y 5 5 1 2 3 4 , A Y 5 5 1 2 3 3 , A Y 5 5 1 2 3 2 , A Y 5 5 1 2 3 1 , A Y 5 5 1 2 3 0 , A Y 5 5 1 2 2 9 , A Y 5 5 1 2 2 8 , A Y 5 5 1 2 2 7 , A Y 5 5 1 2 2 6 , A Y 5 5 1 2 2 5 , A Y 5 5 1 2 2 4 , A Y 5 5 1 2 2 3 , A Y 5 5 1 2 2 2 , A Y 5 5 1 2 2 1 , A Y 5 5 1 2 2 0 , A Y 5 5 1 2 1 9 , A Y 5 5 1 2 1 8 , A Y 5 5 1 2 1 7 , A Y 5 5 1 2 1 6 , A Y 5 5 1 2 1 5 , A Y 5 5 1 2 1 4 , A Y 5 5 1 2 1 3 , A Y 5 5 1 2 1 2 , A Y 5 5 1 2 1 1 , A Y 5 5 1 2 1 0 , A Y 5 5 1 2 0 9 , A Y 5 5 1 2 0 8 , A Y 5 5 1 2 0 7 , A Y 5 5 1 2 0 6 , A Y 5 5 1 2 0 5 , A Y 5 5 1 2 0 4 , A Y 5 5 1 2 0 3 , A Y 5 5 1 2 0 2 , A Y 5 5 1 2 0 1 , A Y 5 5 1 2 0 0 , A Y 5 5 1 1 9 9 , A Y 5 5 1 1 9 8 , A Y 5 5 1 1 9 7 , A Y 5 5 1 1 9 6 , A Y 5 5 1 1 9 5 , A Y 5 5 1 1 9 4 , A Y 5 5 1 1 9 3 , A Y 5 5 1 1 9 2 , A Y 5 5 1 1 9 1 , A Y 5 5 1 1 9 0 , A Y 5 5 1 1 8 9 , A Y 5 5 1 1 8 8 , A Y 5 0 1 4 3 4 , A Y 5 0 1 4 3 3 , A Y 5 0 1 4 3 2 , A Y 5 0 1 4 3 1 , A Y 4 9 8 8 5 9 , A Y 3 7 6 4 5 9 , A Y 3 7 6 4 5 8 , A Y 8 8 4 2 3 3 , A Y 8 8 4 2 3 2 , A Y 8 8 4 2 3 1 , A Y 8 8 4 2 3 0 , A Y 8 8 4 2 2 9 , A Y 8 8 4 2 2 8 , A Y 8 8 4 2 2 7 , A Y 8 8 4 2 2 6 , A Y 8 8 4 2 2 5 , A Y 8 8 4 2 2 4 , A Y 8 8 4 2 2 3 , A Y 8 8 4 2 2 2 , A Y 8 8 4 2 2 1 , A Y 8 8 4 2 2 0 , A Y 8 8 4 2 1 9 , A Y 8 8 4 2 1 8 , A Y 8 8 4 2 1 7 , A Y 8 8 4 2 1 6 , A Y 7 2 8 4 7 5 , A Y 7 2 8 4 7 4 , A Y 7 2 8 4 7 3 , A Y 7 2 8 4 7 2 , A Y 7 2 8 4 7 1 , A Y 7 2 8 4 7 0 , A Y 7 2 8 4 6 9 , A Y 7 2 8 4 6 8 , A Y 7 2 8 4 6 7 , A Y 7 2 8 4 6 6 , A Y 7 2 8 4 6 5 , A Y 7 2 8 4 6 4 , A Y 7 2 8 4 6 3 , A Y 7 2 8 4 6 2 , A Y 7 2 8 4 6 1 , A Y 7 2 8 4 6 0 , A Y 7 2 8 4 5 9 , A Y 7 2 8 4 5 8 , A Y 7 2 8 4 5 7 , A Y 7 2 8 4 5 6 , A Y 7 2 8 4 5 5 , A Y 7 2 8 4 5 4 , A Y 7 2 8 4 5 3 , A Y 7 2 8 4 5 2 , A Y 7 2 8 4 5 1 , A Y 7 2 8 4 5 0 , A Y 7 2 8 4 4 9 , A Y 7 2 8 4 4 8 , A Y 7 2 8 4 4 7 , A Y 7 2 8 4 4 6 , A Y 7 2 8 4 4 5 , A Y 7 2 8 4 4 4 , A Y 7 2 8 4 4 3 , A Y 7 2 8 4 4 2 , A Y 7 2 8 4 4 1 , A Y 7 2 8 4 4 0 , A Y 7 2 8 4 3 9 , A Y 7 2 8 4 3 8 , A Y 7 2 8 4 3 7 , A Y 7 2 8 4 3 6 , A Y 7 2 8 4 3 5 , A Y 7 2 8 4 3 4 , A Y 7 2 8 4 3 3 , A Y 7 2 8 4 3 2 , A Y 7 2 8 4 3 1 , A Y 7 2 8 4 3 0 , A Y 7 2 8 4 2 9 , A Y 7 2 8 4 2 8 , A Y 7 2 8 4 2 7 , A Y 7 2 8 4 2 6 , A Y 7 2 8 4 2 5 , A Y 7 2 8 4 2 4 , A Y 7 2 8 4 2 3 , A Y 7 2 8 4 2 2 , A Y 7 2 8 4 2 1 , A Y 7 2 8 4 2 0 , A Y

7 2 8 4 1 9 , A Y 7 2 8 4 1 8 , A Y 7 2 8 4 1 7 , A Y 7 2 8 4 1 6 , A Y 7 2 8 4 1 5 , A Y 7 2 8 4 1 4 , A Y 7 2 8 4 1 3 , A Y 7 2 8 4 1 2 , A Y 7 2 8 4 1 1 , A Y 7 2 8 4 1 0 , A Y 7 2 8 4 0 9 , A Y 7 2 8 4 0 8 , A Y 7 2 8 4 0 7 , A Y 7 2 8 4 0 6 , A Y 7 2 8 4 0 5 , A Y 7 2 8 4 0 4 , A Y 7 2 8 4 0 3 , A Y 7 2 8 4 0 2 , A Y 7 2 8 4 0 1 , A Y 7 2 8 4 0 0 , A Y 7 2 8 3 9 9 , A Y 7 2 8 3 9 8 , A Y 7 2 8 3 9 7 , A Y 7 2 8 3 9 6 , A Y 7 2 8 3 9 5 , A Y 7 2 8 3 9 4 , A Y 7 2 8 3 9 3 , A Y 7 2 8 3 9 2 , A Y 7 2 8 3 9 1 , A Y 7 2 8 3 9 0 , A Y 7 2 8 3 8 9 , A Y 7 2 8 3 8 8 , A Y 8 5 1 1 4 9 , A Y 8 5 1 1 4 8 , A Y 8 5 1 1 4 7 , A Y 8 5 1 1 4 6 , A Y 8 5 1 1 4 5 , A Y 8 5 1 1 4 4 又は A Y 5 9 9 4 2 0 。

【 0 0 7 4 】

10

[0 1 1 3] いくつかの態様において、m i R N A は本明細書に引用により編入される米国公表特許出願番号 2 0 0 5 / 0 1 4 4 6 6 9 に開示された配列の一つから選択される。

【 0 0 7 5 】

[0 1 1 4] いくつかの態様において、上記の m i R N A s 、並びに本明細書に開示されたものは、本明細書に記載されたように特定の標的に向けられるように修飾された。

【 0 0 7 6 】

[0 1 1 5] いくつかの態様において、標的 R N A は、植物病原体、例えば植物ウイルス又は植物ウイロイドの R N A である。いくつかの態様において、植物病原体に向けられた m i R N A は、病原体誘導可能性プロモーターへ作動可能なように連結される。いくつかの態様において、標的 R N A は m R N A である。m R N A 中の標的配列は、非コーディング配列（例えば、イントロン配列、5' 非翻訳領域及び 3' 非翻訳領域）、コーディング配列又は m R N A スプライシングに關与する配列であってよい。m i R N A をイントロン配列に標的化することは m R N A の成熟化を危険にさらす。m i R N A を m R N A スプライシング關与配列に標的化することは、異なる蛋白質アイソフォームを提供する別のスプライス形態の成熟に影響する。

20

【 0 0 7 7 】

[0 1 1 6] いくつかの態様において、発明のポリヌクレオチドを含み、及び / 又は発明の方法により生産される、細胞、植物、及び種子が提供される。いくつかの態様において、当該細胞、植物、及び / 又は種子は、修飾された植物 m i R N A 前駆体を含む核酸構築物を含み、本明細書において上で記載されたとおりである。いくつかの態様において、核酸構築物中の修飾された植物 m i R N A 前駆体は、プロモーターに対して作動可能なように連結される。プロモーターはあらゆる公知のプロモーターであってよく、構成的プロモーター、誘導可能なプロモーター、脱抑制可能なプロモーター、等、例えば以下に記載されるものを含む。細胞は、原核細胞及び真核細胞を含み、限定ではないが、細菌、酵母、真菌、ウイルス、無脊椎動物、石油移動物、及び植物の細胞を含む。発明の植物、植物細胞、及び種子は、裸子植物 (g y n o s p e r m s) 、単子葉及び双子葉を含み、限定ではないが、イネ、コムギ、エンバク、オオムギ、キビ、モロコシ属、ダイズ、ヒマワリ、ペニバナ、カノーラ、アルファルファ、ワタ、アラビドプシス、及びタバコを含む。

30

【 0 0 7 8 】

40

[0 1 1 7] 別の態様において、複数の m i R N A s 構築物をコードする核酸構築物を細胞に導入することを含む、複数の標的 R N A をダウン制御する方法が提供される。複数の m i R N A s のうちの一つの m i R N A は、標的 R N A の一つの領域に相補である。いくつかの態様において、m i R N A は標的 R N A の領域に対して完全相補である。いくつかの態様において、相補であって、G - U 塩基対、即ち G U の揺らぎの使用を含み、他の点では完全相補である。いくつかの態様において、m i R N A の最初の 1 0 ヌクレオチド (m i R N A の 5' エンドから数えて) は標的 R N A の領域に対して完全相補であり、そして残りのヌクレオチドは標的 R N A とのミスマッチ及び / 又はバルジを含んでよい。いくつかの態様において、m i R N A は、約 1 0 - 2 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 - 1 5 、 1 5 - 2 0 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 5 - 3 0 、 3 0

50

- 50、50 - 100、100 - 150、又は約150 - 200ヌクレオチドを含む。標的RNA中のその相補配列へのmiRNAの結合は、標的RNAの分割をもたらす。いくつかの態様において、miRNAはmiRNAが標的RNAの標的配列に対して完全相補であるように修飾されているmiRNAである。いくつかの態様において、miRNAはmiRNAが標的RNAの標的配列に完全相補であるように修飾されている内生植物miRNAである。いくつかの態様において、miRNAは、プロモーターへ作動可能に連結される。いくつかの態様において、複数のmiRNAsが互いに連結されることにより、発現された際に単一の転写物を形成する。いくつかの態様において、核酸構築物は、miRNAに作動可能に連結されたプロモーターを含む。

【0079】

[0118] いくつかの態様において、核酸構築物は、複数の標的配列を抑圧するためのmiRNAsをコードする。核酸構築物は、少なくとも2つのmiRNAをコードする。いくつかの態様において、各miRNAは標的に対して実質上相補であるか又は本明細書において記載されたとおり相補になるように修飾される。いくつかの態様において、核酸構築物は2 - 30又はそれより多くのmiRNAs、例えば、3 - 40又はそれより多くのmiRNAs、例えば、3 - 45又はそれより多くのmiRNAs、及びさらに例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又はそれより多くのmiRNAsをコードする。いくつかの態様において、複数のmiRNAsは互いに連結されることにより、発現された際に単一の転写物を形成する。

【0080】

[0119] いくつかの態様において、一つより多いmiRNA前駆体ユニットからなる人工のmiRNA前駆体である重合体pre-miRNAsが提供される。重合体pre-miRNAsは、異なるmiRNA前駆体を伴うヘテロ重合体であるか又は同じmiRNA前駆体のいくつかのサブユニットを含むホモ重合体の何れかであり得る。実施例は、ヘテロ重合体のpre-miRNAsが異なる成熟した人工miRNAsを生産できることを証明する。例えば、pre-miR-PDS1^{169g}-CPC3^{159a}は、pre-miR-CPC3^{159a}とpre-miR-PDS1^{169g}からなるダイマーであるが、植物細胞中で発現させたときに、成熟miR-PDS1^{169g}とmiR-CPC3^{159a}を生産することができる。実施例は、ホモ重合体miRNA前駆体が異なる成熟人工miRNAsを生産することも証明する。例えば、pre-miR-P69^{159a}-HC-Pro^{159a}は、pre-miR-P69^{159a}とpre-miR-HC-Pro^{159a}からなるダイマーであるが、成熟miR-P69^{159a}とmiR-HC-Pro^{159a}を生産することができる。同様の様式において、本明細書で記載されたようなモノマーユニットをあらゆる数で含むヘテロ - 又はホモ - 重合体pre-miRNAsが生産される。単一のプロモーターの制御下で複数のpre-miRNAsを含む核酸構築物を製造するための例示の方法を実施例21と27に示す。各成熟miRNAは実施例22及び27に例示されるとおり核酸構築物から正確にプロセッシングされる。

【0081】

[0120] いくつかの態様において、上記核酸構築物は複数のポリヌクレオチドを含み、各々のポリヌクレオチドは別々のmiRNA前駆体、即ち、別々のpre-miRNAをコードする。当該ポリヌクレオチドは、単一のプロモーターの制御下に置かれてよいように、互いに作動可能のように連結される。いくつかの態様において、当該複数のポリヌクレオチドは、互いに連結されて、発現された際に複数のpre-miRNAsを含む単一の転写物を形成する。単一の転写物は、宿主細胞中でプロセッシングを受けて複数の成熟miRNAsを生産するが、各々はその標的遺伝子をダウン制御することができる。所望のpre-miRNAsをコードする多数のポリヌクレオチドが互いに連結され得る。

10

20

30

40

50

れども、唯一の制限は転写物の最終サイズである。8 - 10 kb の転写物を植物中で生産できることは知られている。即ち、2 - 30 又はそれより多くの pre - miRNA s、例えば、3 - 40 又はそれより多くの pre - miRNA s、例えば、3 - 45 又はそれより多くの pre - miRNA s、及びさらに例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又はそれより多くの pre - miRNA s のマルチマーをコードする複数のポリヌクレオチドを含む核酸構築物を形成することが可能である。いくつかの態様において、複数の miRNA s は互いに連結されることにより、発現された際に単一の転写物を形成する。

10

【0082】

[0121] いくつかの態様において、上記核酸構築物は、さらに、複数の miRNA s をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。いくつかの態様において、プロモーターを欠く核酸構築物をデザインして、宿主ゲノム中に組み込まれた際にプロモーターに作動可能に連結されるようになるような様式にて、導入される。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、組換えを用いて組み込まれるが、部位特異的組換えを含む。例えば、本明細書に引用により編入される、PCT 国際公開出願番号 WO99/25821 を参照されたい。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、RNA である。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、少なくとも一つの組換え部位を含むが、部位特異的組換え部位を含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、構築物の組み込み、修飾又はクローニングを促進させるために少なくとも一つの組換え部位を含む。いくつかの態様において、上記核酸構築物は、miRNA 前駆体に隣接して2つの部位特異的組換え部位を含む。いくつかの態様において、部位特異的組換え部位は、FRT 部位、lox 部位、又は att 分析とを含み、attB, attL, attP 又は attR 部位を含む。例えば、PCT 国際公開出願番号 WO99/25821、及び米国特許 5,888,732, 6,143,557, 6,171,861, 6,270,969, 及び 6,277,608 は引用により本明細書に編入されるが、参照されたい。

20

【0083】

[0122] いくつかの態様において、pre - miRNA は、細胞又は植物の遺伝子又はトランス遺伝子内のイントロンに挿入される。遺伝子が複数のイントロンを有するならば、pre - miRNA は同じか又は異なってよく、各イントロン内に挿入することができる。いくつかの態様において、イントロンに挿入された pre - miRNA は最初の RNA 転写物から放出され、よって、本明細書に例示されるとおり、miRNA s の前駆体として機能し得る。ほとんどのイントロンは、5' エンドにスプライシングドナー部位、3' エンドにスプライシングアクセプター部位、そしてイントロン中にランチ部位を含む。ランチ部位はイントロンの成熟に重要であり、それがなければ、イントロンは、最初の RNA 転写物から切り出されて放出されることができない。ランチ部位は、通常スプライシングアクセプター部位の 20 - 50 nt 上流に位置するが、スプライスドナー部位とランチ部位の間の距離は、異なるイントロンの間では大きく変更できる。即ち、いくつかの態様において、pre - miRNA は、スプライシングドナー部位とランチ部位の間のイントロンに挿入される。

30

40

【0084】

[0123] いくつかの態様において、標的 RNA は植物病原体の RNA であり、例えばウイルス又は植物ウイロイドの RNA である。いくつかの態様において、植物病原体 RNA に向けられた miRNA を病原体の誘導可能なプロモーターに作動可能のように連結する。いくつかの態様において、標的 RNA は mRNA である。mRNA 中の標的配列は、イントロン配列、コーディング配列又は mRNA スプライシングに關与する配列であってよい。miRNA をイントロン配列に標的化することは、mRNA の成熟化を危険にさらす。miRNA を mRNA スプライシングに關与する配列に標的化することは、別のス

50

プライス形態の成熟化に影響し、異なる蛋白質アイソフォームを提供する。いくつかの態様において、標的は、農地の制御の特性 (a g r o n o m i c t r a i t s)、昆虫耐性、疾患耐性、除草剤耐性、不稔性、穀物の特性、及び市販の製品に影響する遺伝子を含む。

【 0 0 8 5 】

[0 1 2 4] いくつかの態様において、発明の複数の m i R N A s をコードする核酸構築物を含み、及び / 又は発明の方法により提供される、細胞、植物及び種子が提供される。いくつかの態様において、当該細胞、植物及び / 又は種子は、複数のポリヌクレオチドを含む核酸構築物を含み、各々が本明細書に記載されたような植物 m i R N A 前駆体をコードする。いくつかの態様において、複数のポリヌクレオチドは、作動可能なようにプロモーターに連結される。プロモーターは、あらゆるよく知られたプロモーターであってよく、構成的プロモーター、誘導可能なプロモーター、脱抑制プロモーター等を含み、以下に記載されるとおりである。m i R N A 前駆体をコードするポリヌクレオチドは互いに連結される。いくつかの態様において、複数のポリヌクレオチドは互いに連結されることにより、細胞、植物又は種子中で発現された際に複数の p r e - m i R N A s を含む単一の転写物を形成する。細胞は、原核細胞及び真核細胞を含み、限定ではないが、細菌、酵母、真菌、ウイルス、無脊椎動物、脊椎動物、及び植物の細胞を含む。発明の植物、植物細胞、種子は、裸子植物 (g y n o s p e r m s)、単子葉及び双子葉を含み、限定ではないが、例えば、イネ、コムギ、エンバク、オオムギ、キビ、モロコシ属、ダイズ、ヒマワリ、ペニバナ、カノーラ、アルファルファ、ワタ、アラビドプシス、及びタバコを含む。

10

20

【 0 0 8 6 】

[0 1 2 5] 本発明は、標的配列の抑圧及び / 又は機能の確認に有用な方法及び組成物に関する。発明は、機能を評価するか又は表現型の効果及び / 又は特性の発生 (d e v e l o p m e n t) に関して標的配列を確認するために標的配列を沈黙化させるか又は抑圧するのにマイクロ RNA (m i R N A) 媒介性 RNA 干渉 (R N A i) を用いる方法にも関する。特定すれば、発明は、サイレンシングを誘導できる小さい核酸分子、m i R N A s を含む構築物、及びこれらの m i R N A s を用いて選択的に標的配列を沈黙化する方法に関する。

【 0 0 8 7 】

[0 1 2 6] RNA 干渉は、短い干渉 RNA s (s i R N A s) により媒介される動物内で配列 - 特異的に転写後遺伝子サイレンシングするプロセスを意味する (F i r e e t a l . (1 9 9 8) N a t u r e 3 9 1 : 8 0 6 - 8 1 0)。植物内の相当するプロセスは、転写後遺伝子サイレンシング (P T G S) 又は RNA サイレncing と一般には呼ばれ、あるいは真菌においては鎮圧 (q u e l l i n g) とも呼ばれる。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を妨害するために用いられた進化上保存された細胞防御機構であると考えられ、一般には、別種の叢 (f l o r a) と門 (p h y l a) により共有される (F i r e (1 9 9 9) T r e n d s G e n e t . 1 5 : 3 5 8 - 3 6 3)。外来遺伝子発現からのそのような防御は、ウイルス感染に由来するか、或いはウイルスゲノム RNA の相同な単鎖 RNA を特異的に破壊する細胞応答による宿主ゲノムへのトランスポゾン要素のランダムな組み込みに由来する、二重鎖 RNA s (d s R N A s) の生産に応答して進化してきたのかもしれない。細胞内の d s R N A の存在は、今のところ完全に特性決定されなければならない機構により RNA i 応答を誘発する。

30

40

【 0 0 8 8 】

[0 1 2 7] 長い d s R N A s の細胞内の存在は、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼ I I I 酵素の活性を刺激する。ダイサーは短い干渉 RNA s (s i R N A s) として知られる d s R N A の短い一片 (p i e c e s) への d s R N A のプロセシングに関与する (B e r n s t e i n e t a l . (2 0 0 1) N a t u r e 4 0 9 : 3 6 3 - 3 6 6)。ダイサー活性に由来する短い干渉 RNA は、通常、約 2 1 から約 2 3 ヌクレオチドの長さであり、約 1 9 塩基対の二重鎖を含む (E l b a s h i r e t a l . (2 0 0 1) G e n e s D e v 1 5 : 1 8 8 - 2 0 0)。ダイサーは、翻訳制御に関係してい

50

る保存された構造の前駆体RNAからの21-及び22-ヌクレオチドの小さい一過性のRNAs (stRNAs)の切り出しにも関係する(Hutvanger et al. (2001) Science 293:834-838)。RNAi応答はエンドヌクレアーゼ複合体も特徴とし、一般にはRNAにより誘導されたサイレンシング複合体(RISC)と呼ばれ、siRNA複合体のアンチセンス鎖に対して配列相補性を有する一本鎖RNAの分割に介在する。標的RNAの分割はsiRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補な領域の中央で生じる(Elbashir et al. (2001) Genes Dev 15:188-200)。さらに、RNA干渉は小さいRNA(例えば、マイクロRNA、又はmiRNA)の介在する遺伝子サイレンシングを含むことができ、おそらくは、クロマチン構造を制御してそれにより標的遺伝子配列の転写を妨害する細胞機構による(例えば、Allshire, Science 297:1818-1819 2002; Volpe et al. (2002) Science 297:1833-1837; Jenuwein (2002) Science 297:2215-2218; Hall et al. (2002) Science 297:2232-2237を参照)。そうして、発明のmiRNA分子を用いることにより、RNA転写物との相互作用によるか又は特定の遺伝子配列との相互作用により遺伝子サイレンシングに介在することができ、そのような相互作用は転写レベルにおけるか又は転写後レベルの何れかにおいて遺伝子サイレンシングをもたらす。

【0089】

[0128] RNAiは様々なシステムにおいて研究されてきた。Fireら((1998) Nature 391:806-811)は、シノラブディスエレガンスにおいてRNAiを初めて観察した。WiannyとGoetz((1999) Nature Cell Biol 2:70)は、マウス胚においてdsRNAにより介在されるRNAiを記載する。Hammondら((2000) Nature 404:293-296)は、dsRNAをトランスフェクトされたドロソフィラの細胞内のRNAiを記載する。Elbashirら((2001) Nature 411:494-498)は、ヒトの胚の腎臓及びヒーラ細胞を含む培養された哺乳類された内での合成21-ヌクレオチドRNAsの二重鎖の導入により誘導されたRNAiを記載する。

【0090】

[0129] 小RNAsは、遺伝子発現を制御することにおいて重要な役割を担う。開花を含む多くの発生プロセスの制御は、小RNAsにより制御される。植物内で小RNAsを生産するトランスジェニック構築物を用いることにより植物遺伝子の遺伝子発現において変化を工作することが今は可能である。

【0091】

[0130] 小RNAsは相補RNA又はDNA標的配列への塩基対合により機能するらしい。RNAに結合したら、小RNAはRNA分割又は標的配列の翻訳阻害の何れかを誘導する。DNA標的配列に結合したら、小RNAsが標的配列のDNAメチル化を媒介できると考えられる。特定の機構に拘わらず、これらの事象の結果は遺伝子発現が阻害されることである。

【0092】

[0131] 小RNAsとそれらのRNA標的の間の配列相補性は、RNA分割又は翻訳阻害のどの機構が用いられるかを決定する助けとなると考えられる。それらの標的に完全相補なsiRNAはRNA分割により働くと信じられる。いくつかのmiRNAsは、それらの標的に対して完全又は完全に近い相補性を有し、そしてRNA分割がこれらのmiRNAsの少なくともいくつかに関して証明された。他のmiRNAsはそれらの標的といくつかのミスマッチを有し、そして翻訳レベルにおいて見かけ上(apparently)それらの標的を阻害する。再び、作用機構に関する特定の理論に拘束されることなく、完全又は完全に近い相補性が特に最初の10ヌクレオチド(miRNAの5'エンドから数えて)の範囲内ではRNA分割に都合がよく、一方、miRNA/標的二重鎖が多数のミスマッチを含む場合には翻訳阻害に都合がよいという一般原則が明らかになってい

10

20

30

40

50

る。これに対する明かな期待は植物中のマイクロRNA 172 (miR172) である。miR172の標的の一つは、APETALA2 (AP2) であり、そしてmiR172はAP2と完全に近い相補性を分かちが、RNA分割よりもむしろAP2の翻訳阻害を誘導するらしい。

【0093】

[0132] マイクロRNAs (miRNAs) は動物及び植物の両方において同定された約19から約24ヌクレオチド (nt) の長さの非コーディングRNAである (Lagos-Quintana et al. (2001) Science 294: 853-858, Lagos-Quintana et al. (2002) Curr Biol 12: 735-739; Lau et al. (2002) Science 294: 858-862; Lee and Ambros (2001) Science 294: 862-864; Llave et al. (2002) Plant Cell 14: 1605-1619; Mourelatos et al. (2002) Genes Dev 16: 720-728; Park et al. (2002) Curr Biol 12: 1484-1495; Reinhart et al. (2002) Genes Dev 16: 1616-1626)。それらは約70から200ntのサイズの範囲の長い前駆体転写物からプロセシングされて、前駆体転写物はヘアピン構造を形成する能力を有する。動物においては、miRNA前駆体に関与する酵素は、ダイサー、RNAse III様蛋白質と呼ばれる (Grishok et al. (2001) Cell 106: 23-34; Hutvagner et al. (2001) Science 293: 834-838; Ketting et al. (2001) Genes Dev 15: 2654-2659)。植物もダイサー様の酵素、DCL1 (以前はCARPEL FACTORY / SHORT INTEGRUMENTS 1 / SUSPENSOR 1と呼ばれた) を有し、そして最近の証拠は、それがダイサーのようにヘアピン前駆体のプロセシングに関与することにより成熟miRNAsを生じさせることを示す (Park et al. (2002) Curr Biol 12: 1484-1495; Reinhart et al. (2002) Genes Dev 16: 1616-1626)。さらに、最近の仕事からは、少なくともいくつかのmiRNAヘアピン前駆体が長いポリアデニル化転写物として生ずること、及びいくつかの異なるmiRNAsと関連するヘアピンが単一の転写物中に存在できることが明らかになりつつある (Lagos-Quintana et al. (2001) Science 294: 853-858; Lee et al. (2002) EMBO J 21: 4663-4670)。最近の仕事は、DICERによるヘアピンのプロセシングから生じるdsRNA生成物からのmiRNA鎖の選択も試験している (Schwartz et al. (2003) Cell 115: 199-208)。プロセシングされたdsRNAの2つの鎖の安定性 (即ち、G:C対A:U含有量。及び/又はミスマッチ) が鎖の選択性に影響するらしく、低い安定性のエンドはヘリカーゼ活性により容易にほどかれる。低い安定性のエンドにおける5'エンドの鎖はRISC複合体に取り込まれて、他方の鎖は分解される。

【0094】

[0133] 動物においては、発生において特定のmiRNAsの役割を示す直接的な証拠が存在する。シノラブディスエレガンスのlin-4とket-7 miRNAsは一時的な発生を制御することが分かっておりlin-4とlet-7 miRNAsを生じる遺伝子に変異したときに生じる表現型に基づく (Lee et al. (1993) Cell 75: 843-854; Reinhart et al. (2000) Nature 403: 901-906)。さらに、両方のmiRNAsが発生のタイミングにおいてそれらの役割と一致した一時的な発現パターンを表す。他の動物のmiRNAsは発現の発生において制御されたパターンを一時的なものと組織特異的なものの両方において表す (Lagos-Quintana et al. (2001) Science 294: 853-853, Lagos-Quintana et al. (2002) Curr Biol 12: 735-739; Lau et al. (2001) Science

e 294:858-862; Lee and Ambros (2001) Science 294:862-864) ことから、miRNAs は、多くの場合、重要な発生プロセスの制御に関与しているかもしれないという仮説を導く。同様に、植物においては、多くのmiRNAsの異なる発現パターンが発生における役割を示唆しており (Llave et al. (2002) Plant Cell 14:1605-1619; Park et al. (2002) Curr Biol 12:1484-1495; Reinhardt et al. (2002) Genes Dev 16:1616-1626)、今も示される (例えば、Guo et al. (2005) Plant Cell 17:1376-1386)。

【0095】

[0134] マイクロRNAはこれらの遺伝子により生産される転写物内に位置する相補配列に結合することにより標的遺伝子を制御するらしい。lin-4とlet-7の場合、標的部位は標的mRNAsの3'UTRs内に位置し (Lee et al. (1993) Cell 75:843-854; Wightman et al. (1993) Cell 75:855-862; Reinhardt et al. (2000) Nature 403:901-906; Slack et al. (2000) Mol Cell 5:659-669)、そしてlin-4とlet-7 miRNAsとそれらの標的部位の間にはいくつかのミスマッチが存在する。lin-4又はlet-7 miRNAの結合は、転写物自身に対して影響することなく標的mRNAによりコードされる蛋白質の定常状態レベルのダウン制御を誘導するらしい (Olsen and Ambros (1999) Dev Biol 216:671-680)。他方、最近の証拠は、miRNAsがいくつかのケースにおいて標的部位内にて標的転写物の特異的なRNAの分割を誘導できることを示唆しており、そしてこの分割工程はmiRNAと標的転写物の間の100%相補性を、特に最初の10ヌクレオチドの範囲内で要求するらしい (miRNAの5'エンドから数えて) (Hutvagner and Zamore (2002) Science 297:2056-2060; Llave et al. (2002) Plant Cell 14:1605-1619)。miRNAsは標的遺伝子の制御の少なくとも2つの経路に侵入することができるらしい。標的の相補性が<100%のとき蛋白質ダウン制御であり、そして標的相補性が100%のときRNA分割である。RNA分割経路に侵入するマイクロRNAは、動物においてRNA干渉 (RNAi) の間及び植物において転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) の間に生じる21-25ntの短い干渉RNAs (siRNAs) に類似し (Hamilton and Baulcombe (1999) Science 286:950-952; Hammond et al. (2000) Nature 404:494-498)、そしてRNAiに関して観察されるのと類似又は同一のRNA誘導性サイレンシング複合体 (RISC) に取り込まれるらしい。

【0096】

[0135] バイオインフォマティクスによるmiRNAsの標的の同定は、動物においては成功しなかったが、これはおそらく動物のmiRNAsがそれらの標的に対して低い相補性しか有さないという事実による。他方、バイオインフォマティクスのアプローチは植物miRNAsの標的を予測するための使用には成功したが (Llave et al. (2002) Plant Cell 14:1605-1619; Park et al. (2002) Curr Biol 12:1484-1495; Rhoades et al. (2002) Cell 110:513-520)、即ち、植物のmiRNAsは動物のmiRNAsよりもそれらの仮想標的に対して高い全体相補性を有するらしい。植物のmiRNAsのこれら予測された標的転写物のほとんどは、植物の発生パターン又は細胞分化に係る転写因子のファミリーのメンバーをコードする。にもかかわらず、生物学上の機能は如何なる植物miRNAに関しても直接証明されていない。Llaveら ((2002) Science 297:2053-2056) は、SCARECROW-様転写因子の転写物がアラビドプシスのmiRNAであ

10

20

30

40

50

る *mir171* の標的であることを示したが、これらの研究は異種においては実施されず、そして *mir171* に関連する植物表現型は報告されていない。

【0097】

【0136】 提供される方法は、形質転換の方法が利用可能な、そして標的配列に関して又は目的の標的配列の隣接の領域に関して少なくともいくつかの配列情報が存在する、あらゆる生物において実施することができる。2つ又はそれより多くの配列が、連続形質転換、一つより多い標的化ベクターにより同時形質転換、又は一つより多い *miRNA* 配列を含む *DNA* 構築物の構築により標的化できたことも認識される。発明の方法は、ランダム標的配列に向けられた *miRNAs* のライブラリーを生成するために、コンビナトリアル核酸ライブラリーによっても満たされるかもしれない。*miRNAs* のライブラリーは、遺伝子機能の確認のためにハイスループットスクリーニングのために使用できた。

10

【0098】

【0137】 目的の配列の一般的カテゴリーは、例えば、制御又は情報に関与する遺伝子、例えば、ジンクフィンガー、転写因子、ホメオティック遺伝子、又は細胞周期及び細胞死変調因子、伝達に関与する遺伝子、例えば、キナーゼ、及びハウスキーピングに関与する遺伝子、例えばヒートショック蛋白質を含む。

【0099】

【0138】 標的配列は、さらに、コーディング領域及び非コーディング領域、例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、イントロン等を含み、目的の遺伝子の発現を変更するために修飾されてよい。例えば、イントロン配列を 5' 領域に加えることにより、蓄積する成熟メッセージの量を増加させることができる（例えば、Buchman and Berg (1988) *Mol Cell Biol* 8: 4395-4405; 及び Callis et al. (1987) *Genes Dev* 1: 1183-1200 を参照）。

20

【0100】

【0139】 標的配列は内生配列であってよく、あるいは導入された異種配列又はトランス遺伝子であってよい。例えば、上記方法を用いることにより、トランス遺伝子の制御又は発現を変更するか、又はトランス遺伝子又は他の導入された配列、例えば導入された部位特異的組換え部位を除去してよい。標的配列は病原体からの配列であってよく、あるいは、標的配列は植物病原体、例えばウイルス、糸状菌又は真菌、昆虫、又は線虫からであってよい。*miRNA* は植物中で発現させることができ、感染又は侵入に際して、病原体を標的として植物に対してある程度の耐性を授与する。本明細書中の実施例は、植物に対してウイルス耐性/寛容を授与するように人工の *miRNAs* をデザインするための技術を示す。いくつかの態様において、ウイルスの異なる配列に対して向けられた2つ又はそれより多くの人工 *miRNA* 配列を用いて標的ウイルスが変異することを妨害し、即ち耐性機構をかわすことができる。いくつかの態様において、人工 *miRNA* の配列はそれらがウイルス *RNA* の必須の領域（例えば、サイレンシング遺伝子サプレッサーの活性部位）を標的とするように選択することができる。この場合、この選択された領域内のウイルスの変異が、コードされた蛋白質を不活性にして、即ち、耐性機構を逃れる方法としてウイルスの変異を阻止する。いくつかの態様において、ウイルスのファミリーの保存された配列に対して向けられた人工 *miRNA* は全ファミリーのメンバーに対して耐性を授与するはずである。いくつかの態様において、メンバーの間で保存された配列に向けられた人工 *miRNA* は、異なるウイルスファミリーのメンバーに対して耐性を授与するはずである（例えば、表1を参照）。

30

40

【0101】

【表 1】

表 1

人工 miRNA のデザインのための TuMV の保存されたウイルスゲノム配列

TuMV CY5				
番号	領域 ^a	遺伝子	配列 ^b (配列番号:)	長さ
1	3207～3229	P3	5'-cgatttaggcggcagatacagcg-3' (167)	23
2	9151～9185	CP	5'-atttcaatggtttaatggctcgtgcattgagaa-3' (168)	35
3	9222～9227	CP	5'-ataaacggaatgtgggtgatgatgga-3' (169)	26
4	9235～9255	CP	5'-gatcaggtggaattcccgatc-3' (170)	21
5	9270～9302	CP	5'-cacgccaaccacatttaggcaaataatggc-3' (171)	32
6	9319～9386	CP	5'-gctgaagcgtaacattgaaaagcgtaaccaagaccgaccatac atgccacgatatggtcttcagcgcaa-3' (172)	68
7	9430～9509	CP	5'-gaaatgacttctagaactccaatacgtgcgagagaagcacac atccagatgaaagcagcagcactgcgtggcgcaaataa-3' (173)	80
8	9541～9566	CP	5'-acaacggtagagaacacggagaggca-3' (174)	26

^a ゲノム配列の領域は TuMV CY5 株 (AF530055) に従う。^b 21 の異なる TuMV 株からの高度に保存された TuMV 配列を Vector NTI Advance 10.0.1 ソフトウェア (インビトロジェン社) と並べた。

The full-length sequence of 21 の異なる TuMV 株の完全長配列は、ジェンバンクデータベースから以下の受け入れ番号のものを得たが、AB093596, AB093598, AB093599, AB093600, AB093615, AB093616, AB093617, AB093618, AB093619, AB093611, AB093612, AY227024, AB093609, AF394601, AF169561, AF530055, AF394602, AB093623, AB093624, AY090660, D83184 を含んだ。

【 0 1 0 2 】

[0 1 4 0] 植物において、標的配列の他のカテゴリーは、農地の制御の特性 (a g r o n o m i c t r a i t s)、昆虫耐性、疾患耐性、除草剤耐性、不稔性、穀物の特性、及び市販の製品に影響する遺伝子を含む。目的の遺伝子は、オイル、スターチ、糖質、又は栄養代謝物に関係するもの並びに穀粒サイズ、蔗糖負荷等に影響するものも含む。穀物の質は特性において反映されており、例えば、オイルのレベルと種類、飽和していること及び未飽和であること、必須アミノ酸の質と量、及びセルロースのレベルである。例えば、フィチン酸の生合成経路の遺伝子を抑圧することにより、利用性の高いリンの表現型 (p h o s p h o r o u s p h e n o t y p e) を生じさせることができた。例えば、フィチン酸の生合成酵素は、W O 0 2 / 0 5 9 3 2 4 に開示されたイノシトールポリホスフェートキナーゼ - 2 ポリヌクレオチド、W O 0 3 / 0 2 7 2 4 3 に開示されたイノシトール 1 , 3 , 4 - トリホスフェート 5 / 6 キナーゼポリヌクレオチド、及び W O 9 9 / 0 5 2 9 8 に開示されたミオ - イノシトール 1 - ホスフェートシンターゼ及び他のフィチン酸の生合成ポリヌクレオチドを含むが、全ては引用により本明細書に編入される。木化 (l i g n i f i c a t i o n) 経路の遺伝子は、消化能力及びエネルギー利用性を増強するために抑圧することができた。細胞周期及び細胞死に影響する遺伝子は、成長又はストレス応答に影響するように抑圧することができた。DNA 修復及び / 又は組換えに影響する遺伝子は、遺伝的可変性を増加させるために抑圧することができた。開花時間に影響する遺伝子を抑圧することができ、並びに、稔性に影響する遺伝子も抑圧できた。特定の特性又は表現型におけるその役割を評価するか又は確認するため、又は分子上か、制御か、生化学か、又はプロテオミックの経路又はネットワークを詳細に分析するために、あらゆる標的配列を抑圧することができた。

【0103】

【0141】 多数のプロモーターを使用することができ、これらのプロモーターは所望の結果に基づいて選択することができる。miRNAの発現のタイミング、位置及び/又はレベルを変調するために、植物の発現カセットにおいて異なるプロモーターの使用により、異なる応用が増強されると認識される。そのような植物発現カセットは、所望ならば、プロモーター制御領域（例えば、誘導可能か、構成的か、環境的か、又は発生的に制御されたか、又は細胞性か又は組織特異的/選択的発現を授与するもの）、転写開始スタート部位、リボソーム結合部位、RNAプロセッシングシグナル、転写終結部位、及び/又はポリアデニル化シグナルを含んでもよい。

【0104】

【0142】 構成的な組織選択性又は誘導可能なプロモーターを用いることができる。構成的プロモーターの例は、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35S転写開始領域、アグロバクテリウムチュメファシエンスのT-DNA由来の1'-又は2'-プロモーター、ユビキチン1プロモーター、Smasプロモーター、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター（米国特許番号5,683,439）、Nosプロモーター、pEmuプロモーター、ルビスコプロモーター、GRP1-8プロモーター及び当業者には知られている様々な植物遺伝子由来の他の転写開始領域を含む。低レベルの発現が望まれるなら、弱いプロモーターを使用してよい。弱い構成的プロモーターは、例えば、Rsyn7プロモーターのコアのプロモーター（WO99/43838及び米国特許番号6,072,050）、コア35S CPCプロモーター等を含む。他の構成的プロモーターは、例えば、米国特許番号5,608,149;5,608,144;5,604,121;5,569,597;5,466,785;5,399,680;5,268,463;及び5,608,142を含む。本明細書に引用により編入される米国特許番号6,177,611も参照されたい。

【0105】

【0143】 誘導可能なプロモーターの例は、低酸素（hypoxia）又はコールドストレスにより誘導可能なAdh1プロモーター、熱ストレスにより誘導可能なHsp70プロモーター、共に光により誘導可能なPPDKプロモーター及びPEP（ホスホエノールピルベート）カルボキシラーゼプロモーターである。科学的に誘導可能なプロモーターも有用であり、例えば、毒性緩和剤により誘導されるIn2-2プロモーター（米国特許番号5,364,780）、エストロゲンにより誘導可能なEREプロモーター、及びオーキシンにより誘導可能であって膜層（tapetum）特異的であるがカルスにおいても活性なAxig1プロモーターである（PCT国際公開出願番号WO 02/04699）。誘導可能なプロモーターの他の例は、GVG及びXVEプロモーターを含み、それぞれグルココルチコイド及びエストロゲンにより誘導される（米国特許番号6,452,068）。

【0106】

【0144】 発生調節下のプロモーターの例は、特定の組織、例えば、葉、根、果実、又は花において選択的に転写を開始するプロモーターを含む。例示のプロモーターは、薬特異的プロモーター5126（米国特許番号5,689,049及び5,689,051）である。種子選択的プロモーターの例は、限定ではないが、27kDガンマゼインプロモーター及び蠟（waxy）プロモーターを含む（Boronat et al. (1986) Plant Sci 47:95-102; Reina et al. (1990) Nucl Acids Res 18:237-244）。胚、果皮及びエンド内胚乳において発現するプロモーターは、米国特許番号6,225,529及びPCT国際公開出願番号WO 00/12733に開示されている。これら各々の開示は、それら全体を引用により本明細書に編入する。

【0107】

【0145】 いくつかの態様においては、誘導可能なプロモーターから、特に、病原体誘導可能プロモーターから遺伝子を発現させることが有益になる。そのようなプロモータ

10

20

30

40

50

ーは、病原体関連蛋白質（PR蛋白質）からのものを含むが、病原体による感染の後に誘導され；例えば、PR蛋白質、SAR蛋白質、ベータ-1,3-グルカナーゼ、キチナーゼ、等である。例えば、Redolfi et al. (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89:245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4:645-656; 及び Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4:111-116を参照。引用により本明細書に編入されるPCT国際公開出願番号WO 99/43819も参照されたい。

【0108】

[0146] 興味深いのは、病原体感染の部位においてか又は近辺で局所的に発現されるプロモーターである。例えば、Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9:335-342; Matton et al. (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14972-14977を参照。Chen et al. (1996) *Plant J* 10:955-966; Zhang et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2507-2511; Warner et al. (1993) *Plant J* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968; 米国特許番号5,750,386（線虫誘導可能）；及びそれらに引用される文献も参照されたい。特に興味深いのは、トウモロコシのPRms遺伝子の誘導可能プロモーターであり、その発現は病原体であるフサリウムモニリフォルメにより誘導される（例えば、Cordero et al. (1992) *Physiol Mol Plant Path* 41:189-200を参照）。

【0109】

[0147] さらに、病原体は傷又は昆虫による損傷により植物への入り口を発見するように、傷誘導可能プロモーターを上記ポリヌクレオチドの構築において用いてよい。そのような傷誘導可能プロモーターは、ポテトプロティナーゼ阻害剤（pin II）遺伝子（Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotech* 14:494-498）; wun1及びwun2, 米国特許番号5,428,148; win1及びwin2 (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215:200-208）; システミン（McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570-1573）; WIP1 (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Lett* 323:73-76）; MPI遺伝子（Corderok et al. (1994) *Plant J* 6(2):141-150）、等を含み、引用により本明細書に編入される。

【0110】

[0148] 化学的に制御されるプロモーターを用いることにより、外来の化学制御剤の適用により植物において遺伝子の発現を変調させることができる。目的に応じて、当該プロモーターは化学物質誘導性プロモーターであってよく、化学物質の適用が遺伝子発現を抑圧する。化学物質誘導性プロモーターは当業界で知られており、限定ではないが、ベンズスルフォナミド除草剤毒性緩和剤により活性化されるトウモロコシのIn2-2プロモーター、雑草発芽前の除草剤として使用される疎水性親電子性化合物により活性化されるトウモロコシのGSTプロモーター、及びサリチル酸により活性化されるタバコのPR-1aプロモーターを含む。興味あるその他の化学制御プロモーターは、ステロイド応答性プロモーター（例えば、Schene et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10421-10425及びMcNellis et al. (1998) *Plant J* 14(2):247-257のグルココルチコイド誘導可能プロモーターを参照）及びテトラサイクリン誘導可能及びテトラサイクリン

10

20

30

40

50

耐性プロモーター（例えば、Gatz et al. (1991) Mol Gen Genet 227:229-237, 及び米国特許番号5,814,618及び5,789,156を参照）を含み、引用により本明細書に編入される。

【0111】

[0149] 組織選択的プロモーターを利用することにより、特定の植物の組織内の興味ある配列の増強された発現を標的化することができる。組織選択的プロモーターは、Yamamoto et al. (1997) Plant J 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) Plant Cell Physiol 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) Mol Gen Genet 254(3):337-343; Russell et al. (1997) Transgenic Res 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996) Plant Physiol 112(3):1331-1341; Van Camp et al. (1996) Plant Physiol 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) Plant Physiol 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) Plant Cell Physiol 35(5):773-778; Lam (1994) Results Probl Cell Differ 20:181-196; Orozco et al. (1993) Plant Mol Biol 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90(20):9586-9590; 及び Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J 4(3):495-505を含む。そのようなプロモーターは、必要ならば弱い発現のために修飾することができる。

【0112】

[0150] 葉 - 選択的プロモーターは当業界で公知である。例えば、Yamamoto et al. (1997) Plant J 12(2):255-265; Kwon et al. (1994) Plant Physiol 105:257-267; Yamamoto et al. (1994) Plant Cell Physiol 35(5):773-778; Gotor et al. (1993) Plant J 3:509-18; Orozco et al. (1993) Plant Mol Biol 23(6):1129-1138; 及び Matsuoka et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90(20):9586-9590を参照されたい。さらに、cab及びRUBISCOのプロモーターも使用できる。例えば、Simpson et al. (1958) EMBO J 4:2723-2729及びTimko et al. (1998) Nature 318:57-58を参照されたい。

【0113】

[0151] 根 - 選択的プロモーターは公知であって、文献からの多数の利用可能なものから選択されるか又は様々な適合可能な種からデノボにて単離することができる。例えば、Hire et al. (1992) Plant Mol Biol 20(2):207-218（ダイズ根 - 特異的グルタミンシンターゼ遺伝子）; Keller and Baumgartner (1991) Plant Cell 3(10):1051-1061（フレンチビーンのGRP1.8遺伝子中の根 - 特異的調節要素）; Sanger et al. (1990) Plant Mol Biol 14(3):433-443（アグロバクテリウムチュメファシエンスのマンノバインシンターゼ（MAS）遺伝子の根 - 特異的プロモーター）; 及び Miao et al. (1991) Plant Cell 3(1):11-22（細胞質グルタミンシンターゼ（GS）をコードする完全長のcDNAクローンであり、ダイズの根と根粒の中で発現される）を参照されたい。Bogusz et al. (1990) Plant Cell 2(7):633-641も参照されたく、窒素固定非マメ科パラスポニアアンデルソニ（Parasponia andersonii）

onia andersonii) 及び近縁の非窒素固定非マメ科トレマトメントサ (Trematomentosa) 由来のヘモグロビン遺伝子から単離された根特異的プロモーターが記載されている。これらの遺伝子のプロモーターを、 β -グルクロニダーゼリポーター遺伝子に連結し、そして非マメ科のニコチアナタバクム (Nicotiana tabacum) 及びマメ科のロタスコルニクラタス (Lotus corniculatus) の両者に導入したところ、両者の例において、根特異的プロモーター活性が保存された。Leach and Aoyagi ((1991) Plant Science (Limerick) 79(1): 69-76) は、アグロバクテリウムリゾゲネスの高発現 rolC 及び rolD 根誘導性遺伝子のプロモーターの彼らによる分析を記載する。彼らは、エンハンサーと組織選択的 DNA 決定基がそれらのプロモーターにおいて分離されると結論した。Teeriet al. ((1989) EMBO J 8(2): 343-350) は、オクトパインシンターゼをコードするアグロバクテリアの T-DNA 遺伝子が根の先端の表皮において特に活性であること、及び TR2' 遺伝子が完全な (intact) 植物においては根特異的であり、そして葉の組織の傷により刺激されることを示すために、lacZ に対する融合物を用いており、殺虫性 (insecticidal) 又は殺虫性 (larvicidal) の遺伝子と共に使用するための特性に関して特に望まれる組み合わせである。nptII (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II) に融合された TR1' 遺伝子は、類似の特性を示した。追加の根選択的プロモーターは、VfENOD-GRP3 遺伝子プロモーター (Kuster et al. (1995) Plant Mol Biol 29(4): 759-772); 及び rolB プロモーター (Capan et al. (1994) Plant Mol Biol 25(4): 681-691.) を含む。米国特許番号 5,837,876; 5,750,386; 5,633,363; 5,459,252; 5,401,836; 5,110,732; 及び 5,023,179 も参照されたい。ファセオリン遺伝子 (Murai et al. (1983) Science 23: 476-482 及び Sengopta-Gopal et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 82: 3320-3324)。

【0114】

[0152] 形質転換プロトコル並びにヌクレオチド配列を植物に導入するためのプロトコルは、形質転換のための標的化される植物又は植物細胞の種類、即ち、単子葉か双子葉かに依存して変更されてよい。DNA 構築物を導入するための適切な方法は、マイクロインジェクション (Crossway et al. (1986) Biotechniques 4: 320-324; 及び米国特許番号 6,300,543)、有性交配、エレクトロポレーション (Riggs et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83: 5602-5606)、アグロバクテリア媒介性形質転換 (Townsend et al., 米国特許番号 5,563,055; 及び米国特許番号 5,981,840)、直接の遺伝子移入 (Paszkowski et al. (1984) EMBO J 3: 2717-2722)、及び弾道粒子加速 (例えば、米国特許番号 4,945,050; 米国特許番号 5,879,918; 米国特許番号 5,886,244; 米国特許番号 5,932,782; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Cells via a Microprojectile Bombardment," Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed., Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); 及び McCabe et al. (1988) Biotechnology 6: 923-926) を含む。Weissinger et al. (1988) Ann Rev Genet 22: 421-477; Sanford et al. (1987) Particulate Science and Technology 5: 27-37 (タマネギ); Christou et al. (1988) Plant Physiol 87: 671-674 (ダイズ); Finer

10

20

30

40

50

and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev Biol* 27P:175-182 (ダイズ); Singh et al. (1998) *Theor Appl Genet* 96:319-324 (ダイズ); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (イネ); Klein et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4305-4309 (トウモロコシ); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (トウモロコシ); 米国特許番号5,240,855; 米国特許番号5,322,783; 米国特許番号5,324,646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol* 91:440-444 (トウモロコシ); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (トウモロコシ); Hooykaas - Van Slogteren et al. (1984) *Nature* 311:763-764; 米国特許番号5,736,369 (穀類); Bytebier et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5345-5349 (コリ科); De Wet et al. (1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp.197-209 (花粉); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 及び Kaeppler et al. (1992) *Theor Appl Genet* 84:560-566 (ヒゲ (whisker) - 媒介性形質転換); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (エレクトロポレーション); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 及び Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (イネ); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (アグロバクテリウムチュメファシエンス経由のトウモロコシ); 及び米国特許番号5,736,369 (分裂組織形質転換) も参照されたく、全ては引用により本明細書に編入される。

【0115】

【0153】ヌクレオチド構築物はウイルス又はウイルス核酸を植物に接触させることにより植物に導入してよい。一般に、そのような方法は、発明のヌクレオチド構築物をウイルスDNA又はRNA分子内に取り込むことを含む。さらに、有用なプロモーターはウイルスRNAポリメラーゼによる転写のために利用されるプロモーターを包含することが認識される。ウイルスDNA又はRNA分子を含むヌクレオチド構築物を植物に導入してその中にコードされる蛋白質を発現させるための方法は、当業界公知である。例えば、米国特許番号5,889,191, 5,889,190, 5,866,785, 5,589,367 及び 5,316,931 を参照されたく、引用により本明細書に編入される。

【0116】

【0154】いくつかの態様においては、一過性の発現が望まれるかもしれない。それらの場合、標準の一過性形質転換技術を使用してよい。そのような方法は、限定ではないが、ウイルス形質転換法、及びDNA又はRNAのマイクロインジェクション、並びに当業界公知の他の方法を含む。

【0117】

【0155】ヌクレオチド配列を安定に取り込んだ植物からの細胞は、慣用の様式に従い植物中で生育させてよい。例えば、McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84 を参照されたい。これらの植物をあとで生育させ、同じ形質転換株又は異なる株と受粉させ、そして目的のヌクレオチド配列及び/又は遺伝マーカーにより授与された所望の表現型特性の構成的発現を有する結果のハイブリッドが標的部位又は移入カセット中に含まれた。2又はそれより多い世代を生育させることにより、所望の表現型特性の発現が安定に保持されて遺伝することが保証さ

れ、そしてのちに所望の表現型特性の発現を保証するように回収された種子が目的を達成した。

【0118】

[0156] 上記DNA構築物を含む細胞及び/又は植物の初期の同定及び選択は、マーカー遺伝子の使用により促進させてよい。遺伝子標的化は、組換え体を同定するための高い感度の方法が存在するなら、例えば、標的化遺伝子修飾がPCR分析により容易に検出できるなら、あるいはそれが特定の表現型をもたらすなら、選択無しに実施することができる。しかしながら、ほとんどの場合、遺伝子標的化事象の同定は、マーカーの使用により促進されることになる。有用なマーカーは、正及び負の選択可能マーカー、並びにスクリーニングを促進させるマーカー、例えば可視マーカーを含む。選択可能なマーカーは、抗生物質、例えば、スペクチノマイシン（例えば、aada遺伝子、Svab et al. (1990) Plant Mol Biol 14:197-205）、ストレプトマイシン（例えば、aada, 又はSPT, Svab et al. (1990) Plant Mol Biol 14:197-205; Jones et al. (1987) Mol Gen Genet 210:86）、カナマイシン（例えば、nptII, Fraley et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:4803-4807）、ハイグロマイシン（例えば、HPT, Vanden Elzen et al. (1985) Plant Mol Biol 5:299）、ゲンタマイシン（Hayford et al. (1988) Plant Physiol 86:1216）、フレオマイシン、ゼオシン、又はブレオマイシン（Hille et al. (1986) Plant Mol Biol 7:171）又は除草剤に対する耐性、例えば、ホスフィノスリシン（bar遺伝子）、又はスルフォニルウレア（アセトラクテートシンターゼ（ALS）（Charest et al. (1990) Plant Cell Rep 8:643）、不完全培地上の成長必要条件を満たす遺伝子、例えば、酵母のHIS3, LEU2, LYS2, 及びTRP1遺伝子、及び他の当業界公知の他のそのような遺伝子を含む。陰性選択可能マーカーは、シトシンデアミナーゼ（codA）（Stougaard (1993) Plant J. 3:755-761）、tms2（DePICKER et al. (1988) Plant Cell Rep 7:63-66）、硝酸レダクターゼ（Nussame et al. (1991) Plant J 1:267-274）、SU1（O'Keefe et al. (1994) Plant Physiol. 105:473-482）、アグロバクテリアのTiプラスミド由来のaux-2、及びチミジンキナーゼを含む。スクリーニング可能なマーカーは、蛍光蛋白質、例えば、緑色蛍光蛋白質（GFP）（Chalfie et al. (1994) Science 263:802; US 6,146,826; US 5,491,084; 及びWO 97/41228）、リポーター酵素、例えば、-グルクロニダーゼ（GUS）（Jefferson (1987) Plant Mol Biol Rep 5:387; 米国特許番号5,599,670; 米国特許番号5,432,081）、-ガラクトシダーゼ（lacZ）、アルカリホスファターゼ（AP）、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）及びルシフェラーゼ（米国特許番号5,674,713; Ow et al. (1986) Science 234:856-859）、ウイルスマーカー様アントシアニン、例えば、CRC（Ludwig et al. (1990) Science 247:449-450）R遺伝子ファミリー（例えば、Lc, P, S）、A, C, R-nj、ドロソフィラの体色及び/又は眼の色の遺伝子、哺乳類系におけるコートカラー遺伝子、及び当業界公知のその他の遺伝子を含む。

【0119】

[0157] 遺伝子標的化事象を選択してスクリーニングするためには、一つ又はそれより多くのマーカーを使用してよい。遺伝子破壊の一つの共通の戦略は、標的がプロモーターレスの選択可能マーカーにより破壊されるような標的修飾ポリヌクレオチドを用いることを含む。選択可能マーカーはプロモーターを欠くから、ランダムな組み込み事象が遺伝子の転写を導く可能性はない。遺伝子標的化事象は、標的遺伝子のためのプロモーター

の制御下に選択遺伝子を置くことになる。遺伝子標的化事象は、選択可能な遺伝子の発現に関する選択性により同定される。別の共通の戦略は、正 - 負選択スキムを利用する。このスキムは2つの選択可能なマーカーを利用するが、一つは耐性 (R+) を授与し、感受性 (+S) を授与する他方とカップリングされて、各々がプロモーターを伴う。このポリヌクレオチドがランダムに挿入された場合、結果の表現型は R+ / S+ である。遺伝子標的化事象が生じた場合、上記2つのマーカーはカップリングがはずれて、結果の表現型は R+ / S- である。陽性 - 陰性選択の例は、Thy k j a e r e t a l . (1 9 9 7) P l a n t M o l B i o l 3 5 : 5 2 3 - 5 3 0 ; 及び P C T 国際公開出願番号 W O 0 1 / 6 6 7 1 7 に見いだされ、引用により本明細書に編入される。

【 0 1 2 0 】

[0 1 5 8] 本発明の実施は、他に支持しない限り、化学、分子生物学、微生物学、組換え DNA、遺伝学、免疫学、細胞生物学、細胞培養及びトランスジェニック生物学の慣用技術を用いるが、当業界の範囲内である。例えば、Maniatis et al. (1 9 8 2) M o l e c u l a r C l o n i n g (C o l g S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k) ; Sambrook et al. (1 9 8 9) M o l e c u l a r C l o n i n g , 第 2 版 (C o l g S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k) ; Sambrook and Russell (2 0 0 1) M o l e c u l a r C l o n i n g , 第 3 版 (C o l g S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k) ; Ausubel et al. (1 9 9 2) C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y (J o h n W i l e y & S o n c , 定期的なアップデートを含む) ; Glover (1 9 8 5) D N A C l o n i n g (L R L P r e s s , O x f o r d) ; Anand (1 9 9 2) T e c h n i q u e s f o r t h e A n a l y s i s o f C o m p l e x G e n o m e s (A c a d e m i c P r e s s) ; Guthrie and Fink (1 9 9 1) G u i d e t o Y e a s t G e n e t i c s a n d M o l e c u l a r B i o l o g y (A c a d e m i c P r e s s H a r l o w a n d L a n e (1 9 8 8) A n t i b o d i e s , (C o l g S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k) ; Jakoby and Pastan, eds. (1 9 7 9) " C e l l C u l t u r e " M e t h o d s i n E n z y m o l o g y V o l . 5 8 (A c a d e m i c P r e s s , I n c . , H a r c o u r t B r a c e J o v a n o v i c h (N Y)) . ; N u c l e i c A c i d H y b r i d i z a t i o n (B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s e d s . 1 9 8 4) ; T r a n s c r i p t i o n A n d T r a n s l a t i o n (B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s e d s . 1 9 8 4) ; C u l t u r e O f A n i m a l C e l l s (R . I . F r e s h n e y , A l a n R . L i s s , I n c . , 1 9 8 7) ; I m m o b i l i z e d C e l l s A n d E n z y m e s (I R L P r e s s , 1 9 8 6) ; B . P e r b a l , A P r a c t i c a l G u i d e T o M o l e c u l a r C l o n i n g (1 9 8 4) ; t h e t r e a t i s e , M e t h o d s I n E n z y m o l o g y (A c a d e m i c P r e s s , I n c . , N . Y .) ; G e n e T r a n s f e r V e c t o r s F o r M a m m a l i a n C e l l s (J . H . M i l l e r a n d M . P . C a l o s e d s . , 1 9 8 7 , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y) ; M e t h o d s I n E n z y m o l o g y , V o l s . 1 5 4 a n d 1 5 5 (W u e t a l . e d s .) , I m m u n o c h e m i c a l M e t h o d s I n C e l l A n d M o l e c u l a r B i o l o g y (M a y e r a n d W a l k e r , e d s . , A c a d e m i c P r e s s , L o n d o n , 1 9 8 7) ; H a n d b o o k O f E x p e r i m e n t a l I m m u n o l o g

10

20

30

40

50

y, Volumes I - IV (D.M.Weir and C.C.Blackwell, eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), (4th Ed., Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000); Methods in Arabidopsis Research (C.Koncz et al., eds, World Scientific Press, Co., Inc., River Edge, Minnesota, 1992); Arabidopsis: A Laboratory Manual (D.Weigel and J. Glazebrook, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2002)を参照されたい。

【0121】

実施例

[0159] 以下は、発明を例示するために意図された非限定実施例である。本発明は理解の明確化のために例示によりそして実施例によりいくらか詳細に記載されてきたが、特定の変化及び修飾が請求の範囲の範囲内で実施されてよいことは明らかである。例えば、本明細書に記載されたあらゆる pre-miRNAs 及び miRNAs を、実施例にて使用された pre-miRNAs 及び miRNAs に代えて用いることができる。実施例 1 - 15 は、PCT 国際公開出願番号 WO 2005/052170 及び WO 2005/035769 から及び米国公開出願番号 US 2005/0138689 及び US 2005/0120415 からであり、引用により本明細書に編入される。

【0122】

実施例 1

[0160] 本実施例はマイクロRNAの同定を記載する。

【0123】

[0161] 以下の実験は、アラビドプシスサリアナ Col-0 生態型にて実施される。植物を長日(16時間光、8時間暗)冷白光(cool white light)下で22℃において生育させる。

【0124】

[0162] 花の浸し方法(floral dip method)の修飾バージョンによりアラビドプシス植物を形質転換したが、上から直接に水をかけることによりアグロバクテリア細胞懸濁液を植物に適用する。用いられた T-DNA ベクターは pHS-bar-ends であり、右の縁に隣接して CAMV 35S エンハンサーを4コピー含んだが、Weigelら(Plant Physiol. 122:1003-1013, 2000)に記載されたのと類似の配置である。形質転換された植物はグルフォシネート(BASTA)により選択されて、開花時間に関してスクリーニングされ、初期開花 EAT-D 変異体の同定をもたらした。初期開花と共に分離する(cosegregating)単一の T-DNA が EAT-D にて同定され、そして TAIL-PCR を実施することにより、T-DNA の左と右の縁に隣接した配列を増幅する。EAT-D 変異体においてアップ制御される転写物を同定するために、野生型(Col-0)及び EAT-D 植物から抽出された RNA を含むノーザンブロットを釣る。遺伝子 At5g04270 と At5g04280 (ジェンバンク NC_003076)のためのプローブは野生型と EAT-D の間の如何なる差異も検出しないが、属間(intergeneric)領域からのプローブは、野生型よりも EAT-D において顕著に高いレベルで発現される約 1.4 kb の転写物を

同定する。

【0125】

【0163】 完全長EAT cDNAを単離するために、5' - 及び3' - RACE - PCRを、5' - キャップmiRNAsを選択するGeneRacerキット（インビトロジェン）を用いて実施する。逆転写をオリゴ - dTプライマーを用いて実施し、そしてPCRは、遺伝子特異的プライマー（配列番号：45 5' - CTGTGCTCACGA TCTTGTTGTTCTTGATC - 3'）を5' キットプライマーと対にするか、又は第2の遺伝子特異的プライマー（配列番号：46 5' - GTCGGCGGATCCATGGAAGAAAGCTCATC - 3'）を3' キットプライマーと対にして利用した。

10

【0126】

【0164】 アラビドプシスEAT - D（初期活性化タグ - ドミナント）変異体を活性化タグ付加集団にて同定する（activation tagging population）（Weigel et al. (2000) Plant Physiol 122:1003 - 1013）。可視検査及びロゼット葉の数を測定することにより明らかになるとおり（表2）、EAT - D変異体は極端に早く開花する。さらに、EAT - Dは強いapetala2（ap2）変異体対立遺伝子に関して観察されたのと実質同一の花の欠損を表し（Bowman et al. (1991) Development 112:1 - 20）、花卉の完全な欠如と萼から心皮への形質転換を含む。このap2 - 様表現型はEAT - Dホモ接合体においてのみ観察されるが、EAT - Dのヘテロ接合体とホモ接合体の両方共が初期に開花することから、開花時間の表現型は、ap2 - 様花表現型よりもEAT - D用量に対してより敏感であることが示される。

20

【0127】

【表2】

表2

アラビドプシス系列のロゼット葉の数

遺伝子型	ロゼット葉数	花の表現型
Col-0	11.4 +/- 1.2	野生型
EAT-D	3.1 +/- 0.8	ap2
EAT-OX	2.0 +/- 0.2	ap2 + 追加
eatdel	11.1 +/- 1.1	野生型
miR172a1-OX	2.1 +/- 0.3	ap2 + 野生型
LAT-D	22.5 +/- 2.1	野生型
At2g28550-OX	28.6 +/- 3.6	野生型
5-60120	10.2 +/- 1.4	野生型
2-28550	8.7 +/- 0.6	野生型
5-60120; 2-28550	6.0 +/- 0.8	野生型

30

40

【0128】

【0165】 EAT - D中の活性化タグT - DNA挿入物は第5染色体の、注釈を付けられた遺伝子At5g04270とAt5g04280の間にマップされる。5' - 及び3' - RACE PCRを次にこの領域内に位置するプライマーと共に用いることにより、1.4 kbの転写物（配列番号：1）を同定するが、EATと命名され、EAT - Dにおいてアップ制御される。当該1.4 kbのEAT cDNAが構成的CAMV35プロモーターに融合される、そして結果の35S::EAT構築物が野生型（Col-0）植物へアグロバクテリア媒介性形質転換（Clough and Bent (1998) Plant J 16:735 - 743）により導入される場合、35S::EAT形質転

50

換体は、EAT-Dに関して観察されるのと同じの初期開花及びap2-様表現型を表す(表1)。35S::EAT形質転換体の多くは場合により追加の欠損を表し、芝生の葉縁(cauline leaf margins)上の傷痕状突起(stigmatic papillae)及び芝生の葉の葉脈内の第2の花序(second inflorescence)よりむしろ完全又は部分的な花の形成を含む。35S::EAT植物におけるEAT遺伝子の発現は、よって、開花時間及び花の器官の同一性の仕様(specification)の両方に影響する。

【0129】

【0166】 EAT遺伝子は、RACE-PCR方法論に基づくと、5'-キャップされてポリアデニル化されると予測される1417-ヌクレオチドの非コードRNAを生産する。いくつかのデータベースのEAT cDNAによるBLASTINとBLASTX検索は、EATと他のあらゆる遺伝子の間に広範囲なヌクレオチド又は予測されるアミノ酸配列の同一性を示さない。しかしながら、EAT転写物の中央の21ヌクレオチド(nt)(配列番号:4)のストレッチは最近同定されたmiRNAであるmiR172a-2と同一のものである(Park et al. (2002) Curr Biol 12:1484-1495)。EAT cDNA内のmiR172a-2配列の機能の重要性を確認するため、EATの変異形態を生産するが、miR172a-2配列を欠失させ、そしてこの変異体EAT cDNA、eatdelからなる構築物を35Sプロモーター推進にて作成する。この35S::eatdel構築物を運ぶトランスジェニック植物は野生型と同じ数の花を開花し、正常な花を有した(表1)ことから、miR172a-2配列はEAT-過剰発現系において観察される開花時間及び花器官同一性表現型の両方を授与するのに必要であることが示される。

【0130】

【0167】 Parkら(Curr Biol 12:1484-1495)により記されるとおり、21ntのmiR172a-2 miRNAはAP2のコーディング領域の3'エンド近傍の配列を伴うRNA二重鎖を形成する能力を有する(表3)。

【0131】

【表3】

表3

仮想 21-nt miR172a-2/AP2 RNA 二重鎖

配列	二重鎖	配列番号:
AP2 RNA	5'-CUGCAGCAUCAUCAGGAUUCU-3'	47
EAT miRNA	3'-UACGUCGUAGUAGUUCUAAGA-5'	48

二重鎖中のGU揺らぎに下線を引いた。

【0132】

【0168】 AP2遺伝子のこの特定の領域はAP2ファミリー間ではヌクレオチドレベルにおいてあまり保存されていない;にもかかわらず、miR172a-2に相補なAP2配列(配列番号:49)は他の3つのアラビドプシスAP2ファミリーメンバー、At5g60120(配列番号:50), At2g28550(配列番号:51), 及びAt5g67180(配列番号:52)において類似の位置に見いだされる。さらに、当該配列はトウモロコシのAP2遺伝子の確認できないspikelet1(Church et al. (1998) Genes Dev 12:1145-1154)(配列番号:53)及びglossy15(Moose and Sisco (1996) Genes Dev 10:3018-3027)(配列番号:54)の対応する位置において、及び他の多くの植物種からのAP2ファミリーメンバーに見いだすことができ、ダイズ、イネ、コムギ、トマト及びエンドウ(示さず)を含む。3つのアラビドプシスと2つのトウモロコシのAP2ファミリーメンバーのアラインメントを以下の表4に示す。

【0133】

【表 4】

表 4

AP2 21-nt 領域 (黒のバー) 及び周囲の配列のアラインメント (配列番号:)

AP2	ACCAAGTGTGACAAATGCTGCAGCATCATCAGGATTCTCTCCTCATCATCACAATCAG (49)	
At5g60120	CACCGCCACTGTTTTCAAATGCAGCATCATCAGGATTCTCACTCTCAGCTACACGCCCT (50)	
At2g28550	CACCATTGTTCTCAGTTGCAGCAGCATCATCAGGATTCTCACATTTCCGGCCACAACCT (51)	
At5g67180	GAAATCGAGTGGTGGGAATGGCAGCATCATCAGGATTCTCTCCTCAACCTTCCCCTTAC (52)	
IDS1	ACGTGCCGTTGCACCACTCTGCAGCATCATCAGGATTCTCTACCGCCGCCGGGGCCAAC (53)	
GL15	ACGCCAGCAGCGCCGCCGCTGCAGCATCATCAGGATTCCCCTGTGGCAGCTGGGTGCG (54)	

10

【0134】

[0169] アラビドプシスゲノムの第2染色体上にmiR172a-2のmiRNAの追加のコピーが存在し(miR172a-1, 図2d)、そしてmiR172a-2は3つの他のアラビドプシス座に対して類似性が高い。miR172a-2 miRNAのように、上記配列の4つ全ての繰り返しは、属間領域内、即ち、ジェンバンクにおいて現在記されたアラビドプシス遺伝子の間の中にある。さらに、上記配列は、トマト、ポテト及びダイズからのESTsに見いだされ、そして4つのコピーがイネノゲノミック配列中に見いだされた。

【0135】

実施例 2

20

[0170] この実施例は発現ベクターの構築を記載する。

【0136】

[0171] EAT遺伝子を過剰に発現させるため、XhoI部位を含むプライマー(配列番号: 55 5'-GACTACTCGAGCACCTCTCACTCCCTTTCTCTAAC-3'及び配列番号: 56 5'-GACTACTCGAGGTTCTCAAGTTGAGCACCTTGAAAC-3')をデザインすることにより、Col-0 DNAから完全なEAT遺伝子を増幅する。PCR産物をXhoIにより消化して、BamHI部位及びHindIII部位を欠いた修飾されたpBluescriptSK+ベクター(ストラタジーン、ラホーヤ、CA)に挿入し、EATX4(配列番号: 44)を生じさせる。35S::EAT形質転換体を生成するため、XhoIにより切断されたEAT遺伝子が二元ベクターpBE851へCAMV 35Sプロモーターとb-ファゼオリンターミネーターの間に挿入され、そしてCol-0を花の浸しにより形質転換した。eatdel構築物を生成するために、2つのオリゴヌクレオチドを合成する(配列番号: 57 5'-GATCCATGGGAAGAAAGCTCATCTGTCTGTTGTTTGTAGGCGCAGCACCAATTAAAGATTTCACATGGAAATTGATAAATAC-3'及び配列番号: 58 5'-CCTAAATTAGGGTTTTTGATATGTATATTCAACAATCGACGGCTACAAATACCTAA-3')が、断片中に位置する21ntのmiR172a-2配列を欠く以外はEATのcDNAのBamHI/HindIII断片を完全に再生した。これらの2つのオリゴをそれらの合成された相補鎖にアニールさせ(配列番号: 59 5'-TAGGGTATTTATCAATTTCCATGTGAATCTTAATGGTGTCTGCGCCTACAAACAACGACAGATGAGCTTTCTTCCATG-3'及び配列番号: 60 5'-AGCTTTTAGGTATTTGTAGCCGTCGATTGTGTAATATACATATCAAAACCTTAATT-3')、そしてBamHIとHindIIIで消化されていたEATX4に3分子連結反応にて連結した。これにより、野生型のEAT配列の159bpの138bp変異体配列による置き換えがもたらされた。上記のとおり、eatdel cDNAを、次に、pBE851にサブクローン化し、そして形質転換した。BASTAを用いて、EATとeatdelの両方の過剰発現構築物に関して植物内で選択する。

30

40

【0137】

50

[0 1 7 2] *miR172* ファミリーの別のメンバー、*miR172a-1* が *miR172a-2* のそれと類似の表現型を授与するか否かを試験するために、*miR172a-1* を包囲するゲノミック領域に融合された 35S プロモーターを含む構築物を生成する。35S::*miR172a-1* を含む植物は、開花が早く、そして *ap2* 表現型を表す (表 1) ことから、*miR172a-1* は過剰発現された際に *miR172a-2* と同一の様式にて挙動することが示される。

【 0 1 3 8 】

[0 1 7 3] *miR172* *miRNA* ファミリーメンバーの全てが、RNAヘアピンを形成することを許容する配列コンテキスト内に位置する (図 1)。おそらく、このヘアピンは、のちに植物のダイサーホモログにより分割されて成熟 *miRNA* を生成する基質である。ヘアピン内、即ちステムの 3' 側上の *miRNA* の位置は *miR172* ファミリーのメンバー全ての間で保存されており、これはこの特定の *miRNA* ファミリーのプロセシングに対する構造上の要求を反映するのかもしれない。21nt の *miR172a* *miRNA* は、よって、これらの遺伝子内で 21nt の同源の (cognate) 配列と RNA 二重鎖を形成することにより AP2 遺伝子のサブセットを制御する能力を有する *miRNAs* のファミリーのメンバーであると予測される。

【 0 1 3 9 】

実施例 3

[0 1 7 4] 当該実施例は、マイクロ RNA 発現と AP2 発現の分析を記載する。

【 0 1 4 0 】

[0 1 7 5] 全 RNA を TRIzol 試薬 (シグマ) を用いて既に関花した野生型及び EAT-D 全植物から単離される。50mg の各 RNA を 15% TBE-尿素標準ゲル (バイオラッド) の電気泳動に供し、ハイボンド-N+フィルターペーパー (アマシャム) 上に TransBlot-SD 装置 (バイオラッド) を用いてエレクトロブロットする。次に、フィルターを一晚 37 °C において UltraHyb-Oligo バッファー (アンピオン) 中で 32P-標識オリゴとハイブリダイズさせる。オリゴは、*miR172a-2* の mRNA のセンス又はアンチセンス鎖の何れかに対応する 30 マーであり、4-5 nt の隣接配列を各サイドに有する。フィルターを 2 回 37 °C において 2X SSC 及び 0.5% SDS を含む バッファー 中で洗浄する。S1 分析に関して、オリゴ (配列番号: 61) (5'-ATGCAGCATCATCAAGATTCTCATATACAT-3') の T4 ポリヌクレオチドキナーゼと 32P を用いた末端標識により、プローブを作成する。S1 反応のハイブリダイゼーションとプロセシングを標準プロトコルを用いて実施する。*miR172a-2* と *miR172a-1* の発生学分析のために、全 RNA を実施例 4 に示された様々なステージ及び組織において、Rneasy キット (キアゲン) を用いて植物から得る。RT-PCR を標準プロトコルを用いて実施し、そして *miR172a-2* に隣接する配列 (配列番号: 62) (5'-GTCGGCGGATCCATGG AAGAAAGCTCATC-3') 及び (配列番号: 63) (5'-CAAGAATCGGATCCAGACTTCAATCAATATC-3') 又は *miR172a-1* に隣接する配列 (配列番号: 64) (5'-TAATTTCCGGAGCCAC GGTCTGT TGTG-3') 及び (配列番号: 65) (5'-AATAGTCGTTGATTG CCGATGCAGCATC-3') に特異的なオリゴを用いる。ACT11 (アクチン) 転写物を増幅するのに用いられたオリゴは: (配列番号: 66) 5'-ATGGCAGATGGTGAGAGACATTCAG-3'、及び (配列番号: 67) 5'-GAAGCACCTTCCTGTG GACTATTGATG-3' であった。AP2 の RT-PCR 分析を花のつぼみからの RNA に実施し、そして以下のオリゴ: (配列番号: 68) 5'-TTTCCGGGCGAGCAGCAACATTTGGTAG-3'、及び (配列番号: 69) 5'-GTTCCGCCCTAAGTTTAAACAAGAGGATTTAGG-3' を利用した。ANT 転写物を増幅するのに用いられたオリゴは: (配列番号: 70) 5'-GATCAACTTCAATGACTAACTCTG GTTTTC-3'、及び (配列番号: 71) 5'-GTTATAGAGAGATTTCATTCTGTTTTCACATG-3' で

10

20

30

40

50

あった。

【0141】

【0176】 AP2のイムノブロット分析を花のつぼみから抽出された蛋白質に実施する。10%SDS-PAGEゲル上の電気泳動の後に、蛋白質をハイボンド(Hybrid)-P膜(アマシャム)に転写して、AP2蛋白質に特異的な抗体(aA-20, サンタクルズバイオテクノロジー)とインキュベートする。ブロットをECL-プラスキット(アマシャム)を用いて処理する。

【0142】

【0177】 miR172a-2 miRNAに対するセンス及びアンチセンス鎖の両方のプロトコルを用いたノーザン分析は、野生型に比較して、EAT-D変異体植物においてははるかに高いレベルにまで蓄積する21-25ヌクレオチドの一本鎖RNAを同定する。野生型において観察される少量の転写物は、おそらくは、miR172a-2 miRNAのみならずそのファミリーメンバーの内生レベルも表し、上記プロトコルとクロスハイブリダイズするのに十分類似している。予測されたmiR172a-2ヘアピンは117ntの長さであり(図1)、少量の約100nt転写物の蓄積がEAT-Dに観察され、これは部分的にプロセシングされたmiR172a-2ヘアピン前駆体を表すらしい。miR172a-2 miRNAのS1ヌクレアーゼマッピングは、Parkら((2002) Curr Biol 12:1484-1495)により報告されたmiR172a-2の5'エンドの独立した確認を提供する。

【0143】

実施例4

【0178】 当該実施例はEATのmiRNA発現における発生パターンを記載する。

【0144】

【0179】 その他のアラビドプシスファミリーメンバーとは異なるmiR172a-2の約100発現パターンに取り組むため、miR172a-2を含む1.4kbのEAT完全長前駆体転写物の断片を特異的に検出するためにRT-PCRを用いる。EAT前駆体転写物の発現は時間的に制御され、発芽の2日後には転写物がほとんど又は全く検出されず、そして植物が開花に達すると進化上より安定な状態の転写物の蓄積が観察される。miR172a-1の前駆体転写物は類似の時間的発現パターンを示す。miR172a-2とMiR172a-2の前駆体転写物は両方共に開花が起きた後も発現され続けて、葉でも花のつぼみでも共に蓄積する。他のmiR172ファミリーメンバーの前駆体の発現は検出されないが、おそらくは、この分析に含まれない組織種におけるそれらの広範囲の発現によるか又はそれらの前駆体転写物が検出するにはあまりに一過性であるためである。miR172a-2及びmiR172a-1に関して観察された時間的発現パターンは、シノラブディスエレガンスにおいて発生の時間を制御する2つのmiRNAs let-7及びlin-4に関して観察されたパターンを暗示する(Feinbaum and Ambros (1999) Dev Biol 210:87-95; Reinhart et al. (2000) Nature 403:901-906)。

【0145】

実施例5

【0180】 公知の開花時間経路内にmiR172を位置付ける試みにおいて、様々な開花時間変異体におけるmiR172のレベルを評価する。miR172のレベルは試験された変異体の何れにおいても変化せず、そしてEAT転写物のレベルは長日で生育した植物対短日で生育した植物にて同一である。

【0146】

実施例6

【0181】 当該実施例は蛋白質発現の評価を記載する。

【0147】

【0182】 イムノブロット分析は、AP2蛋白質がEAT-D変異体において野生型に比較して約3.5倍低下するのに対し、AP2転写物は影響されないことを示す。この

データは *miR172a-2* *miRNA* が翻訳阻害により *AP2* を負に制御することを暗示する。*miR172a-2* の *miRNA* と *AP2* 標的部位の間の予測されたほぼ完全な相補性は、*RNA* 干渉 (*RNAi*) 経路による *AP2* *mRNA* 分割を誘発することが予測される (*Llave et al. (2002) Plant Cell 14:1605-1619; Hutvagner and Zamore (2002) Science 297:2056-2060*)。事実、もっぱら仮想標的に対するそれらのほぼ完璧な相補性のために、多数の植物 *miRNAs* が *RNAi* 経路に侵入することを他者が提案した (*Rhoades et al. (2002) Cell 110:513-520*)。予測された *miT172a-2/AP2* *RNA* 二重鎖内の *GU* 揺らぎ塩基対に関して証拠はないが、*miR172* ファミリーメンバーとそれらの *AP2* 標的の間には全ての予測された二重鎖において保存されている。機構はさておき、*AP2* 発現データ及び *EAT-D* の観察された表現型からは、少なくとも *miR172a-2* が過剰発現されたときには、*AP2* が *miR172a-2* による負の制御の標的であることは明白である。

【0148】

実施例 7

【0183】 初期開花 *EAT-D* 変異体を同定した同じ遺伝子スクリーンにおいて、*LAT-D* と命名された活性化タグ後期開花変異体を同定する。*LAT-D* 変異体は後期開花以外に付加的な表現型を示さず (表 1)、そして後期開花表現型は単一の *T-DNA* 挿入とは互いに分離する (*co-segregates*)。*LAT-D* 中の *T-DNA* の配列分析は、*4X35S* エンハンサーが、*miR172* により制御されることが有力な *AP2* 様標的遺伝子のひとつである *At2g28550* の約 *5 kb* 上流に位置することを示す。*At2g28550* に特異的なプライマーを用いた *RT-PCR* は、この遺伝子に対応する転写物が野生型に比較して *LAT-D* 変異体において高いレベルで事実発現されることを示す。*At2g28550* の過剰発現が後期開花を誘導することを確認するため、全 *At2g28550* コーディング領域を含むゲノミック領域 (開始コドンから停止コドンまで) を *35S* プロモーターに融合し、そしてこの構築物を含むトランスジェニック植物を創製する。トランスジェニック *35S::At2g28550* 植物は野生型よりも遅く開花して、*LAT-D* 変異体よりもわずかに遅い (表 1)。この後期開花表現型は複数の個別の形質転換体において観察される。

【0149】

【0184】 *At2g28550* の過剰発現が後期開花を誘導するという事実は、*miR172* が *At2g28550* をダウン制御することにより開花を一部促進させることを示唆する。しかしながら、*miR172* はその標的遺伝子の転写物の蓄積よりも蛋白質に影響するらしいので、そして *At2g28550* 遺伝子産物に対する抗体は存在しないので、この制御は遺伝的交配により間接的に試験される。*LAT-D* に関してヘテロ接合の植物を *EAT-D* に関してホモ接合の植物と交配させるが、全ての *F1* 子孫が *EAT-D* を 1 コピー含み、そして *F1* 子孫の 50% が *LAT-D* 対立遺伝子を 1 コピー含むようにする。*F1* 子孫を *PCR* により *LAT-D* の存在又は不在に関してスコアし、そして、開花時間に関してもスコアする。*F1* 植物の全部が *LAT-D* 対立遺伝子のコピーを含んだか否かに拘わらず、初期開花であることは、*EAT-D* が *LAT-D* に対して上位であることを示す。この結果は、*EAT-D* において過剰に発現される *miR172a-2* が *LAT-D* において過剰に発現される *At2g28550* を直接ダウン制御するという見解と一致する。

【0150】

実施例 8

【0185】 *At2g28550* 機能を低下させる効果を査定するため、*At2g28550* 遺伝子内に *T-DNA* 挿入物を含む植物を同定する。さらに、*miR172* 標的配列も含む近い同類の (*closely related*) *AP2* 様遺伝子である *At2g28550* の *T-DNA* 変異体を同定する。*At2g28550* 挿入物又は *At5g60120* 挿入物の何れかに関してホモ接合の植物は、野生型に比較してわずかに早く開花す

る(表1)。2つの変異体を交配させ、二重変異体をPCR遺伝子型判定により単離する。A t 2 g 2 8 5 5 0 / A t 5 g 6 0 1 2 0二重変異体は個々の変異体の何れかよりも開花が早い(表1)ことから、当該遺伝子はオーバーラップした機能を有することが示唆される。A t 2 g 2 8 5 5 0 / A t 5 g 6 0 1 2 0二重変異体の初期開花の表現型はm i R 1 7 2 - 過剰発現系の初期開花表現型がA t 2 g 2 8 5 5 0及びA t 5 g 6 0 1 2 0を含むいくつかのA P 2 - 様遺伝子のダウン制御によるという見解と一致する。おもしろいことに、A t 2 g 2 8 5 5 0 / A t 5 g 6 0 1 2 0二重変異体はm i R 1 7 2過剰発現系ほど早くはない(表1のE A T - O X参照)ので、m i R 1 7 2の他のA P 2様標的、例えば、A P 2つのそれ自身又はA t 5 g 6 7 1 8 0も開花時間制御に貢献することが示唆される。a p 2変異体は初期開花ではないから、A P 2による負の開花制御の如何なる可能性のものも、遺伝的重複性により、通常はマスクされるに違いない。

10

【0151】

実施例9

[0186] この実施例は標的の選択方法及び配列番号：3及び44の構築物を用いてm i R N A sを生成するためにD N A構築物をデザインする方法を記載する。以下の方法を用いて生成されたm i R N Aにより、サイレンシングのために興味のあるあらゆる遺伝子を選択することができる。

【0152】

[0187] 1. 標的配列に対する目的の遺伝子の中のコーディング鎖から領域を選択されたい。一般には、停止コドンの約100nt上流の領域である、A P 2 - 様遺伝子中のE A Tにより標的とされる領域に対して類似の位置に見いだされる約10 - 50ヌクレオチドの領域を選択されたい。標的の正確な位置は、しかしながら、必須ではないらしい。~50%GCを有し且つ配列の複雑性が高い領域、即ち繰り返し又は長いポリヌクレオチド域を選択することが薦められる。選択された領域は、相補m i R N AがA又はUで始まるように、T又はAで終わることも薦められる。これは、その二重鎖中でm i R N Aの5'エンドの低い安定性を保証する助けとなる(Schwarz, et al. (2003) Cell 115:199-208)。例えば、m i R 172a - 2前駆体においては、m i R N A配列がAで開始し、その他の多くのm i R N A sはUから開始する。

20

【0153】

[0188] 2. 配列番号：3の構築物を用いるために、21ntの標的領域に相補な21ヌクレオチドの配列を創製されたい(m i R N A)。オプションで、標的配列とGUの揺らぎを生じてE A TにみられるGU揺らぎを模倣するように、m i R N A中のCをTに代えられたい。

30

【0154】

[0189] 3. ヘアピンの21ヌクレオチドの「バックサイド」配列を創製されたい。これは、工程2からのm i R N Aに実質上相補になる。注目すべきは、このバックサイド配列も標的配列に実質上同一になる。一般には、オリジナルのE A Tヘアピン中のバルジに類似したヘアピンのステム中のいくつかのバルジを作成するために、数個のミスマッチを導入されたい。オプションとして、m i R N Aの5'エンドにミスマッチを創製するために、バックサイドの3'エンドにAPを導入されたい。この最後の工程は、その二重鎖ダイサー生成物携帯においてm i R N Aの5'エンドに低い安定性を保証する助けとなるかもしれない(Schwarz et al. (2003) Cell 115:199-208)。

40

【0155】

[0190] 4. E A TのB a m H I / H i n d I I I D N A構築物(配列番号：3)中の21ヌクレオチドのm i R N A配列と21ヌクレオチドの「バックサイド」配列を、工程2及び3からの新規なm i R N Aと「バックサイド」配列で置換されたい。

【0156】

[0191] 5. 工程4からの新規なヘアピンとオリジナルのヘアピンを比較するために、M F O L D (G C G, アクセルリス、サンディエゴ、C A)又は均等なプログラムを

50

使用されたい。一般には、上記配列が実質上オリジナルのヘアピンの構造を複製する（図1）。導入されたバルジは、オリジナルに対して長さ、配列、又は位置が正確に同一である必要がない。ダイサーの予測されたdsRNAの5'及び3'エンドの相対的安定性に関してヘアピン中のmiRNA配列を試験されたい。

【0157】

[0192] 6. BamHI/HindIII断片を創製する指向性ライゲーションを促進するために、BamHI及びHindIII制限部位及び4ヌクレオチドの突出を含む2つの二重鎖断片を生成するため、76-77ヌクレオチドの長さの合成オリゴヌクレオチドを生成されたい。突出のデザインは当業者により実施することができ、本実施例は配列番号：3の79-82位（CCCTA）の4ヌクレオチド領域を用いる。よって、例えば：

10

【0158】

[0193] オリゴ1は、5'エンドに不對のBamHI部位を有することとなり、配列番号：3の78位で終わることになる。

【0159】

[0194] オリゴ2は、5'エンドに79-82位（CCCTA）のヌクレオチドを有することとなり、HindIII部位の直前（又は配列番号：3の151-154位）で終わることになる。

【0160】

[0195] オリゴ3は、オリゴ1に本質的には相補になり（配列番号：3のヌクレオチド5-78）、そしてオリゴ2のヌクレオチド1-4（CCCTA）に相補な4ヌクレオチドで終わることになる。

20

【0161】

[0196] オリゴ4は、オリゴ2に本質的には相補になり、5位のヌクレオチドから始まり、3'エンドのHindIIIで終わることになる。

【0162】

[0197] 次のプラスミド配列とのライゲーション反応において使用される2つの断片を生成するために上記オリゴヌクレオチドをアニールされたい。

【0163】

[0198] オプションに、attB配列を含む2つの合成オリゴヌクレオチドを合成してアニールすることにより、attB-を隣接した（flanked）miRNA前駆体を創製して、のちに、組換えクロニング（GATEWAY, インビトロジェン社、カールスバッド、CA）を用いてベクターに組み込まれる。

30

【0164】

[0199] 7. 工程6からの2つのDNA断片をBamHI/HindIIIにて切断されたプラスミドとの3分子反応においてライゲーションされたい。本実施例は配列番号：44の修飾されたpBluescript SK+プラスミドを用いるが、配列番号：1の1.4kbのEAT配列を含み、BamHI/HindIIIにて消化し、そして標準分子生物学技術を用いて小さい断片からゲル精製される。目的の遺伝子に対して新たにデザインされたmiRNAが、前のmiRNAを置き換えた。

40

【0165】

[0200] attB-隣接配列が工程6から使用されるなら、BPとLRの組換え反応（GATEWAY, インビトロジェン社、カールスバッド、CA）を用いて、完全長のmiR172a-2前駆体を含む指定ベクターに修飾されたヘアピンを挿入することができる。

【0166】

[0201] 8. 要求どおりにあらゆるその他の調製又は修飾に供された、工程7からのプラスミドを用いて、標的のために適した技術を用いて標的生物を形質転換する。

【0167】

[0202] 9. 標的遺伝子のサイレンシングは当業界でよく知られた技術、例えば、

50

ノーザンブロット分析を用いて評価することができ、目的の標的遺伝子がポリペプチドをコードするならイムノブロット分析を用いることができ、標的遺伝子に関連する如何なる表現型上のスクリーンも、例えば、開花時間又は花の形態を用いることができる。

【0168】

実施例 10

【0203】 この実施例で記載されるのは、植物細胞へのポリヌクレオチド又はポリペプチドの導入のために使用される方法である。

【0169】

【0204】 A. トウモロコシ粒子媒介性 DNA デリバリー。

【0170】

【0205】 DNA 構築物を適切な培養培地上で生育できるトウモロコシ細胞に導入することができる。そのようなコンピテント細胞はトウモロコシ懸濁培養液、固形培地上のカルス培養液、新たに単離された未成熟胚又は分裂組織 (meristem) 細胞由来であり得る。Hi-II 遺伝子型の未成熟胚を標的細胞として用いることができる。授粉の約 10 日後に雌穂を回収し、そして 1.2 - 1.5 mm の未成熟胚を種から単離し、そしてトウモロコシ培養培地上に胚盤の側面の下へ (scutellum-side down) 置く。

【0171】

【0206】 未成熟胚を雌穂から回収した 18 - 72 時間後に砲撃する (bombarded)。砲撃前の 6 から 18 時間、未成熟胚を追加の浸透により (with additional osmoticum) 培地上に置く (MS 基礎培地、Musashige and Skoog (1962) Physiol Plant 15: 473 - 497, 0.25 M ソルビトールと共に)。高い浸透圧培地上の胚を砲撃標的として用い、そして砲撃からさらに 18 時間この培地上に放置する。

【0172】

【0207】 粒子の砲撃のために、プラスミド DNA (上記) を標準 CaCl₂ - スペルミジン化学 (例えば、Klein et al. (1987) Nature 327: 70 - 73) を用いて 1.8 mm タングステン粒子上に沈殿させる。各プレートに 600 P S I にて一度砲撃し、デュボンヘリウムガンを用いる (Lowe et al. (1995) Bio/Technol 13: 677 - 682)。トウモロコシ未成熟胚の単離、カルスイニシエーション、カルス増殖、及び植物の再生のために使用された一般の培地の処方に関しては、Armstrong (1994) The Maize Handbook 中、M. Freeling and V. Walbot 編纂、スプリングフェアラグ、NY, pp 663 - 671 を参照。

【0173】

【0208】 粒子砲撃の 1 - 7 日以内に、胚は、3 mg / ml の選択剤ピアラホス (bialaphos) を含む N6 - ベースの培養培地に移動する。胚、及び後のカルスを 2 週ごとに新鮮な選択プレートに移す。未成熟胚から発生した複数のカルス (calli) を所望の表現型に関してスクリーンする。6 - 8 週後に、形質転換された複数のカルスを回収する。

【0174】

【0209】 B. ダイズ形質転換。

【0175】

【0210】 ダイズ胚懸濁培養液を 35 ml の液体培地 SB196 又は SB172 の中に 250 ml のエレンマイヤーフラスコにてロータリーシェーカー上で、150 rpm にて 26°C において冷たい白色蛍光と共に 16 : 8 時間の明 / 暗の光周期にて 30 - 35 u E / m² s の光強度に維持する。培養物は、約 35 mg の組織を 35 ml の新鮮な液体培地に接種することにより、2 週ごとに継代する。あるいは、培養物を 6 - ウェルのコースタープレートにてイニシエートして維持する。

【0176】

【0211】 SB172培地を以下のとおりに調製する：（リットルあたり）。1ボトルのムラシゲスクーグ培地（Duchefa # M 0240）、1mlのB5ビタミン1000Xストック、1mlの2,4-Dストック（ギブコ 11215-019）、60gの蔗糖、2gのMES、0.667gのL-アスパラギン無水物（ギブコBRL 11013-026）、pH5.7。SB196培地は以下のとおりに調製する：（リットルあたり）10mlのMS FeEDTA、10mlのMS硫酸、10mlのFN-ハロゲン鉱物（Lite Halides）、10mlのFN-鉱物P, B, Mo、1mlのB5ビタミン1000Xストック、1mlの2,4-Dストック（ギブコ 11215-019）、2.83gのKNO₃、0.463gの(NH₄)₂SO₄、2gのMES、1gのアスパラギン無水物、粉末（ギブコ11013-026）、10gの蔗糖、pH5.8。2,4-Dストック濃度10mg/mlは以下のとおりに調製する：2,4-Dを0.1NのNaOHに溶解し、フィルター滅菌し、そして-20℃に保存する。B5ビタミン1000Xストックは以下のとおりに調製する：（100mlあたり）-アリコート-20℃にて10gのミオ-イノシトール、100mgのニコチン酸、100mgのピリドキシンHCl、1gのチアミン。

10

【0177】

【0212】 ダイズの懸濁液培養物を、粒子銃砲撃の方法により様々なプラスミドで形質転換する（Klein et al. (1987) Nature 327:70）。砲撃のための組織を調製するため、そのもっとも最近の継代培養以来回収するのに約1から2週を要したほぼ2つのフラスコの懸濁液培養組織を、水分を吸収するのを助けるために底に1枚の滅菌フィルターペーパーを含む60×20mmの滅菌ペトリ皿の中に置く。組織（即ち、懸濁クラスター約3-5mmのサイズ）を、各ペトリプレート等を等しく横切るように広げる。砲撃の前に、残りの液体をピペットで組織から除去するか、又は過剰な水分を除去するために蒸発を許容する。実験あたり、4-6プレートの組織を砲撃する。各プレートを2つのフラスコから作成する。

20

【0178】

【0213】 砲撃のための金粒子を調製するために、30mgの金をエタノール中で洗浄し、遠心分離し、そして0.5mlの滅菌水に懸濁する。砲撃のために使用される各プラスミドの組み合わせ（処理）のため、別のマイクロ遠心分離チューブを用意し、上記のとおりに調製した金粒子を50μlにて開始する。各チューブに、以下も加える；5μlのプラスミドDNA（1μg/μl）、50μlのCaCl₂、及び20μlの0.1Mスペルミジン。この混合物をボルテックスシェーカーで3分間攪拌し、そして次に、マイクロ遠心分離機を14,000RPMにて10秒間遠心分離する。上清をデカントして付着した沈殿DNAを伴う金粒子を2回400μlアリコートのエタノールで洗浄する（各洗浄の間には、上記のとおりに簡単に遠心分離する）。各チューブあたりの100%遠心分離の最終容量を40μlに調節し、そしてこの粒子/DNA懸濁液を、砲撃に使用するまで氷上に放置する。

30

【0179】

【0214】 粒子/DNA懸濁液を適用する直前に、チューブを簡単にソニケーターに浸すことにより、粒子を分散させ、そして次に、5μlのDNA沈殿を各フライングディスクにピペットで移して乾燥させる。次に、フライングディスクをデュボンバイオリステイクSPDS1000/HEに入れる。ダイズ懸濁液クラスターへの粒子媒介性DNAデリバリーのためのデュボンバイオリステイクSPDS1000/HE装置を用いて、以下の設定を用いる。膜破壊圧は1100psiである。チャンバーを27-28インチ水銀の真空間にする。組織を固定/停止スクリーンから約3.5インチ（底から第3の棚（shelf））に置く。各プレートを2回砲撃して、ショットの間に、滅菌スパチュラを用いて組織クラスターを配置し直す。

40

【0180】

【0215】 砲撃後に、組織を液体培養培地に再度懸濁するが、各チューブは新鮮なSB196又はSB172を含む2つのフラスコの間で分割し、上記のとおりに培養する。

50

砲撃の4から7日後に、培地を、選択因子を含む新鮮な培地と取り替える。選択培地は毎週4週間はリフレッシュして、6週目に再びリフレッシュする。細胞密度と培地の濁度が高いなら、4週後の毎週の取り替えが必要かもしれない。

【0181】

[0216] 砲撃の4から8週後に、未形質転換の壊死した胚性クラスターから成長した、緑の形質転換された組織が観察されるかもしれない。単離された緑の組織を取り出し、そして液体培地を含む6 - ウェルのマイクロタイタープレートに接種することにより、クローンから増殖された形質転換胚性懸濁液クラスターを生じさせる。

【0182】

[0217] 各胚性クラスターを選択因子と共に5 mlの新鮮なSB196培地を含むコースター6 - ウェルプレートの一つのウェルに入れる。培養物を、2 - 6週間、2週間後に新鮮な培地に交換しながら維持する。十分な組織が入手できたら、生存する形質転換クローンの一部を、汚染に対する防御のためのバックアップとして第2の6 - ウェルプレートに継代する。

10

【0183】

[0218] インビトロの成熟を促進させるために、形質転換された胚性クラスターを液体SB196から取り出して、固形寒天培地SB166に2週間入れる。2 - 4 mmサイズの組織の凝集物を、プレートあたり10から15クラスターの組織密度にてプレートする。プレートを拡散する弱い光の中で26 + / - 1にてインキュベートする。2週間後に、クラスターをSB103培地へ3 - 4週間継代する。

20

【0184】

[0219] SB166は以下のとおりに調製する：(リットルあたり)、1 pkg, MS塩(ギブコ/BRL - カタログ番号11117 - 017)、1 mlのB5ビタミン1000 Xストック、60 gのマルトース、750 mgのMgCl₂ - 6水和物、5 gの活性炭、pH 5.7, 2 gのゲルライト(gelrite)。SB103培地は以下のとおりに調製する：(リットルあたり)、1 pkg, MS塩(ギブコ/BRL - カタログ番号11117 - 017)、1 mlのB5ビタミン1000 Xストック、60 gのマルトース、750 mgのMgCl₂ - 6水和物、pH 5.7, 2 gのゲルライト。5 - 6週間の成熟後に、胚を、1 cm²部分のSB103を有する100 X 15のペトリ皿に入れることにより、死なずに一部乾燥させることを促進するように十分な湿度を伴うチャンバーを創製して、個々の胚を完全に乾燥させる。

30

【0185】

[0220] 約25の胚をプレートあたり完全に乾燥させる。プレートをパラフィルム数層により密封して、再び弱い光の条件下に置く。乾燥工程の期間は経験的に決定するのが最良であり、プレートあたりに置かれた胚のサイズと量に依存する。例えば、小さな胚又は僅かな胚/プレートは短い乾燥時間を要求し、大きな胚又は多数の胚/プレートは長い乾燥時間を必要とする。約3日後に胚をチェックするのが最良であるが、正確な乾燥は5から7日かかる。胚はこのプロセスの間にサイズが低下する。

【0186】

[0221] 乾燥した胚をSB71 - 1又はMSO培地に植えるが、それらは懸濁液培養に関して記載されたのと同じ条件下で発芽するように放置する。苗木が2つの完全に成長した三つ葉を有する場合、発芽して根が生えた胚を滅菌土壌に移して、MS肥料により給水する。種子を回収して分析するために、植物を成熟するまで発育させる。健康で繁殖力のあるトランスジェニック植物をグリーンハウス内で育てる。

40

【0187】

[0222] SB71 - 1を以下のとおりに調製する：1ボトルのGamborg's B5塩 w/ 蔗糖(ギブコ/BRL - カタログ番号21153 - 036)、10 gの蔗糖、750 mgのMgCl₂ - 6水和物、pH 5.7, 2 gのゲルライト。MSO培地は以下の通りに調製する：1 pkg ムラシゲスケーグ塩(ギブコ11117 - 066), 1 mlのB5ビタミン 1000 Xストック、30 gの蔗糖、pH 5.8, 2 gのゲルラ

50

イト。

【0188】

実施例 11

【0223】 この実施例は、実施例 9 に記載された方法を用いた、トウモロコシ、ダイズ、及び／又はアラビドプシスに見いだされる様々な遺伝子に向けられた miRNA 標的及びヘアピンのデザイン及び合成を記載する。

【0189】

【0224】 A. アラビドプシス AGAMOUS, At4g18960 標的化する。

【0190】

【0225】 配列番号：4 の miRNA 配列を選択してデザインする。当該配列を、配列番号：12 - 15 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、それらを配列番号：44 の BamHI / HindIII バックボーン断片にライゲーションすることにより、BamHI / HindIII ヘアピンカセットに入れる。

10

【0191】

【0226】 アラビドプシスサリアナ Col-0 を実施例 1 のとおりに形質転換して生育させる。配列番号：4 の miRNA を含むベクターにより形質転換した後に、88 % の形質転換体は変異体 AGAMOUS (ag) 花表現型を呈し、渦巻き 3 の中の雄蕊の花弁への転化、及び渦巻き 4 の中の心皮の別な ag 花への転化により特徴付けられる (Bowman, et al. (1991) The Plant Cell 3: 749 - 758)。変異体の表現型は形質転換体の間で変動し、約 1 / 3 が強い ag 表現型を呈し、1 / 3 が中間の ag 表現型を呈し、そして 1 / 3 が弱い ag 表現型を呈する。形質転換体から単離された小 RNAs のゲル電気泳動及びノーザンブロット分析は、変異体 ag 表現型の程度が直接に抗 AG miRNA のレベルに関連することを証明し、もっとも強い表現型はプロセッシングを受けた miRNA の最大の蓄積を有する (約 21 nt)。

20

【0192】

【0227】 B. アラビドプシス Apetela3 (AP3)、At3g54340 を標的化する。

【0193】

【0228】 AP3 からの 2 つの miRNA 標的を選択してオリゴヌクレオチドをデザインする。

30

【0194】

【0229】 配列番号：5 の miRNA 配列を選択してデザインする。当該配列は、配列番号：16 - 19 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、それらを配列番号：44 の BamHI / HindIII バックボーン断片にライゲーションすることにより、BamHI / HindIII ヘアピンカセットに入れる。

【0195】

【0230】 配列番号：6 の miRNA 配列を選択してデザインする。当該配列は、配列番号：20 - 23 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、それらを配列番号：44 の BamHI / HindIII バックボーン断片にライゲーションすることにより、BamHI / HindIII ヘアピンカセットに入れる。

40

【0196】

【0231】 アラビドプシスサリアナ Col-0 を実施例 1 のとおりに形質転換して生育させる。配列番号：5 の miRNA を含むベクターによる形質転換の後に、形質転換体は新規の葉及び花の表現型を有するが、如何なる変異体 AP3 表現型も呈さない。形質転換体からの 2 週齢の古いロゼット葉組織から単離された RNA のゲル電気泳動及びノーザン分析は、プロセッシングを受けた miRNA (約 21 nt) のもっとも高い蓄積が、新規の葉及び花の表現型を生じるために別の標的配列を明らかに沈黙化させる、前駆体の「バックサイド」鎖に対応することを示す。

【0197】

【0232】 新規な標的配列が選択され、miRNA 標的鎖が RISC への取り込みの

50

間を選択されるための正確な対称性を伴う (Schwartz et al. (2003) Cell 115: 199 - 208)。配列番号: 6 の miRNA 配列を選択してデザインする。当該配列を BamHI / HindIII ヘアピンセットに入れるが、配列番号: 20 - 23 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、配列番号: 44 の BamHI / HindIII バックボーン断片にそれらを連結することによる。花の表現型及び電気泳動の分析により示されるとおり、90% を超える形質転換体が AP3 遺伝子に関してサイレンシングを示す。約 21 nt の miRNA (抗 AP3 b) がトランスジェニック植物中で高レベルにて検出され、野生型対照植物においてはされない。RT-PCR 分析は、AP3 転写物の量が野生型対照植物に比較して形質転換体において減少したことを証明した。

10

【0198】

[0233] C. トウモロコシフィトエンデサチュラーゼの標的化

【0199】

[0234] フィトエンデサチュラーゼ (PDS) 由来の 2 つの miRNA 標的を選択してオリゴヌクレオチドをデザインする。

【0200】

[0235] 配列番号: 7 の miRNA 配列を選択してデザインする。当該配列を BamHI / HindIII ヘアピンセットに入れるが、配列番号: 24 - 27 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、配列番号: 44 の BamHI / HindIII バックボーン断片にそれらを連結することによる。

20

【0201】

[0236] 配列番号: 8 の miRNA 配列を選択してデザインする。当該配列を BamHI / HindIII ヘアピンセットに入れるが、配列番号: 28 - 31 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして配列番号: 44 の BamHI / HindIII バックボーン断片にそれらを連結することによる。

【0202】

[0237] D. トウモロコシフィチン酸生合成酵素の標的化

【0203】

[0238] 3 つのトウモロコシフィチン酸生合成酵素遺伝子標的を選択して miRNA 及びオリゴヌクレオチドをデザインする。イノシトール 3 リン酸キナーゼ - 2 ポリヌクレオチドは、PCT 国際公開出願番号 WO 02 / 059324 に開示されており、引用により本明細書に編入される。イノシトール 1, 3, 4 - 3 リン酸 5 / 6 キナーゼポリヌクレオチドは、PCT 国際公開出願番号 WO 03 / 027243 に開示されており、引用により本明細書に編入される。ミオ - イノシトール 1 - リン酸シンターゼポリヌクレオチドは、PCT 国際公開出願番号 WO 99 / 05298 に開示されており、引用により本明細書に編入される。

30

【0204】

[0239] イノシトールポリヌクレオチドキナーゼ - 2 (IPPK2)

【0205】

[0240] 配列番号: 9 の miRNA 配列を選択してデザインする。当該配列を BamHI / HindIII ヘアピンセットに入れるが、配列番号: 32 - 35 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、配列番号: 44 の BamHI / HindIII バックボーン断片にそれらを連結することによる。

40

【0206】

[0241] イノシトール 1, 3, 4 - 3 リン酸 5 / 6 キナーゼ - 5 (ITPK5)

【0207】

[0242] 配列番号: 10 の miRNA 配列を選択してデザインする。当該配列を BamHI / HindIII ヘアピンセットに入れるが、配列番号: 36 - 39 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、配列番号: 44 の BamHI / HindIII バックボーン断片にそれらを連結することによる。

50

【 0 2 0 8 】

[0 2 4 3] ミオ - イノシトール 1 - リン酸シンターゼ (m i l p s)

【 0 2 0 9 】

[0 2 4 4] 配列番号 : 1 1 の m i R N A 配列を選択してデザインする。当該配列を B a m H I / H i n d I I I ヘアピンカセットに入れるが、配列番号 : 4 0 - 4 3 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、配列番号 : 4 4 の B a m H I / H i n d I I I バックボーン断片にそれらを連結することによる。

【 0 2 1 0 】

[0 2 4 5] E . ダイズ A p e t e l a 2 - 様配列 (A P 2) の標的化

【 0 2 1 1 】

[0 2 4 6] アラビドプシスの形質転換に用いられた、配列番号 : 1 を含む、同じ E A T (m i R 1 7 2 a - 2) 構築物を用いてダイズを形質転換する。この構築物は、配列番号 : 4 8 の m i R N A をコードする m i R N A 鋳型配列を有する。当該構築物は、アラビドプシスからの m i R 1 7 2 a - 2 前駆体配列の P C R 増幅、制限消化、及びライゲーションを用いて実施例 2 に記載されたとおりに創製される。

【 0 2 1 2 】

[0 2 4 7] 本質的には実施例 1 0 に記載されたとおりに、ダイズ組織を形質転換して生育させる。萼から葉への転化により特性決定されたところによれば、形質転換後、4 2 % の形質転換体に変異体の表現型を呈する。もっとも強い表現型を呈する植物は不稔性であり、種子を生産しない。器官のホメオティックな転化と稔性に対する効果の両方が、アラビドプシスにおける a p 2 変異体対立遺伝子に関して観察されたのと類似する。m i R 1 7 2 a - 2 に対するオリゴヌクレオチドプローブアンチセンスにより釣り上げられた、小 R N A ゲル電気泳動及びノーザン分析は、トランスジェニック系列における m i R 1 7 2 の蓄積を示す。少量の内生ダイズ m i R 1 7 2 は、ダイズ対照系列においても検出される。変異体表現型の程度は m i R N A のレベルに直接関連し、もっとも強い表現型はプロセシングされた m i R N A (約 2 1 n t) のもっとも高い蓄積を示す。

【 0 2 1 3 】

[0 2 4 8] F . アラビドプシス A P 2 - 様遺伝子の標的化

【 0 2 1 4 】

[0 2 4 9] 配列番号 : 7 2 の m i R N A 配列を選択してデザインする。当該配列を a t t B ヘアピンカセットに入れるが、配列番号 : 7 3 - 7 4 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、B P 組換え反応 (G A T E W A Y) を実施することにより a t t L 中間体を生成することによる。この中間体を L R 反応において用いることにより、a t t R 部位を含み、ヘアピンの代わりに負の選択マーカを含む E A T - 完全長前駆体を含む、実施例 1 2 に一般化して記載された目的のベクターと組換える。この反応の生成物は、a t t R 部位を隣接した m i R 1 7 2 a - 2 前駆体ヘアピンカセットを含む (即ち、ヘアピンがマーカースセットを置き換える) 。

【 0 2 1 5 】

[0 2 5 0] G . アラビドプシス脂肪酸デサチュラーゼ (F A D 2) の標的化

【 0 2 1 6 】

[0 2 5 1] 配列番号 : 7 5 の m i R N A 配列を N M _ 1 1 2 0 4 7 (A t 3 g 1 2 1 2 0) の配列に基づいて選択してデザインする。当該配列を a t t B ヘアピンカセットに入れるが、配列番号 : 7 6 - 7 7 の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、B P 組換え反応 (G A T E W A Y) を実施することにより a t t L 中間体を生成することによる。この中間体を L R 反応において用いることにより、a t t R 部位を含み、ヘアピンの代わりに負の選択マーカを含む E A T - 完全長前駆体を含む、実施例 1 2 に一般化して記載された目的のベクターと組換える。この反応の生成物は、a t t R 部位を隣接した F A D 2 の m i R N A 前駆体ヘアピンカセットを含む (即ち、ヘアピンがマーカースセットを置き換える) 。抗 - F A D 2 の m i R N A の効果は、脂肪酸プロファイルにおける変化を測定するための脂肪酸分析において決定することができ、例えば、引用により本明細書に編入

10

20

30

40

50

される、Wu et al. (1997) Plant Physiol. 113:347-356を参照されたい。

【0217】

【0252】 H. アラビドプシスフィトエンデサチュラーゼ (PDS) の標的化

【0218】

【0253】 配列番号：78のmiRNA配列をNM_202816 (At4g14210)の配列に基づいて選択してデザインする。当該配列をattBヘアピンカセットに入れるが、配列番号：79-80の合成オリゴヌクレオチドをアニールして、BP組換え反応 (GATEWAY)を実施することによりattL中間体を生成することによる。この中間体をLR反応において用いることにより、attR部位を含み、ヘアピンの代わりに負の選択マーカを含むEAT-完全長前駆体を含む、実施例12に一般化して記載された目的のベクターと組換える。この反応の生成物は、attR部位を隣接したPDSのmiRNA前駆体ヘアピンカセットを含む (即ち、ヘアピンがマーカカセットを置き換える)。抗PDS構築物を含むトランスジェニック植物は、系列の約90%より多くにおいて発芽に際して光漂白される (photobleached) ことから、PDSのサイレンシングが示唆される。

10

【0219】

実施例12

【0254】 この実施例は、組換えクローニング技術を用いた発現ベクターの構築を記載する。

20

【0220】

【0255】 実施例2に記載されたベクターの配列 (配列番号：44)を修飾して、att組換え部位を組み込むことにより、GATEWAY技術 (インビトロジェン、カールスバッド、CA)を用いた組換えクローニングを促進させる。BamHI/HindIIIセグメントを、以下の順で含む配列：attR1-CAM-ccdB-attR2で置き換える。miRNAヘアピン前駆体構築物を隣接したattB部位を含むオリゴによる組換え (BP+LR)に際して、選択可能なマーカをmiRNAヘアピン前駆体で置き換える。

【0221】

実施例13

30

【0256】 この実施例、特に表5は、実施例で記載されたmiRNAサイレンシングに用いられた標的配列及びオリゴを要約する。

【0222】

【表 5】

表 5

生物	標的遺伝子	miRNA 名	miRNA 鋳型	前駆体オリゴ配列番号
アラビドプシス	AP2-様	miR172-a2	配列番号:86	55-56 (PCR)
	なし	EATdel	なし	57-60
	AGAMOUS	抗 AG	配列番号:4	12-15
	APETELA3 (a)	抗 AP3a	配列番号:5	16-19
	APETELA3 (b)	抗 AP3b	配列番号:6	20-23
トウモロコシ	PDS1	抗 PDS1	配列番号:7	24-27
	PDS2	抗 PDS1	配列番号:8	28-31
	IPPK2	抗 IPPK2	配列番号:9	32-35
	ITPK5	抗 ITPK5	配列番号:10	36-39
	MI1PS	抗 MI1PS	配列番号:11	40-43
ダイズ	AP2-様	miR172a-2	配列番号:86	55-56 (PCR)
アラビドプシス	AP2-様	miR172a-2	配列番号:72	73-74
	FAD2	抗 FAD2	配列番号:75	76-77
	PDS	抗 AtPDS	配列番号:78	79-80
トウモロコシ	miR172b	miR172	配列番号:92	91
	PDS	抗 ZmPDS	配列番号:95	94

【 0 2 2 3 】

実施例 1 4

【 0 2 5 7 】 この実施例は、トウモロコシの mi R 1 7 2 前駆体の同定と単離を記載する。

【 0 2 2 4 】

【 0 2 5 8 】 ナショナルキャンサーフォーバイオテクノロジーインフォメーション (N C B I) のゲノムサーベイシークエンス (G S S) データベースを、21ntのmi R 1 7 2 a - 2 配列を用いて検索することにより、mi R 1 7 2 前駆体配列を含むゲノミックトウモロコシ配列を同定する。いくつかのトウモロコシmi R 1 7 2 前駆体を同定し、そしてmi R 1 7 2 e (配列番号 : 8 1 - 8 5) と命名し、表 6 に要約される。各配列をベクターNTI (インビトロジェン、カールスバッド、C A) に引き入れ、コンティグの分析を行った。当該分析は、4つの異なる座を同定したが、各々が唯一のコンセンサス配列を有した。各座からのmiRNA配列を取り囲む約200ヌクレオチドの領域を、RNA構造ソフトウェアを用いて二次構造フォールディングに関して試験する (引用により本明細書に編入される Mathews et al . (2 0 0 4) Proc Natl Acad Sci USA 1 0 1 : 7 2 8 7 - 7 2 9 2) 。この分析の結果は、トウモロコシの配列mi R 1 7 2 a - e の各々のヘアピン前駆体を明らかにする。

【 0 2 2 5 】

【 表 6 】

表 6

トウモロコシ miR172 前駆体とヘアピンの位置、及び miRNA 二重鎖成分

前駆体	NCBI ID	トウモロコシ系列	配列番号:	長さ	ヘアピン	バックサイド	miRNA
miR172a	CG090465	B73	81	907	508-598	512-532	574-594
miR172b	BZ40152 及び BZ4011525	B73 (両方)	82	1128	551-654	567-587	620-640
miR172c	CG247934	B73	83	912	230-400	250-270	364-384
miR172d	CG09786 及び BZ972414	B73	84	1063	351-520	361-381	466-486
miR172e	CG06588 及び CC334589	B73 (両方)	85	1738	913-1072	931-951	1033-1053

10

【 0 2 2 6 】

20

【 0 2 5 9 】 B 7 3 ゲノミクトウモロコシライブラリーからの m i R 1 7 2 a 又は m i R 1 7 2 b を増幅するためにオリゴヌクレオチドをデザインし、これらのプライマーはクローニングを促進させるために制限酵素認識部位も追加する (B a m H I 又は E c o R V) 。あるいは、組換えクローニングのために a t t 部位を創製するためにデザインされた P C R プライマーを使用することができる。P C R 増幅の後に、生成物を単離し、精製し、そして配列分析により確認する。確認したら、これらの配列を、トウモロコシのユビキチン (U B I) プロモーターを含む構築物に挿入する。この構築物をさらなる形質転換ベクター構築物のために使用することができ、例えば、a t t 部位の添加により、G A T E W A Y システムを使用することができる。

【 0 2 2 7 】

30

【 0 2 6 0 】 以下の P C R プライマーを用いて、トウモロコシ m i R 1 7 2 a のヘアピン前駆体を含む配列を増幅する
 フォワードプライマー (配列番号 : 8 7) : 5 ' G G A T C C T C T G C A C T A G T G G G G T T A T T 3 '
 リバースプライマー (配列番号 : 8 8) : 5 ' G A T A T C T G C A A C A G T T T A C A G G C G T T 3 '

【 0 2 2 8 】

【 0 2 6 1 】 以下の P C R プライマーを用いて、トウモロコシ m i R 1 7 2 b のヘアピン前駆体を含む配列を増幅する
 フォワードプライマー (配列番号 : 8 9) : 5 ' G G A T C C C A T G A T A T A G A T G A T G C T T G 3 '
 リバースプライマー (配列番号 : 9 0) : 5 ' G A T A T C A A G A G C T G A G G A C A A G T T T T 3 '

40

【 0 2 2 9 】

実施例 1 5

【 0 2 6 2 】 この実施例は、トウモロコシの m i R 1 7 2 b の m i R N A 前駆体を用いる使用のための、トウモロコシに見いだされる様々な遺伝子標的物に向けられた m i R N A 標的物及びヘアピンのデザインと合成を記載する。

【 0 2 3 0 】

【 0 2 6 3 】 A . トウモロコシにおける m i R 1 7 2 b 標的物

50

【0231】

【0264】 アラビドプシスのEATの実施例と同様に、トウモロコシのmiR172bヘアピン前駆体をトウモロコシにおける過剰発現に関して試験する。miRNA鋳型を含む前駆体配列は、配列番号：91に示される。当該miRNAは配列番号：92に示され、miRNA二重鎖のバックサイドは配列番号：93に示される。当該miRNA前駆体及びBamHIとKpnIのための制限酵素突出を含む二重鎖DNA分子を、配列番号：97及び98のオリゴヌクレオチドをアニールすることにより創製する。

【0232】

【0265】 B.フィットエンデサチュラーゼ(PDS)

【0233】

【0266】 miRNA鋳型を含むオリゴヌクレオチドは配列番号：94に示される。PDSに向けられたmiRNAは配列番号：92に示され、miRNA二重鎖のバックサイドは配列番号：93に示される。当該miRNA前駆体及びBamHIとKpnIのための制限酵素突出を含む二重鎖DNA分子を、配列番号：99及び100のオリゴヌクレオチドをアニールすることにより創製する。

【0234】

【0267】 この実施例のオリゴヌクレオチドを、制限消化及びライゲーション、及び/又は組換えクローニング、例えばGATEWAYを含む標準クローニング技術を用いて、トウモロコシの形質転換のためにベクターに挿入することができる。

【0235】

実施例16

【0268】 この実施例は、実施例17-19に使用された材料と方法を記載する。

【0236】

【0269】 プラスミド構築物

【0237】

【0270】 アラビドプシスのmiR159aの全配列を含む276塩基対の断片(以下参照)をPCR増幅法によりプライマーCACCC-miR159a-prec:配列5' CACCCACAGTTTGTCTTATGTCGGATCC 3'(配列番号:101)及びmiR159a-Xma:配列

【0238】

【化1】

5' TGACCCCGGGATGTAGAGCTCCCTTCAATCC 3'

(配列番号:102)

を用いてクローン化した。miR159a-Xmaは、成熟miR159aの21ヌクレオチドのうちの18(太字)及び導入されたXmaI部位(イタリック)を含む。当該PCR断片を、pENTR-miR159a-precを得るための製造者の指示書に従い、pENTR/SD/D-TOPOベクター(インビトロジェン)にクローン化した。

【0239】

【0271】 Gateway組換えシステムを用いて、pre-miR159a配列を植物用二元ベクターpK2GW7に移したが、当該ベクターはpK2-pre-miR159aを生成するために35Sプロモーターを2コピーとNOSTターミネーターを含む。

【0240】

【0272】 pre-miR159aの変異導入はPCRにより以下のオリゴヌクレオチドを用いて実施した。

【0241】

【0273】 5'-miR-PDS^{159a};

【0242】

10

20

30

40

【化2】

5' ATAGATCTTGATCTGACGATGGAAGAAGAGATC
CTAAC T TTTCAA 3' (配列番号: 103; このオリゴヌクレ
オチドは天然のBglI部位 (イタリック) とmiR-PDS^{159a*}配列 (太字)
を含む)。

【0243】

[0274] 3' - miR - PDS^{159a} ;

【0244】

【化3】

10

5' TGACCCGGGATGAAGAGATCCCATATTTCCAAA
3' 配列番号: 104; 入手可能なニコチアナベンサミアナのPDS mRNA
部分配列に基づき (ジェンバンクAJ571700, 以下参照)、このオリゴヌク
レオチドはmiR159a配列中に点変異 (太字) を含むことにより、PDS m
RNA配列に対するその相補性を増加させる。

【0245】

[0275] 上記のプライマーとpENTR-miR159a-prec DNAを鋳
型として用いたmiR159a前駆体のPCR増幅は、MgII及びXmaIにより消
化されて再びpENTR-pre-miR159aに挿入されたDNA断片を生じ、pE
NTR-pre-miR-PDS^{159a}を生じた。Gatewayシステムの手法を再
び用いて、miR-PDS^{159a}前駆体をpK2GW7に移して、pK2-pre-m
iR-PDS^{159a}を生じさせた。

20

【0246】

[0276] miR-PDS^{169g}を以下のとおりクローン化した。miR169g
配列を含む222塩基対のアラビドプシスゲノミック断片 (以下参照) を、プライマーm
iR169g-F 5' CACCAATGATGATTACGATGATGAGAGATC
3' (配列番号: 105) 及びmiR-Rev 5' CAAAGTTTGTACG
ATTTCATGA 3' (配列番号: 106) を用いて増幅した。結果のPCR断片をp
ENTR/D-TOPOベクター (インビトロジェン) に挿入することにより、pENT
R-pre-miR169gを生成した。pre-miR169g配列を次に二元ベクタ
ーpBADC及びpB2GW7にガラクトシダーゼシステムを用いて移すことにより、p
BA-pre-miR169g及びpB2-pre-miR169gを生じさせた。

30

【0247】

[0277] 2つのmiR-PDS^{169g}前駆体を、pENTR-pre-miR1
69gを鋳型として及びストラタジーンからのクイックチェンジミュータジェネシスキッ
トを用いて創製した。pENTR-pre-miR-PDSa^{169g}を以下のオリゴヌ
クレオチドを用いて作成した:

【0248】

[0278] miR169^{PDSa}: 5' GAGAAATGAGGTTTGAGTTT A
GTCTGACTTGGCCAGTTTTTTT A CCAATG 3' 配列番号: 1
07), 及び

40

【0249】

[0279] miR169^{PDSa*}: 5' CTGATTCTGGTGTTGGC
CAAGTCA GACTAAACTCTGTTTCC TTCTC 3' (配列番号:
108)。

【0250】

[0280] pENTR-pre-miR-PDSb^{169g}を生成するのに用いたオ
リゴヌクレオチドは:

【0251】

50

[0281] miR169^{PDSb}: 5', GAG AATGAGGTTGATCTCTTTCCAGTCTTTCAGGGTTTTTTTAA CCAATG 3' (配列番号: 109)、及び

【0252】

[0282] miR169^{PDSb*}: 5', GATTCTGGTGTCCTGAAGACTGGAAAGAGATCTGTTTTCCTT CTCTTTC 3' (配列番号: 110)。

【0253】

[0283] 上記の2つの変異導入されたmiR-PDS^{169g}前駆体を次に植物二元ベクターpBADc及びpB2GW7に移すことにより、pBA-pre-miR-PDSa^{169g}, pB2-pre-miR-PDSa^{169g}; pBA-pre-miR-PDSb^{169g}及びpB2-pre-miR-PDSb^{169g}を生じさせた。

【0254】

[0284] ニコチアナベンサミアナrbcs転写物を標的とする人工のmiRNAsの前駆体(pENTR-pre-miR-rbcs^{159a}-A)を、pENTR-miR-PDS^{159a}に関して記載されたのと類似の手法を用いて、以下のプライマーを使用して生成し、そしてpK2GW7にクローン化した:

【0255】

[0285] MrbcsA-S: 5', TCTGACGATGGAAGTTCTCTCGCCCGACATTTCGAAAATGAGTT GA 3' (配列番号: 111)、及び

【0256】

[0286] MrbcsA-R: 5', AAACCCGGGATGTTCTCTCGCCCGGAATTTCGAAAAGAGAGTAA AAG 3' (配列番号: 112)。

【0257】

[0287] 全てのクローン化された配列はDNA配列決定により確認した。

【0258】

[0288] 用いられた前駆体配列

【0259】

[0289] miR159a前駆体鋳型配列(276bp)

【0260】

【化4】

ACAGTTTGCTTATGTCGGATCCATAATATATTTGAC
AAGATACTTTGTTTTTTCGATAGATCTTGATCTGACG
ATGGAAGTAGAGCTCCTTAAAGTTCAAACATGAGT
TGAGCAGGGTAAAGAAAAGCTGCTAAGCTATGGATC
CCATAAGCCCTAATCCTTGTAAGTAAAAAAGGATT
TGGTTATATGGATTGCATATCTCAGGAGCTTTAACT
TGCCCTTTAATGGCTTTTACTCTTC TTTGGATTGA
AGGGAGCTCTACATCCCGGGTC (配列番号: 113)

(クローン化されたpre-miR159aの配列。miR159a*とmiR159a(イタリック)の配列を太字で示す。miR-PDS^{159a}において変化したヌクレオチドに下線を引く。)

【0261】

[0290] miR-159a成熟鋳型

5' TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA 3' (配列番号: 114)

【0262】

[0291] miR-PDS^{159a}成熟鋳型

5' TTTGGAAaAtAGGGA tCTCTt 3' (配列番号: 115)

【0263】

[0292] miR169g 前駆体鋳型配列 0.3 kb (222 bp)

【0264】

【化5】

AATGATGATTACGATGATGAGAGTCTCTAGTTGTAT
 CAGAGGGTCTTGCATGGAAGAATAGAGAATGAGGTT
GAGCCAAGGATGACTTGCCGGGTTTTTTTACCAAT
 GAATCTAATTAAGTATGATTCTGGTGTCCGGCAAGTT
GACCTTGGCTCTGTTTCCTTCTCTTTTGGATG
 TCAGACTCCAAGATATCTATCATCATGAATCGTGAT
 CAAACTTTG (配列番号: 116)

10

(クローン化された pre-miR169g 断片の配列 (0.3 kb)。miR169g (イタリック) と miR169g* の配列を太字で示す。miR-PDS^{169g} において変化したヌクレオチドに下線を引く。)

【0265】

[0293] miR169g 成熟鋳型

5' GAGCCAAGGATGACTTGCCGG 3' (配列番号: 117)

【0266】

[0294] miR-PDSa^{169g} 成熟鋳型

5' GAGtttAGtcTGACTTGgCca 3' (配列番号: 118)

【0267】

[0295] miR169g 成熟鋳型

5' GAGCCAAGGATGACTTGCCGG 3' (配列番号: 119)

【0268】

[0296] miR-PDSb^{169g} 成熟鋳型

5' GAtCtcctttccagtcTtCaGG 3' (配列番号: 120)

【0269】

[0297] miR169g 前駆体鋳型配列 2.0 kb (2474 bp)

【0270】

20

30

【化 6】

AAGCTTTGATCTTTAGCTCTTTGCCAAAGCTTCTTTTGATTTTTCTATTTCTCTAATCTATCCATTGACCAT
 TTGGGGTGATGATATTCTTCAATTTATGTTGTTGTTTATTGCCCATCCACAGACCCACGTTTGATTTGTTTA
 ATCAAAATATATAAACTGACAGTTGTGCCACTAGTCACTTGCCAATTAAGCATTCCAAAGCTCCTTCCTTTA
 CATTAGTATCAAGTGAGACTAGCACAAAGCTTTTAAGTCCAGATAAAAAAGCCCCATGGAAGGGAAGCTTTCAA
 GAACGAGATTTAACCGTAAAACCCAATTTTCGATTTCCGCTAATAATTTGGATCCAAAAATCTAGACAAAATC
 TGATAAAATTAGACAAAGAAATGGATAAAACCCCAAAACCCATAATCGTCGTTGTTCTTGTTTGCTTCAATA
 TCACTCTTTCCCTCCAACGAGTTAGTTAGAGTGACGTGGCAGCTGAACTAGATTGGAGTAACGGGATAGA
 TTACCCATAAAGCCCAATAATGATCATTACGTGAGACATAACTTGCTTAGATAACCTCATTATGGGCTTA
 GATGGGGTCTCTAGTGTTAGTCATAAGCTCTTAAATACCATTTCTAGTTATATATCAATCTTAGCTTGGA
 TTGGATCGTTGTCCTATAGTAAAAAACTTTTACTATTTTATGTTAGCAATCCACTTAACATTCAATATGT
 TTAAATGAAAGAGTTTACCAAAAGGAAAGAAAAAAGGTTGGTAATGAATTTATCTAATCGGATACGATAT
 TTCATAATCTAATGATGGGATCTATCAATAATAGAATCAAAGTTAACTTTAACGCTTTTGTTACCTGTTTT
 CTTTCTTTAGCAATTAATATTAACGAGTTTGTAGTAATATAAATATGTTTCCAGTTATATACCAAACCTTAT
 GTAATATTCATAAGCTTGCCAAAATTTACAAGAGTTTTTGAACGCGCACAAAATTCATATATTTCTTAC
 CCAAAAATAAATTTTTTTTTTTTTTACTTGTTATAATCCTATATGAACATTGCTCATCTTCCCCATTG
 ATGGTAATTTTTCTATTCCTATATGTAATTAATCCTAATAATGAAATTGAAAACATAATTTGAAGATAAT
 CAATCCTAATATCTCCGCTTAGATCTATTTAAATGGTCTTATTTAATTTCTATATTTTGGCCTAATTAT
 TTATTTGATATAGTGAATTTATGGAAGCTTCATGTTGATGGAATAAAACCGGCTTATCCCAATTAATCGATC
 GGGAGCTATAACACAAATCGAACTCTAGTAGCTATAAAGAGTGTGTAATAGCTTTGGATCACATGTATTAC
 TATTTATTTACTAGCTCGTGCAACAATTGGCTTTGGGAAAAATTTATTTACTAGTACTCCCCCTTACAAT
 GTGATGAGTCTCCAAATGATATATTCTCAACCCAAAGGACAATCTGAAATTTTCAATATATATTCCATTTTA
 TCCGCAACATTTGAAATTTGTGGCAATGTTTTTAAAAAGACTATTTATAAAGAATCTTCTAAATTTGTTCT
 ACGACAATCGATAACACCTTTTGTGATCAACCCACACAAGACTATGATTCCAATCCTAAGAAACATACGA
 CACGTGGATTTTTATGTCACACTAGTACGATGCGTCGATGCCTTCAGAGTACGAATATTATTCACATAAAAT
 TCTTATTCGAATTTGATAATATAAGGTCAGCCAATCTTTTAAAGTAATTATTTCTTCAATATACGGTTGTG
 GTCAAAATTCATTTTATTTGTAGCTTGCATGCACTACTAGTTTAAACCATGCATGGATTTATTGCATAT
 AATAACATTATATGAATTTCAATTAATTAATCCACACATTTCCCATTTCAATATGCCTATAAATACCTTC
 ATCACGAGTATGACAAGATCACAAGACAAGAAAAAGGAGTAGAGAAAACATGATAATGATGATTACGATGA
 TGAGAGTCTCTAGTTGTATCAGAGGTCTTGATGGAAGAATAGAGAATGAGGTT **GAGCCAAGGATGACTT**
GGCGGTTTTTTTACCAATGAATCTAATTAAGTCTGTTGTTGTCGGCAAGTTGACCTTGGCTCTGTTTC
 CTTCTCTCTTTTGGATGTCAGACTCCAAGATATCTATCATCATGAATCGTGATCAAACCTTTGTAATTCAT
 TGAAATGTTGTTTTCTTGATGCGAATTTTTTGGCTTACGGTTTTTCGATTTGAATGATCAGATTTTTGTTTT
 TGCACCTAACTATAGTTTCACTTAGGTTCTATTTTTTTCAGGTTTATGAATGATAAAACAAGTAAGATTTT
 ATGCTAGTTTATGTTCAATTTTCGATTCAAATCAAACATCTTGGTTTTGGTTTTAGTTAAGTTTGATTTTTC
 AAGTCAAATGCTATGTTTTCTTGT (配列番号: 121)

10

20

30

40

(クローン化された pre-miR169g 断片の配列 (2.0 kb)。miR169g (イタリック) と miR169g* の配列を太字で示す。)

【0271】

[0298] 用いられた標的遺伝子配列:

【0272】

[0299] ニコチアナベンサミアナPDS配列:

【0273】

[0300] 5'エンドプローブ配列 (Le-PDSの1-268位に対応、図15A参照):

50

ATGCCTCAAATTGGACTTGTCTTCTGCTGTTAACTTTGAGAG
 TCCAAGGTAGTTTCAGCTTATCTTTTGGAGCTCGAGGTCGTC
 TTCTTTTGGGAACCTGAAAGTTCGAGATGGTTTGCTTGC AAAGG
 AATTCGTTATGTTTTTGTCTGGTAGCGAATCAATGGGGTCATA
 AGTTTAAAGATTTCGTACTCCCCATGCCACGACCAAGAGATT
 GGTTAAAGGACTTGGGGCCCTTTAAAGGTCGTATGCATTGAT
 TATCCAAGACCAAGAGCTGGACAATACAG (配列番号: 122)

【0274】

[0301] 部分的な5' RACE断片。部分的なニコチアナベンサミアナPDS配列
 (ジェンバンクAJ571700)からの集合した配列と5' RACE実験(Le-PDS
 の858-1514位に対応、図15A参照)。

10

【0275】

【化7】

GGCACTCAACTTTTATAAAACCCTGACGAGCTTTTCGAT
 GCAGTGCATTTTGTATTGCTTTGAACAGATTTCTTCA
 GGAGAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTTTAGATGG
 TAACCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGA
 ACATATTGAGTCAAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAA
 ACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGAT
 GGAAGTGTCAAATGTTTTTATACTGAATAATGGCAGT
 ACAATTAAAGGAGATGCTTTTTGTGTTTGCCACTCCA
 GTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTTG CCTGAAGACTG
GAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAGAAGC
 TAGTGGGAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGGT
 TTGACAGAAAACCTGAAGAACACATCTGATAATCTGC
 TCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTG
 ACATGTCTGTTACATGTAAGGAATATTACAACCCCA
 ATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCAG
 AAGAGTGGATAAATCGTAGTGAAGCTTTTCCCTG
 ATGCTACAATGAAGGAAGTAGCGAAGCTTTTCCCTG
 ATGAAATTTTCGGCAGATCAGAGCAAAGCAAAAATAT
 TGAAGTACCATGT (配列番号: 123)

20

30

(Sequences targeted by miR-PDSa^{169g}により標
 的とされる配列(太字)、miR-PDSb^{169g}(太字及びイタリック)及びmiR
 -PDS^{159a}(下線)を示す。)

【0276】

[0302] ニコチアナベンサミアナrbcs配列(6つ全てのrbcs遺伝子配列中
 の太字の配列はmiR-rbcs^{159a}-Aにより標的とされる配列に相当する。):

40

【0277】

[0303] rbcs1(ジェンバンク受け入れ番号: CN748904:56-63
 3bp, CN748069:419-エンド)

【0278】

【化 8】

GGAGAAAGAGAAACTTTCTGTCTTAAGAGTAATTAG
CAATGGCTTCCTCAGTTCTTTTCCTCAGCAGCAGTTG
CCACCCGCAGCAATGTTGCTCAAGCTAACATGGTTG
CACCTTTTCACAGGTCTTAAGTCTGCTGCCTCATTTCC
CTGTTTCAAGAAAGCAAAACCTTGACATCACTTCCA
TTGCCAGCAACGGCGGAAGAGTGCAATGCATGCAGG
TGTGGCCACCAATTAACATGAAGAAGTATGAGACTC
TCTCATACCTTCCCGATTTGAGCCAGGAGCAATTGC
TCTCCGAAATTGAGTACCTTTTGAAAAATGGATGGG
TTCCTTGCTTGGAATTCGAGACTGAGAAAGGATTT
GTCTACCGTGAACACCACAAGTCACCAGGATACTAT
GATGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGCTACCTATG
TTCGGATGCACTGATGCCACCCAAGTGTTGGCTGAG
GTGGGAGAGGCGAAGAAGGAATACCCACAGGCCTGG
GTCCGTATCATTGGATTTGACAACGTGCGTCAAGTG
CAGTGCATCAGTTTTCATTGCCTCCAAGCCTGACGGC
TACTGAGTTTTCATATTAGGACAACCTTACCCTATTGT
CTGTCTTTTAGGGGCAGTTTGTGTTTGAAATGTTACTTA
GCTTCTTTTTTTTTTCCTTCCCATAAAAACTGTTTATG
TTCCTTCTTTTTTATTCGGTGTATGTTTTGGATTCCT
ACCAAGTTATGAGACCTAATAATTATGATTTTGTGC
TTTGTTTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号: 124)

10

20

【0279】

[0304] rbcS2 (ジェンバンク受け入れ番号: CN748495:3-552
bp, CN748945:364-575b)

30

【0280】

【化 9】

TCTTTCTGTCTTAAGTGTAATTAACAATGGCTTCCT
 CAGTTCTTTCCTCAGCAGCAGTTGCCACCCGCAGCA
 ATGTTGCTCAAGCTAACATGGTTGCACCTTTCCTG
 GTCTTAAGTCAGCTGCCTCGTTCCCTGTTTCAAGGA
 AGCAAAACCTTGACATCACTTCCATTGCCAGCAACG
 GCGGAAGAGTGCAATGCATGCAGGTGTGGCCACCAA
 TTAACAAGAAGAAGTACGAGACTCTCTCATACCTTC
 CTGATCTGAGCGTGGAGCAATTGCTTAGCGAAATTG
 AGTACCTCTTGAAAAATGGATGGGTTCCCTTGCTTG
 GAATTGAGACTGAGCGCGGATTTGTCTACCGTGA
 ACACCACAAGTCACCGGGATACTATGACGGCAGATA
 CTGGACCATGTGGAAGTTGCCTATGTTTCGGATGCAC
 TGATGCCACCCAAGTGTTGGCCGAGGTGGAAGAGGC
 GAAGAAGGCATACCCACAGGCCTGGATCCGTATTAT
 TGGATTGACAAACGTGCGTCAAGTGCAGTGCATCAG
 TTTCATTGCCTACAAGCCAGAAGGCTACTAAGTTTC
 ATATTAGGACAACCTTACCCTATTGTCCGACTTTAGG
 GGCAATTTGTTTGAAATGTTACTTGGCTTCTTTTTT
 TTTTAATTTTCCCACAAAACTGTTTATGTTTCCTA
 CTTTCTATTCGGTGTATGTTTTTGCATTCCCTACCAA
 GTTATGAGACCTAATAACTATGATTTGGTGCTTTGT
 TTGTAAAT (配列番号: 125)

10

20

【0281】

[0305] rbcS3 (ジェンバンク受け入れ番号: CN746374:22-10
 8b, CN748757:156-175 b, CN748929:158-309 b
 , CN748913:319-489 b, CN748777:485-603 b, C
 N748188:453-529 b)

30

【0282】

【化 1 0】

TAGCAATAGCTTTAAGCTTAGAAATTATTTTCAGAA
ATGGCTTCCTCAGTTATGTCCTCAGCAGCTGCTGTT
GCGACCGGCGCCAATGCTGCTCAAGCCAACATGGTT
GCACCCTTCACTGGCCTCAAGTCCGCCTCCTCCTTC
CCTGTTACCAGGAAACAAAACCTTGACATTACCTCC
ATTGCTAGCAATGGTGGAAAGAGTTCAATGCATGCAG
GTGTGGCCACCAATTAACATGAAGAAGTACGAGACA
CTCTCATACCTTCCTGATTTGAGCCAGGAGCAATTG
CTTAGTGAAGTTGAGTACCTTTTGAAAAATGGATGG
GTTCCCTTGCTTGGAATTCGAGACTGAGCGTGGATT
CGTCTACCGTGAACACCACAACCTCACCAGGATACTA
CGATGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGTTGCCCCAT
GTTGCGGGTGCCTGATGCCACTCAGGTGTTGGCTGA
GGTCGAGGAGGCAAAGAAGGCTTACCCACAAGCCTG
GGTTAGAATCATTGGATTTCGACAACGTCCGTCAAGT
GCAATGCATCAGTTTTTATCGCCTCCAAGCCAGAAGG
CTACTAAAATCTCCATTTTTTAAGGCAACTTATCGTA
TGTGTTCCCCCGGAGAACTGTTTTTGGTTTTTCCTGCT
TCCTTATATTATTCAATGTATGTTTTTTGAATTCCAA

10

20

(配列番号：126)

【0283】

[0306] rbcS4 (ジェンバンク受け入れ番号：CN748906：9-607
b，CN747257：629-709b)

【0284】

【化 1 1】

AATGGCTTCCTCAGTTATGTCCTCAGCTGCCGCTGT
TGCCACCGGCGCCAATGCTGCTCAAGCCAGTATGGT
TGCACCTTTTCACTGGCCTCAAGTCCGCAACCTCCTT
CCCTGTTTTCCAGAAAACAAAACCTTGACATTACTTC
CATTGCTAGCAACGGCGGAAGAGTTCAATGCATGCA
GGTGTGGCCACCAATTAACAAGAAGAAGTACGAGAC
ACTCTCATACCTTCCCGATTTGAGCCAGGAGCAATT
GCTTAGTGAAGTTGAGTACCTGTTGAAAAATGGATG
GGTTCCTTGCTTGGAATTCGAGACTGAGCGTGGAT
TCGTCTACCGTGAACACCACAGCTCACCAGGATATT
ATGATGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGTTGCCCA
TGTTTCGGGTGCACTGATGCCACTCAGGTGTTGGCTG
AGGTTCGAGGAGGCAAAGAAGGCTTACCCACAAGCCT
GGGTTAGAATCATTGGATTTCGACAATGTCCGTCAAG
TGCAATGCATCAGTTTTCATCGCCTACAAGCCAGAAG
GCTACTAGAATCTCCATTTTTTAAGGCAACTTATCGT
ATGTGTTCCCCGGAGAACTGTTTTTGGTTTTTTCCTG
CTTCATTATATTATTCAATGTATGTTTTTTGAATTCC
AATCAAGGTTATGAGAACTAATAATGACATTTAATT
TGTTTTCTTTTCTATATA (配列番号：127)

10

20

【0285】

[0307] r b c S 5 (ジェンバンク受け入れ番号：CN744712：16-71
3 b)

【0286】

【化 1 2】

TAAATAATTAATTGCAACAATGGCTTCCTCTGTGAT
TTCCTCAGCTGCTGCCGTTGCCACCGGCGCTAATGC
TGCTCAAGCCAGCATGGTTGCACCCTTCACTGGCCT
CAAATCTGCTTCCTCCTTCCCTGTTACCAGAAAACA
AAACCTTGACATTACATCCATTGCTAGCAATGGTGG
AAGAGTCCAATGCATGCAGGTGTGGCCACCAATTAA
CATGAAGAAGTACGAGACACTCTCATACCTTCCTGA
TTTGAGCCAGGAGCAATTGCTTAGTGAAGTTGAGTA
TCTTTTGA AAAAATGGATGGGGTTCCTTGCTTGGAAT
TCGAGACTGAGCGTGGATTTGTCTACCGTGAACAT
CACAGCTCACCAGGATACTACGATGGCAGATACTGG
ACCATGTGGAAGTTGCCCATGTTCTGGGTGCACTGAT
GCCACTCAGGTGTTGGCTGAGGTCTGAGGAGGCAAAG
AAGGCTTACCCACAAGCCTGGGTTAGAATCATTGGA
TTCGACAACGTCCGTCAAGTGCAATGCATCAGTTTT
ATCGCCTCCAAGCCAGAAGGCTACTAAAATCTCCAT
TTTTAAGGCAACTTATCGTATGTGTTCCCCGGAGAA
ACTGTTTTTGGTTTTTCCTGCTTCATTATATTATCAA
TGTATGTTTTTTGAATTCCAATCAAGGTTATGAGAAC
TAATAATGACATTTAA (配列番号: 128)

10

20

【0287】

[0308] r b c S 6 (ジェンバンク受け入れ番号: CN745030:14-12
3 b, CN748077:1-523)

【0288】

【化 1 3】

GCACGAGGCTTCCTCAGTTATGTCCTCAGCTGCCGC
 TGTTTCCACCGGCGCCAATGCTGTTCAAGCCAGCAT
 GGTCGCACCCCTTCACTGGCCTCAAGGCCGCCTCCTC
 CTTCCCGGTTTCCAGGAAACAAAACCTTGACATTAC
 TTCCATTGCTAGAAATGGTGGGAAGAGTCCAATGCAT
 GCAGGTGTGGCCGCCAATTAACAAGAAGAAGTACGA
 GACACTCTCATACCTTCCTGATTTGAGCGTGGAGCA
 ATTGCTTAGCGAAATTGAGTACCTTTTGA AAAAATGG
 ATGGGTTTCCTTGCTTGGAATTCGAGACTGAGCATG
 GATTTCGTCTACCGTGAACACCACCACTCACCAGGAT
 ACTACGATGGCAGATACTGGACGATGTGGAAGTTGC
 CCATGTTTCGGGTGCACCGATGCCACTCAGGTCTTGG
 CTGAGGTAGAGGAGGCCAAGAAGGCTTACCCACAAG
 CCTGGGTCAGAATCATTGGATTTCGACAACGTCCGTC
 AAGTGCAATGCATCAGTTTCATCGCCTACAAGCCCG
 AAGGCTATTAAAATCTCCATTTT TAGGACAGCTTAC
 CCTATGTATTCAGGGGAAGTTTGTTTGAATTCTCCT
 GGAGAAACTGTTTTTGGTTTTTCCTTTGTTTTAATCTT
 CTTTCTATTATATTTTTTGGATTTTACTCAAGTTTAT
 AAGAACTAATAATAATCATTTGTTTCGTTACTAAAA
 AAAAAAAAA (配列番号: 129)

10

20

【0289】

【0309】 ニコチアナベンサミアナのアグロバクテリウムチュメファシエンスによる浸潤

【0290】

【0310】 適切なプラスミドを含むアグロバクテリウムチュメファシエンスの浸潤を以下のとおりに実施した。細胞を適切な抗生物質及び40 µMアセトシリンゴン存在下で対数期まで生育させた。それらを遠心分離により回収して、150 µMアセトシリンゴンを含む10 mM MgCl₂に懸濁して、そして攪拌せずに室温において2時間インキュベートした。浸潤は、葉の背軸側に適用された針なしのシリンジを用いることにより実施した。1、2、又は3日後に葉の組織を回収し、凍結し、そしてRNA抽出前に液体窒素中ですりつぶした。

30

【0291】

【0311】 ノーザンプロットハイブリダイゼーション

【0292】

【0312】 ニコチアナベンサミアナの葉を用いてTrizol試薬(インビトロジェン)を使用して全RNAを抽出した。10 - 20 µgの全RNAを、15%ポリアクリルアミド/1xTBE(8.9 mM Tris, 8.9 mMホウ酸、20 mM EDTA)/8 M尿素ゲルにて解析して、ハイボンドN+膜(アマシャム)にプロットした。miRNAsに対して正確に逆相補性配列を有するDNAオリゴヌクレオチドを³²P-ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ニューイングランド)により末端標識して、高比活性プローブを生じさせた。ハイブリダイゼーションをULTRAHyb-Oligo溶液を用いて、製造者の指示書(アンピオン、TX)に従い実施し、そしてシグナルをオートラジオグラフにより検出した。各場合において、プローブは、検出されると予測されるmiRNAの正確なアンチセンス配列を含んだ。

40

【0293】

50

[0 3 1 3] P D S m i R N A 富裕性を検出するためのノーザンブロット分析を標準手法に従い実施した。5' エンドプローブは、トマトの P D S 遺伝子配列の 1 - 2 6 8 位 (ジェンバンク X 5 9 9 4 8 , 上記参照) に均等な以前に報告された (G u o e t a l . (2 0 0 3) P l a n t J 3 4 : 3 8 3 - 3 9 2) ニコチアナベンサミアナの P D S 遺伝子の断片に相当した。

【 0 2 9 4 】

[0 3 1 4] 5' R A C E

【 0 2 9 5 】

[0 3 1 5] m i R N A により指示された分割の生成物を同定するために、ファーストチョイス R L M - R A C E キット (アンピオン) を 5' R A C E 実験において用いたが、但し、RNA サンプルのさらなるプロセッシングなしに、全 RNA (2 μ g) を RNA アダプターへの直接ライゲーションに使用した。次の工程は製造者の指示書に従った。P D S 分割断片のネステッド P C R 増幅のためのオリゴヌクレオチド配列は：

3' N b - P D S 1 5' C C A C T C T T C T G C A G G T G C A A A A A C C 3'
(配列番号 : 1 3 0)

3' N b - P D S 2 5' A C A T G G T A C T T C A A T A T T T T T G C T T T G C 3'
(配列番号 : 1 3 1)

3' N b - P D S 3 5' G A T C T T T G T A A A G G C C G A C A G G G T T C A C 3'
(配列番号 : 1 3 2)

であった。全部で 3 つのプライマーをトマト P D S 遺伝子に関する利用可能な配列情報に基づいてデザインしたが、ニコチアナベンサミアナ P D S 遺伝子配列の全体はまだ公表されていないからである。

【 0 2 9 6 】

[0 3 1 6] 5' R A C E 実験から得られた P C R 断片を p C R 4 ベンサミアナ (インビトロジェン) にクローン化して、個々のクローンの D N A 配列決定により分析した。

【 0 2 9 7 】

[0 3 1 7] R T - P C R

【 0 2 9 8 】

[0 3 1 8] 第 1 鎖 c D N A を 5 μ g の全 RNA からオリゴ - d T プライマー (シグマ) 及び Ready - To - Go You - Prime First - strand ビーズ (アマシャム バイオサイエンセズ) を用いて合成した。第 1 鎖 c D N A の量は P C R により E F 1 に関して標準化した (N i s h i h a m a e t a l . (2 0 0 2) C e l l 1 0 9 : 8 7 - 9 9) 。 r b c S の c D N A s の D N A 断片を増幅するために、以下のプライマーを用いた。

N B r b c s 5 : 1 / 2 - F : 5' T T C C T C A G T T C T T T C C T C A G C A G C A G T T G 3'
(配列番号 : 1 3 3)

r b c S 3 - F : 5' C T C A G T T A T G T C C T C A G C A G C T G C 3'
(配列番号 : 1 3 4)

r b c S 4 / 6 - F : 5' T C C T C A G T T A T G T C C T C A G C T G C C 3'
(配列番号 : 1 3 5)

N B r b c S 5 - F : 5' T G T G A T T T C C T C A G C T G C T G C C 3'
(配列番号 : 1 3 6)

N B r b c s 1 r e v 2 : 5' A A C T C A G T A G C C G T C A G G C T T G G 3'
(配列番号 : 1 3 7)

N B r b c s 2 r e v 2 : 5' A A T A T G A A A C T T A G T A G C C T T C T G G C T T G T 3'
(配列番号 : 1 3 8)

N B r b c s 3 / 4 / 5 r e v 1 : 5' G T T T C T C C G G G G A A C A C A T A C G A 3'
(配列番号 : 1 3 9)

N B r b c s 6 r e v 1 : 5' A A A C A A A C T T C C C C T G A A T A C A T A G G G 3'
(配列番号 : 1 4 0)

10

20

30

40

50

【0299】

実施例 17

【0319】 この実施例は、ニコチアナベンサミアナのフィトエンデサチュラーゼ (PDS) の mRNA を分割するための人工マイクロ RNA のデザインを記載する。

【0300】

【0320】 これまでに同定されたアラビドプシスの miRNA s は、異なる mRNA s を標的として、かなりの数が転写因子をコードする (Bartel (2004) Cell 116:281-297; Wang et al. (2004) Genome Biol 5:R65; Rhoades et al. (2002) Cell 110:513-520)。植物の miRNA s のそれらの標的 mRNA s への塩基対形成はほとんど完全であり、RNA 分子の分割をもたらすことは、いくつかの例により示されるとおりであり (Jones-Rhoades and Bartel (2004) Mol Cell 14:787-799)、遺伝子発現のサイレンシングをもたらす。あるいは、標的 mRNA への miRNA の相互作用は、アラビドプシスの miR172 に関して示されたとおり、mRNA 分割よりも翻訳の阻害をもたらし得る (Aukerman and Sakai (2003) Plant Cell 15:2730-2741; Chen (2004) Science 303:2022-2025)。

10

【0301】

【0321】 特定の遺伝子の発現を阻害できる人工の miRNA s をデザインする努力において、我々は、特別の mRNA を標的とするように公知の miRNA の配列を修飾しようとした。

20

【0302】

【0322】 アラビドプシスの miR159 は MYB 転写因子のセットを標的とすることが示された。miR159 のその標的 mRNA s に対する塩基対形成は、ほとんど完全であり、RNA 分子の分割をもたらす (Achari et al. (2004) Development 131:3357-3365; Palatnik et al. (2003) Nature 425:257-263)。miR159 をコードする可能性を有するゲノミック配列が 3 つ存在する (MI R159a, MI R159b, MI R159c)。miR159 の自然界のプロモーターと正確な前駆体配列は公知でなく、マイクロ RNA 遺伝子が DNA ポリメラーゼ II 又は III により転写されるか否かも知られていない。我々は、アラビドプシス miR159a を含む 276 bp の DNA 断片を前駆体配列として用いることを決定した。この前駆体配列は、pre-miR159a と呼ばれ、35S プロモーターの下流に置かれ、そして 3' エンドにおいてノパリン (nopalin) シンターゼ遺伝子のポリ A 付加配列を隣接した (図 11A)。我々は、我々が人工のマイクロ RNA をデザインしてその mRNA を分割できて、それによりその発現に障害を生じさせ得るか否かを観察するために標的としてニコチアナベンサミアナのフィトエンデサチュラーゼ (PDS) 遺伝子を用いようとして決定した。我々は、At-miR159a の配列を、PDS の配列と比較することにより、2 つの配列の間の最良の適合を見いだした。PDS の mRNA の一つ特定の領域に関して、我々は、たった 6 つの塩基の変化で、miR159a を、PDS mRNA と塩基対形成できる miRNA へ変換するのに十分であることを発見した。我々は、この配列を miR-PDS^{159a} と命名した。

30

40

【0303】

【0323】 pre-miR-PDS^{159a} を生成するために、miR159a と miR159a* 配列 (前駆体配列中の miRNA に対して反対のアームに位置する RNA 配列) の両者に、アラビドプシスの pre-miR159a のコンテキスト中にて点変異を導入しようと、PCR 技術を用いた。結果の前駆体を、強いカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S の制御下に置き、そして適切な構築物を含むアグロバクテリウム チュメファシエンスの浸潤によりニコチアナベンサミアナにて発現させた。

【0304】

【0324】 アラビドプシス pre-miR-PDS^{159a} のニコチアナベンサミア

50

ナにおける発現を、最初に、その配列中に導入された変異がそのプライマー及びmiR-PDS^{159a}の成熟に影響しないことを確認するために分析した。ノーザンブロット分析は、浸潤の2また3日後にmiR-PDS^{159a}が明らかに発現され(図11C)、内生miR159に匹敵するレベルに蓄積することを示した。公知のmiRNAsの生合成は、実際のmiRNAのものと比較した場合に寿命が短くて極めて低レベルでしか蓄積しない、ほとんど相補なmiRNA*の生成を含む。一貫して、miR-PDS^{159a}*の存在は検出されたが、その富裕性はmiR-PDS^{159a}のそれよりも有意に低かった(図11C, 中央のパネル)。内生のmiR159a発現はこれらの条件下で変化せず、そして負荷対照及びプローブ特異性対照の両者として機能した(図11B、底のパネル)。さらに、この結果は、アラビドプシスのmiRNA前駆体に基づいた人工miRNAの発現が内生のニコチアナベンサミアナのmiR159aの発現に影響しないことを示す。最後に、これらの発見は、自然界のマイクロRNA前駆体のプロセシングのための酵素的機構が多なる速度制限性ではなくて、多なる有効性を伴って人工の前駆体をプロセシングできることを暗示する。

【0305】

【0325】 我々は、次に、miR-PDS^{159a}の発現が内生のPDS mRNAの予測された分割をもたらすか否かを決定した。miR-PDS^{159a}を発現するサンプルのノーザンブロットハイブリダイゼーションは、PDS mRNAレベルの明確な低下を示した(図12A)。PDS mRNA低下の機構をさらに確認するために、我々は、(1) PDS mRNAがmiR-PDS^{159a}により分割されて診断用5'リン酸を含むか否か、及び(2) 分割点がPDS mRNA:miR-PDS^{159a}塩基対形成相互作用に基づいて予測された部位に対応するか否かを定義するよう設定した。我々は、6つの別個のクローンのうちの5つの5'エンド配列がmiR-PDS^{159a}の5'エンドから数えて10番目のヌクレオチドの後の分割部位にマップされたことを見いだした。分割部位の位置は、他のmiRNA標的に関して公表された研究に完全に一致する(Jones-Rhoades and Bartel (2004) Mol Cell 14:787-799)。

【0306】

【0326】 上記の結果は、PDS mRNAレベルの低下がmiR-PDS^{159a}により指示された正確な分割により引き起こされたことを証明する。

【0307】

実施例18

【0327】 この実施例は、PDS mRNAのマイクロRNA指示による分割が異なるマイクロRNA前駆体から生産され得ることを証明する。

【0308】

【0328】 人工のmiRNAsの発現がpre-miR^{159a}の用途に限定されないことを示すため、我々は、2つの異なるmiR-PDS^{169g}を生成するように、アラビドプシスmiR169gを含む仮想前駆体配列に基づいて異なるmiR-PDSをデザインした(図13A)。miR169gに関する発現ベクターのデザインの間、我々は、222bpのステムループ前駆体のみを含む構築物がmiR169g遺伝子を含む完全な2.0kbの属間領域を含む構築物よりも、成熟miRNAの高い蓄積をもたらしたことを認めた(図13B)。この結果に基づいて、我々は、限定的に短い前駆体ベクターを用いてmiRNA配列の我々の変異導入を継続することを決定した。miR169g配列を有するPDS mRNAの実験は、miR-PDS^{159a}に関して見いだされたのとは異なる、miRNA分割に感受性のmRNA配列内の領域を明らかにした。7つの点変異が、miR^{169g}を、PDS mRNAと完全に塩基対形成できるマイクロRNAに変換させる(miR-PDS^{a169g}, 図13A)。miR159aに基づくmiR-PDSに関して前に示されたとおり、ニコチアナベンサミアナにおけるmiR-PDS^{a169g}の一過性発現は容易に検出される(図13C)。さらに、完全なmiRNAがそのオリジナルの配列とは独立して変化し得るか否かを試験するために、我々は、miR

- P D S b^{1 6 9 g} (図 1 3 A 及び 図 1 3 C) を生成したが、オリジナルの m i R 1 6 9 g に対するその相同性に拘わらず選択された P D S m R N A 内の異なる領域を標的とする。m i R - P D S a^{1 6 9 g} と m i R - P D S b^{1 6 9 g} の両者を用いて、我々は、5' R N A 分析による測定により P D S m R N A の分割を検出し (図 1 3 D) 、そしてノーザンブロット分析による測定により P D S m R N A レベルの低下を検出することができた (図 1 3 E) 。

【 0 3 0 9 】

[0 3 2 9] これらの結果は、異なる m i R N A 前駆体を用いて P D S m R N A の分解を標的とすることが可能であること、そして重要なことは、人工物をデザインするためにオリジナルの m i R N A の配列を広範囲に変化させ得ることを示す。

10

【 0 3 1 0 】

実施例 1 9

[0 3 3 0] この実施例は、ニコチアナベンサミアナの r b c S m R N A s のマイクロ R N A 指示性特異的分割を証明する。

【 0 3 1 1 】

[0 3 3 1] このアプローチを用いて P D S 由来の他の遺伝子を標的とし得ることを示すため、我々は、ニコチアナベンサミアナの異なる数のルビスコ小サブユニット (r b c S) 遺伝子ファミリーを標的とするように、m i R 1 5 9 a 内に点変異を導入した。我々は、好適に利用可能なデータベースに存在する r b c S E S T 5 転写物に関して検索し、そして少なくとも 6 つの異なる r b c S 転写物がニコチアナベンサミアナにおいて発現されることを発見した。これらの r b c S 転写物のコード領域のヌクレオチド配列が互いに 9 0 % を超えて同一であって、そして上記遺伝子ファミリーの全てのメンバーを標的とする m i R - r b s S^{1 5 9 a} - A のデザインを可能にさせた。ここでは、m i R 1 5 9 a に導入された配列は r b s S を標的とするはずの最小の数の変化によりガイドされないが、全ての r b s S m R N A s に共通の特定領域を標的とする要求を反映し、即ちいくつかの変化を含んだ。この様式において、我々は、6 つの全部の r b c S m R N A s を標的とする一つの m i R N A を生成させた (m i R - r b c S^{1 5 9 a} - A , 図 1 4 A) 。

20

【 0 3 1 2 】

[0 3 3 2] 前の実施例におけるとおり、我々は、m i R - r b c S^{1 5 9 a} - A の有効な発現を検出したが (図 1 4 B) 、このファミリーのメンバー間の相同性の程度の高さゆえ、ノーザンブロット分析により別の r b c S m R N A s を検出するのは難しかった。代わりに、我々は、m i R - r b c S^{1 5 9 a} - A 構築物を含むアグロバクテリア株を浸潤された植物における m R N A s のレベルを測定するために、半定量性 R T - P C R を用いた。空の二元ベンサミアナを浸潤された葉と比較すると (図 1 4 C の C) 、r b c S 遺伝子 1、2 及び 3 に関する蓄積は低下したが、r b c S 遺伝子 4、5 及び 6 に関しては、m i R - r b c S^{1 5 9 a} - A 構築物を浸潤したサンプルにおいて検出することができなかった (図 1 4 C の A) 。これらの結果は、全ての r b c S m R N A s を標的とした人工 m i R N A が意図されたものであったが、各ケースに関して効果は多様であったことを示す。最後に、人工 m i R N A の存在は他の植物の遺伝子、例えば E F 1 の発現を干渉しなかった (図 1 4 C , 一番下のパネル) 。

30

40

【 0 3 1 3 】

[0 3 3 3] 本明細書に提示した人工 m i R N A s は P D S m R N A 内の 3 つの異なる位置の近辺 (a l o n g) に分散し (図 1 5 A に要約される) 、2 つの異なる遺伝子を標的とするために使用された (P D S 及び r b c S 、図 1 5 A 及び 図 1 5 B) 。この範囲の使用は m i R N A 配列の柔軟性も反映され、人工 m i R N A s はほとんど各ヌクレオチド位置が変化し得ることを示す (図 1 6) 。2 つの人工 m i R N A s を創世するための m i R 1 5 9 a 内の変化は、たった 8 つの位置のみが変化しないにすぎなかった (図 1 6 A) 。m i R 1 6 9 g の場合、この数は 3 つの位置に減少した (図 1 6 B) 。さらに、両 m i R N A s の変異を共に分析したところ、最初の 2 つのヌクレオチド位置が影響を受けて

50

いないだけである。これは、miRNA配列に沿った各位置が変化し得て、遺伝子サイレンシングのために人工miRNAsを用いる利点を付加する。

【0314】

実施例20

【0334】 この実施例は、人工miRNACPC^{159a}がアラビドプシスの毛根発生を阻害することを示す。

【0315】

【0335】 根の表皮細胞は毛根細胞と無毛細胞に分化する。毛根細胞表皮細胞のみが毛根に分化できる。アラビドプシスの根において、16-22の細胞のファイル全ての間で、8つの対称に位置する細胞ファイルが毛根細胞であり、そしてその他全てが無毛細胞ファイルである。CAPRICE(CPC)はMYB様の蛋白質であり、無毛細胞への根表皮細胞の分化を促進させるGLAMRA2(GL2)を負に制御することにより毛根発生を正に制御する。cpc変異体においては、GL2が、ほとんどの表皮細胞が根の無毛細胞へ分化するように誘導して、極めて僅かな細胞しか毛根に発生することができない。CPCを過剰発現するgl2変異体又は野生型トランスジェニック植物の根は、野生型の根に比較して、より多数の毛根を生成する(図17; Wada et al. (2002) Development 129: 5409-5419)。

【0316】

【0336】 CPCの機能喪失表現型が種子の発生の間のごく初期のステージに出現し、致死性は誘導しないし、且つ観察するのが容易であるから、CPCは遺伝子機能を沈黙化するか又は抑圧するための人工miRNAsの利用性を調査するための良好な候補である。pre-miRNA159をバックボーンとして使用して、CPC mRNAの異なる領域を標的化するように、2つの人工pre-miRNAs, pre-miRCPC1^{159a}及びpre-miRCPC3^{159a}をデザインした。成熟miRCPC1^{159a}及びmiRCPC3^{159a}はCPCメッセンジャーRNAのそれぞれnt233-253及びnt310-330に位置する配列に相補性である。前駆体及び成熟miRNAsのヌクレオチド配列を以下に示す。

【0317】

【0337】 miRCPC1^{159a}前駆体鋳型:

5' acagtttgcttatgtcggatccataataataatttgacaa
gatactttgttttttcgatagatacttgatctgacgatggaa
gaagagggtgagtaaatgttgaaacatgagttgagcagggtta
aagaaaaagctgctaagctatggatcccataaagccctaatac
cttgtaaaagtataaaaaaggattttgggttataatggatttgcata
tctcaggagcttttaaccttgcccttttaaatggctttttactct
tcttttcgatactactcacctcttcatcccggttca 3' (配列番号: 151)。

【0318】

【0338】 miRCPC1^{159a}成熟鋳型: 5' ttttcgatactactc
acctctt 3' (配列番号: 152)。

【0319】

【0339】 miRCPC3^{159a}前駆体鋳型:

5' acagtttgcttatgtcggatccataataataatttgacaa
gatactttgttttttcgatagatacttgatctgacgatggaa
gctcgttggtcgacagggtgggagcatgagttgagcagggtta
aagaaaaagctgctaagctatggatcccataaagccctaatac
cttgtaaaagtataaaaaaggattttgggttataatggatttgcata
tctcaggagcttttaaccttgcccttttaaatggctttttactct
tccctcccaacctgacgcccaacgagcatcccggttca 3' (配列番号: 153)。

【0320】

[0340] miRCPC3^{159a}は成熟鋳型：5' c t c c c a c c t g a c g c c a a c g a g 3' (配列番号：154)。

【0321】

[0341] これら2つの人工pre-mRNAを、これらの前駆体の発現のための構成的35Sプロモーターを含むベクターにクローン化した。35S::pre-miRCPC1^{159a}又はpre-miRCPC3^{159a}を含むアグロバクテリアにより浸潤されたニコチアナベンサミアナのノーザンブロット分析は、成熟miRCPC1^{159a}及びmiRCPC3^{159a}の生産の成功を示した。

【0322】

[0342] アラビドプシスサリアナ植物をXVE::pre-miRCPC1^{159a}又は35S::pre-miRCPC1^{159a}を含むアグロバクテリアにより形質転換したところ、多数のトランスジェニック系列が得られた。XVE::pre-miRCPC1^{159a}植物のT₁種子をカナマイシン含有抗生物質選択培地上で生育させ、そして耐性のトランスジェニック幼植物(seedlings)を、XVEシステムの誘導因子である-エストラジオールを含むか又は含まないMS培地に移した。XVE::pre-miR159を含むT₁トランスジェニック系列を対照として用いた。pre-miR159は、人工pre-miRCPC1^{159a}を構築するために使用されたバックボーンである。

【0323】

[0343] 誘導因子を含む培地上で生育させたXVE::pre-miR159幼植物と又は含まない培地上で生育させたXVE::pre-miR159幼植物の間に、毛根発生に差異は観察されなかった(図18、パネルc及びd)。対照的に、-エストラジオールを含む培地上で生育させたXVE::pre-miRCPC1^{159a}幼植物は、明らかに、誘導因子なしで生育させたものよりも少ない毛根しか発生しなかった(図18、パネルa)。

【0324】

[0344] 35S::pre-miRCPC1^{159a}, 35S::pre-miR159及び35S::pre-miR69^{159a}を有するトランスジェニックアラビドプシス幼植物のT₁幼植物を調査したところ、XVE誘導系列と類似の結果が得られた。トランスジェニック系列のT₁種子をBASTA-選択培地上で生育させ、そして2週齢の幼植物を、組織培養室に垂直に置かれたMS培地プレートに移した。この実験においては、2つの陰性対照：35S::pre-miR159を有するトランスジェニック系列及び35S::pre-miRP69^{159a}を有するトランスジェニック系列を用いた。後者は、pre-miR159をバックボーンとして用いることにより、カブ黄化モザイクウイルス(TYMV; Bozarth et al. (1992) Virology 187:124-130)のP69 mRNAのnt214-234を標的とする人工pre-miRP69^{159a}を生産するためにデザインされた。上記前駆体と成熟miRNAsのヌクレオチド配列を以下に示す：

【0325】

[0345] miRP69^{159a}前駆体鋳型：

5' a c a g t t t g c t t a t g t c g g a t c c a t a a t a t a t t t g a c a a g a t a c t t t g t t t t t c g a t a g a t c t t g a t c t g a c g a t g g a a g c c a c a a g a c a a t c g a g a c t t t c a t g a g t t g a g c a g g g t a a a g a a a a g c t g c t a a g c t a t g g a t c c c a t a a g c c c t a a t c c t t g t a a a g t a a a a a a g g a t t t g g t t a t a t g g a t t g c a t a t c t c a g g a g c t t t a a c t t g c c c t t t a a t g g c t t t t a c t c t t c a a a g t c t c g a t t g t c t t g t g g c a t c c c g g g t c a 3' (配列番号：155)

【0326】

[0346] miRP69^{159a}成熟鋳型：5' aaagtcctcgattgtcttgtgg 3' (配列番号：156)。

【0327】

[0347] トランスジェニック植物の両方の種の幼植物は野生型植物のように豊富な毛根を発生した(図19, パネルa及びc)。対照的に、30の個別の35S::miRCPC1^{159a}系列の中で、18の系列(図19、パネルb)が陰性対照植物(図19、パネルa及びc)に比較して明らかに少ない毛根を示した。

【0328】

[0348] 陰性対照トランスジェニック植物においては(35S::pre-miR159及びpre-miRP69^{159a})、毛根先端領域の表皮内の全ての毛根ファイル細胞が毛根を発生することができた(図20、パネルa, 矢印参照)。しかしながら、35S::pre-miRCPC1^{159a}を有するトランスジェニック系列においては、毛根ファイル中の多数の細胞が毛根を生産することができなかった(図20、パネルb; 矢印参照)。これらの結果は、人工のmiRCPC1^{159a}が内生のCPC mRNAの分割を誘導することにより、CPC遺伝子機能の損失機能を引き起こし、そして毛根の発生を阻害することができることを示す。

【0329】

実施例21

[0349] この実施例は、重合体pre-miRNAをデザインするためのプロセスの一つの態様を記載する。

【0330】

[0350] 工程1：5'エンドにAvrII部位を含ませて3'エンドにSpeI及びXhoI部位を含ませるように、別のpre-miRNAsをPCRにより増幅する。各pre-miRNAを、次に、pENTR/SD/D-TOPO(インビトロジェン)のようなベクターにクローン化して、例えば、pENTR/pre-miRA, pENTR/pre-miRB及びpENTR/pre-miRCを生成する(図21A)。

【0331】

[0351] 工程2：pENTR/pre-miRAを制限酵素SpeI及びXhoIにより消化する。制限酵素AvrII及びXhoIを用いて、pENTR/pre-miRBベクターを消化する(図21B)。開かれたベクターpENTR/pre-miRA及びpre-miRBのDNA断片を回収して、次の工程で精製する。

【0332】

[0352] 工程3：工程2からの開かれたベクターpENTR/pre-miRA及びpre-miRBのDNA断片を連結することにより、ダイマーのpre-miRA-Bを生成する(図21C)。AvrIIとSpeIの互換性粘着末端のために、pre-miRB断片を、開かれたベクターpENTR/pre-miRAに挿入することができ、AvrII部位とSpeI部位は共にライゲーション後に消失する(図21C)。

【0333】

[0353] 工程4：pENTR/pre-miRA-Bを制限酵素SpeI及びXhoIにより消化し、そしてpENTR/pre-miRCを制限酵素AvrII及びXhoIにより消化する(図21D)。開かれたベクターpENTR/pre-miRA-B及びpre-miRCのDNA断片を回収して次の工程で精製する。

【0334】

[0354] 工程5：工程4からの開かれたベクターpENTR/pre-miRA-B及びpre-miRCのDNA断片を連結することにより、三重合体のpre-miRA-B-Cを生成する(図21E)。

【0335】

[0355] この様式において、又は機能上均等な、より多くのpre-miRNAユニットを含む制限酵素重合体pre-miRNAsを調製することができる。望まれるとおり多数のpre-miRNAsがこの様式にて共に結合されるなら、唯一の制限は転

10

20

30

40

50

写物の最終的なサイズである。8 - 10 kb の転写物が植物中で生産できることが知られている。即ち、2 - 30 又はそれより多く、例えば、3 - 40 又はそれより多く、例えば、3 - 45 又はそれより多く、そしてさらにたとえば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又はそれより多い miRNAs を含む多重 pre-miRNA 分子を形成することができる。

【0336】

実施例 22

10

【0356】 この実施例は、ダイマー pre-miRNA の 2 つの成熟 miRNAs へのプロセシングの成功を証明する。

【0337】

【0357】 実施例 21 に記載されたとおりに、人工の pre-miRPDS 1¹⁶⁹_g 及び pre-miRCP C 3¹⁵⁹_a を連結して、ダイマー前駆体 pre-miRPDS 1¹⁶⁹_g-CPC 1¹⁵⁹_a を形成させた。このダイマー miRNA 前駆体を、35S プロモーターが pre-miRPDS 1¹⁶⁹_g-CPC 3¹⁵⁹_a の発現を推進するようなベクターにクローン化した (図 22)。前駆体及び成熟 miRNAs のヌクレオチド配列は以下のとおりである。

【0338】

20

【0358】 miRPDS 1¹⁶⁹_g 前駆体鋳型：

5' a a t g a t g a t t a c g a t g a t g a g a g t c t c t a g t t g t a t c a
g a g g g t c t t g c a t g g a a g a a t a g a g a a t g a g g t t g a g t t t
a g t c t g a c t t g g c c a g t t t t t t a c c a a t g a a t c t a a t t a
a c t g a t t c t g g t g t t g g c c a a g t c a g a c t a a a c t c t g t t t
c c t t c t c t t c t t t t g g a t g t c a g a c t c c a a g a t a t c t a t c
a t c a t g a a t c g t g a t c a a a c t t t g 3' (配列番号：157)。

【0339】

【0359】 miRPDS 1¹⁶⁹_g 成熟鋳型：5' g a g t t t a g t c t g a c
t t g g c c a 3' (配列番号：158)。

30

【0340】

【0360】 miRPDS 1¹⁶⁹_g-CPC 3¹⁵⁹_a 前駆体鋳型：

5' c a c c t a g g a a t g a t g a t t a c g a t g a t g a g a g t c t c t a g
t t g t a t c a g a g g g t c t t g c a t g g a a g a a t a g a g a a t g a g g
t t g a g t t t a g t c t g a c t t g g c c a g t t t t t t a c c a a t g a a
t c t a a t t a a c t g a t t c t g g t g t t g g c c a a g t c a g a c t a a a
c t c t g t t t c c t t c t c t t c t t t t g g a t g t c a g a c t c c a a g a
t a t c t a t c a t c a t g a a t c g t g a t c a a a c t t t g a a g g g t g g
g c g a c t a g g a c a g t t t g c t t a t g t c g g a t c c a t a a t a t a t
t t g a c a a g a t a c t t t g t t t t t c g a t a g a t c t t g a t c t g a c
g a t g g a a g c t c g t t g g c g a c a g g t g g g a g c a t g a g t t g a g
c a g g g t a a a g a a a a g c t g c t a a g c t a t g g a t c c c a t a a g c
c c t a a t c c t t g t a a a g t a a a a a a g g a t t t g g t t a t a t g g a
t t g c a t a t c t c a g g a g c t t t a a c t t g c c c t t t a a t g g c t t
t t a c t c t t c c t c c c a c c t g a c g c c a a c g a g c a t c c c g g g t
c a a a g g g t g g g c g a c t a g t c t a g a c t c g a g t a t t 3' (配
列番号：159)。

40

【0341】

【0361】 異なる構築物である 35S::pre-miRPDS 1¹⁶⁹_g, 35S
::pre-miRCP C 3¹⁵⁹_a 及び 35S::pre-miRPDS 1¹⁶⁹_g-C

50

PC3^{159a}を有するアグロバクテリアを浸潤されたタバコニコチアナベンサミアナの葉のノーザンブロット分析は、成熟miRPDS^{169g}とCPC3^{159a}がダイマーmiRNA前駆体からうまく生産されたことを示す(図23A及び図23B)。この実験においては、処理1が35S::pre-miRPDS^{169g}、処理2が35S::pre-miRCPC3^{159a}そして処理3が35S::pre-miRPDS^{169g}-CPC3^{159a}である。miRPDS^{169g}アンチセンスDNAオリゴをプローブとする場合、1及び3の処理は、ダイマー前駆体が成熟したmiRPDS^{169g}を生成できたことを証明するシグナルを示した。プローブがmiRCPC3^{159a}アンチセンスDNAオリゴの場合、処理3のシグナルは、pre-miRPDS^{169g}-CPC3^{159a}が成熟miRCPC3^{159a}を生成する能力を確認させた。

10

【0342】

実施例23

抗ウイルスmiRNAsのデザイン

[0362] ウイルス遺伝子サイレンシングサプレッサーは宿主の防御を打ち消すために使用されるから、我々は、特定のmiRNAsの発現によりこれらのサプレッサーの生産を損なわせることが植物ウイルスに対して耐性又は寛容を付与するための有効な機構なはずであると推理した(Roth et al. (2004) Virus Res 102: 97-108)。この原理はTuMVを例として用いることにより証明される。

【0343】

[0363] HC-Pro及びP69は、それぞれTuMV及びTYMVによりコードされる植物PTGSサプレッサーである(Anandalakshmi et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 13079-13084; Chen et al. (2004) Plant Cell 16: 1302-1313; Kasschau and Carrington (1998) Cell 95: 461-470)。これら2つのウイルスサプレッサー遺伝子を標的として用いて、それらのコーディング配列に相補な配列により人工miRNAsをデザインした。

20

【0344】

[0364] At-miR159aは、ほとんどのアラビドプシス器官において高レベルにて強く発現される。類似の高レベルの発現は、トウモロコシ及びタバコのような他の植物種においても見いだされた。これらの理由のため、miR159a前駆体(pre-miR159a)をバックボーンとして使用することにより、人工のmiRNAsを生成した。pre-miR159aは184ntのステムループRNAであり、3'エンド近傍のステムのベースから成熟miR159a(5'-uuuggaauugaagggaagcucua-3'; 配列番号: 160)を生成する。このベースステム配列はmiR159a配列であって、相補鎖はmiR159a*配列(図24; 配列番号: 161)と呼ばれる。人工のmiRNAをデザインするために、miR159a配列を、TuMVゲノム配列の2045-2065のHC-Pをコードするウイルス配列に相補な配列5'-acugcucacgcacucgacug-3'(配列番号: 162)で置き換えた。miR159a*配列もステム構造を維持するために変更した。より有効なmiRNAプロセッシング及び人工miRNA前駆体の便利な操作のために、pre-miR159の上流のゲノム配列からクローン化された78bpの配列をこの人工miRNA前駆体の5'エンドに追加した。この初期miRNA-様人工miRNA前駆体をpre-miRHC-P^{159a}と呼んだ。そのDNA配列は以下のとおりである。

30

40

【0345】

[0365] pre-miRHC-P^{159a}

5'cagttttgcttatgtcggatccataataattttgacaaag
atactttgttttttcgatatagatcttgatctgacgatggaaag
cagtcgagtgctgtgagcaagtcattgagttgagcagggttaa
agaaaaagctgtctaaagctatggatccataaagccctaaatcc
ttgttaaagtaaaaaaaggatcttggttatattggatctgcatat

50

c t c a g g a g c t t t a a c t t g c c c t t t a a t g g c t t t t a c t c t t
c a c t t g c t c a c g c a c t c g a c t g c 3' (配列番号: 163)

【0346】

[0366] 同じ方法を用いて、pre-miR P69^{159a}も構築した。pre-miR P69^{159a}は、成熟人工miRNA P69^{159a}, 5'-aaa gucu c g a u u g u c u u g u g g - 3' (配列番号: 164)を生成することにより、TYMVのP69遺伝子を標的とすることが予測された。そのDNA配列は以下のとおりである。

【0347】

[0367] pre-miR P69^{159a}
5' c a g t t t g c t t a t g t c g g a t c c a t a a t a t a t t t g a c a a g
a t a c t t t g t t t t t c g a t a g a t c t t g a t c t g a c g a t g g a a g
c c a c a a g a c a a t c g a g a c t t t c a t g a g t t g a g c a g g g t a a
a g a a a a g c t g c t a a g c t a t g g a t c c c a t a a g c c c t a a t c c
t t g t a a a g t a a a a a a g g a t t t g g t t a t a t g g a t t g c a t a t
c t c a g g a g c t t t a a c t t g c c c t t t a a t g g c t t t t a c t c t t
c a a a g t c t c g a t t g t c t t g t g g c 3' (配列番号: 165)

【0348】

実施例 24

ニコチアナベンサミアナにおけるpre-miR HC - P^{159a}

及びpre-miR P69^{159a}の発現

[0368] pre-miR 159中のmiR 159とmiR 159*配列の置換は、miRNA生合成に重要であると信じられているRNAフォールディング構造をあるいはもたらずのかもしれない。タバコの一過性発現システムを用いることにより、これら2つの人工miRNA前駆体が所望のmiRNAsを生成できるか否かをチェックした。35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}, 35S::pre-miR-P69^{159a}, 35S::HC-Pro, 35S::P69, 及びXVE::pre-miR-P69^{159a}を有するプラスミドを含むアグロバクテリア細胞を、ニコチアナベンサミアナの葉を浸潤させるのに用いた(Llave et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:13401-13406; Voinnet et al. (2000) Cell 103:157-167)。

【0349】

[0369] 別々の構築物を有するアグロバクテリウムチュメファシエンスの静止期培養カルチャー1mlを、一晚、100mg/lのスペクチノマイシン及び50mg/lのカナマイシンを含む50mlのLB培地中で培養して、4,000rpmにて10分間遠心分離することにより細胞を回収した。細菌沈殿物を、75µlの100mMアセトシリゴンを含む50mlの10mM MgCl₂溶液に懸濁した。室温において3時間撹拌せずにインキュベーションした後に、アグロバクテリア懸濁液をニコチアナベンサミアナの葉ヘシリンジにより浸潤させた。2日後に、全RNAをトリゾール試薬(インビトロジェン)を用いて浸潤した葉から抽出し、そしてノーザンブロットハイブリダイゼーションにより分析した(Guo et al. (2005) Plant Cell 17:1376-1386; Wang et al. (2004) Genome Biol 5:R65)。20µgの全RNAサンプルを15%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動により分析して、ハイボンド-N+膜(アマシャム)にブロットした。miR-HC-Pro^{159a}又はpre-miR-P69^{159a}に完全相補な配列を有するDNAオリゴヌクレオチドを[⁻³²P]-ATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼで末端標識して、高い比活性のプローブを生じさせた。ハイブリダイゼーションをULTRA-Hyb Oligo溶液を用いて製造者の指示書(アンピオン)に従い実施して、シグナルをオートラジオグラフにより検出した。

【0350】

【0370】 miR-HC-Pro^{159a}のノーザンブロット分析を3つの異なる処理により実施した：(1)アグロバクテリア細胞を35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}により処理、(2)アグロバクテリア細胞を35S::pre-miR-HC-Proにより処理、及び(3)アグロバクテリア細胞を35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}及び35S::HC-Proにより処理。結果を図25に示す。

【0351】

【0371】 成熟miR-HC-Pro^{159a}シグナルがpre-miR-HC-Pro^{159a}による全処理において検出されたことに注目されたい(図25のカラム1、2、5、6)。葉に35S::HC-Pro構築物のみを浸潤させた場合には、シグナルが検出されなかった(図25のカラム3及び4)。この結果は、人工のpre-miR-HC-Pro^{159a}が植物細胞において成熟miR-HC-Pro^{159a}を生成できることを示す。

10

【0352】

【0372】 miR-P69の場合、4つの異なる処理を実施した：(1)35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}を有するアグロバクテリア細胞、(2)XVE::pre-miR-P69^{159a}を有するアグロバクテリア細胞、(3)35S::pre-miR-P69を有するアグロバクテリア細胞、及び(4)35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}及び35S::P69を有するアグロバクテリア細胞。XVEシステムは - エストラジオールに応答性の転写誘導可能システムである(Zuo et al.(2001)Nature Biotechnol 18(2):157-61)。

20

【0353】

【0373】 ノーザンブロット分析(図26)は、成熟miR-169^{159a}が35S::pre-miR-P69^{159a}及びXVE::pre-miR-P69^{159a}プラス誘導因子を浸潤させた葉においてのみ検出可能であった(図26のカラム3、5、及び7)。一緒にすると、これらの結果は、人工pre-miR-P69^{159a}を用いることにより、うまく、miR-P69^{159a}を生成できることを示す。

【0354】

実施例25

高い人工miRNAs発現レベルを有する

30

安定なアラビドプシストランスジェニック系列

【0374】 35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}又は35S::pre-miR-Pro^{159a}を含む構築物を、アグロバクテリアにより媒介されるアラビドプシスCol-0エコタイプにて花の浸し方法(floral dip method)を用いて形質転換した(Clough and Bent(1998)Plant J 16:735-43)。

【0355】

【0375】 トランスジェニック幼植物(seedlings)を選択培地(MS塩4.3g/l 蔗糖10g/l + Basta 10mg/l + カルベニシリン 200mg/l + 寒天 8g/l)上で生育させた。12の異なる35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}又は35S::pre-miR-P69^{159a}T₂トランスジェニック系列をランダムに拾い上げて、ノーザンブロットにより成熟miRNAレベルを分析するのに使用した。12のトランスジェニック35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}系列のうち、11の系列がmiR-HC-Pro^{159a}の高いレベルの発現を示した(図27)。アラビドプシストランスジェニック35S::pre-miR-P69^{159a}植物においては、試験された全てのT₂系列がmiR-P69^{159a}シグナルを示し、そして10系列が高い発現レベルを示した(図28)。

40

【0356】

実施例26

WT及びトランスジェニック植物のTuMVウイルスチャレンジ

50

[0 3 7 6] TuMVを有するWT及びトランスジェニック植物の接種

【 0 3 5 7 】

[0 3 7 7] ニコチアナベンサミアナの葉にチューリップモザイクウイルス (TuMV) を接種し (Chen et al . (2 0 0 3) Plant Dis 87 : 9 0 1 - 9 0 5) 、そして2週後に組織を1 : 2 0 (wt / vol) 希釈にて0 . 0 5 Mリン酸カリウムバッファー (pH 7 . 0) 中で抽出した。この抽出物をウイルス抽出物として使用した。3 5 S : : miR - HC - Pro^{1 5 9 a}トランスジェニックアラビドプシス系列のT₂植物をグリーンハウス中で、接種前4週間生育させた (5 から6葉のステージ) 。植物を第1から第4の葉に600メッシュのカーボランダムにより空中散布して (dusted) 、200 µlの接種物をやさしくこすった (rubbed) 。野生型アラビドプシスサリアナ (col - 0) 植物及び3 5 S : : miR - P 6 9^{1 5 9 a}を発現するトランスジェニック植物を対照として用いた。接種された植物を温度制御されたグリーンハウスに維持し (2 3 から2 8) 、そして兆候の発症を毎日2週間監視した。

10

【 0 3 5 8 】

[0 3 7 8] エンザイムリンクドイムノソルベントアッセイ (ELISA)

【 0 3 5 9 】

[0 3 7 9] TuMVを感染させた各植物の異なる全身の葉からの葉のディスク (全部で0 . 0 1 g) を、感染14日後に採り (dpi) (days post infection) 、そして間接エンザイムリンクドイムノソルベントアッセイ (ELISA) によりTuMVコート蛋白質 (CP) に対するポリクローナル抗血清 (Chen et al . (2 0 0 3) Plant Dis 87 : 9 0 1 - 9 0 5) 及びアルカリホスファターゼをコンジュゲートされたヤギ抗 - ウサギイムノグロブリンGを用いてアッセイした。基質p - ニトロフェニルホスフェートを発色に用いた。Tunable Microplate Reader (VersaMax , Molecular Devices Co . , CA) を用いることにより、405 nmにおける吸光を読むことにより、結果を記録した。

20

【 0 3 6 0 】

[0 3 8 0] ウェスタンブロット分析

【 0 3 6 1 】

[0 3 8 1] TuMVコート蛋白質 (CP) に対するポリクローナル抗血清 (Chen et al . (2 0 0 3) Plant Dis 87 : 9 0 1 - 9 0 5) 及びアルカリホスファターゼをコンジュゲートされたヤギ抗 - ウサギイムノグロブリンGを用いて、ウェスタンブロット分析を実施した。アラビドプシス植物からの全身の葉を20容量 (wt / vol) の変性バッファー (50 mM Tris - HCl , pH 6 . 8 , 4 % SDS , 2 - メルカプトエタノール、10 %グリセロール、及び0 . 0 0 1 %ブロムフェノールブルー) 中でホモジェナイズした。抽出物を100 に5分間加熱して、8 , 0 0 0 × g にて3分間遠心分離することにより、植物の残渣を沈殿させた。各サンプル (15 µl) の全蛋白質を12 %ポリアクリルアミドゲルに負荷し、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、そして次に電気転写装置 (バイオラッド) を用いてPVD F膜 (イモビロン - P , ミリポア、ベッドフォード、MA) に転写した。当該膜を、一次抗体としてのTuMVに対するポリクローナル抗血清及びパーオキシダーゼコンジュゲートされた二次抗体 (アマシャムバイオサイエンセズ) と、免疫反応性蛋白質の可視化の前にECLキット (アマシャムバイオサイエンセズ) を用いてインキュベートした。ゲルをクマジーブリリアントブルーR 2 5 0により染色して、RUBISCO (5 5 k d) のラージサブユニットのレベルを負荷対照として用いた。

30

40

【 0 3 6 2 】

[0 3 8 2] miR - HC - Pro^{1 5 9 a}人工miRNAを発現するトランスジェニック植物がTuMV感染に耐性であることが見いだされた (図 2 9) 。接種の2週間後に写真を撮った (感染から14日後) 。miR - HC - Pro^{1 5 9 a} (系列 # 1 1 ; 図 3 3 B) は正常な蛍光を発したが、WT植物及び3 5 S : : miR - P 6 9^{1 5 9 a}を発現

50

するトランスジェニック植物（系列 # 11；図 33B）はウイルス感染の兆候を示した。

【0363】

[0383] TuMV 感染の 14 日後に、miR-P69^{159a}（系列 # 11）及び col-0 植物は花の間の短い節間を蛍光において示したが、miR-HC-Pro^{159a} トランスジェニック植物（系列 # 11）は正常な蛍光発色を示した（図 30、上部パネル）。TuMV 感染アラビドプシス植物における蛍光のクローズアップビュー。miR-P69^{159a}（系列 # 11）及び col-0 植物は老年期及び授粉の欠損を示したが、miR-HC-Pro^{159a} 植物（系列 # 11）は正常な花と長角果の発生を示した（図 30、底部パネル）。偽の感染に関しては、植物にバッファのみを接種した。

【0364】

[0384] TuMV 感染 miR-P69^{159a}（系列 # 11）及び WT（col-0）植物においては、長角果は小さくて不完全に発生した（mal-developed）。miR-HC-Pro^{159a} 植物（系列 # 11）は TuMV 感染に耐性であって、正常な長角果発生を示した（図 31）。バッファを接種された植物（偽接種）を対照として用いた。

【0365】

[0385] 様々なトランスジェニック miR-HC-Pro^{159a} 及び WT 植物の TuMV 感染に対する耐性を調査するために、2 つの別個の実験を実施した。実験 1：T₂ トランスジェニック系列の 16 の個々の植物（miR-HC-Pro^{159a} 植物の系列 # 11 及び miR-P69^{159a} 植物の系列 # 11）を用いた。12 の個々の植物に、バッファを対照として接種した（MOCK）。2 週間後に、ウエスタンブロット分析のために TuMV CP に対する抗体を用いて全身の葉を回収した。TuMV CP は miR-HC-Pro^{159a} トランスジェニック植物において検出されなかったが、TuMV CP は miR-P69^{159a} 及び WT col-0 植物において高発現された（図 32）。RUBISCO のラージサブユニット（55 kd）を負荷対照として用いた。レーン 6（上部パネル）及びレーン 4（中央のパネル）において CP は検出されなかったことに注目されたいが、ウイルス接種の失敗によるらしい。これらの植物は兆候を有さなかった。感染アッセイの結果を表 7 に示す。

【0366】

【表 7】

表 7

TuMV 接種物をチャレンジされた miR-HC-Pro^{159a} 及び miR-P69^{159a} のトランスジェニックアラビドプシスの感染性アッセイ

トランスジェニック系列	幼植物の数			耐性率 (%)
	耐性	罹病性	総計	
miR-HC-Pro ^{159a} #11	12	0	12	100
miR-P69 ^{159a} #1	1	11	12	8.3
col-0	1	11	12	8.3

【0367】

[0386] 実験 2：以下のトランスジェニック系列及び WT 植物を用いた。（1）35S::HC-Pro^{159a} 植物：系列 # 10（12 の植物に TuMV を接種して、4 つにバッファを接種）；系列 # 11（12 の植物に TuMV を接種して、4 つにバッファを接種）；系列 # 12（9 つの植物に TuMV を接種して、4 つにバッファを接種）；系列 # 13（10 の植物に TuMV を接種して、4 つにバッファを接種）。（2）35S::miR-P69^{159a} 植物：系列 # 1（8 つの植物に TuMV を接種して、4 つにバッファを接種）；系列 # 2（7 の植物に TuMV を接種して、4 つにバッファを接種）；系列 # 3（9 の植物に TuMV を接種して、4 つにバッファを接種）；系列 # 7（5 つの植物に TuMV を接種して、4 つにバッファを接種）；系列 # 13（1

0の植物にTuMVを接種して、4つにバッファを接種)。

【0368】

【0387】 各トランスジェニック系列からの代表の植物のウエスタンブロットの結果を図33、パネルAに示す。RUBISCOのラージサブユニット(55kd)のレベルを負荷対照として用いた。35S::miR-HC-Pro^{159a}を発現する全ての植物はウイルスに対して耐性であって、如何なる可視性の兆候も示さなかったし、如何なるTuMV CPも発現しなかった。全てのWT植物及び35S::miR-P69^{159a}植物は、TuMV感染の兆候を示し、そしてTuMV CPを高レベルにて発現した。全ての偽感染植物は正常であって、如何なるTuMV CPも発現しなかった。人工miRNAのmiR-HC-Pro^{159a}及びmiR-P69^{159a}トランスジェニックアラビドプシスにおける発現を図33、パネルBに示す。感染性アッセイの結果を表8に示す。

10

【0369】

【表8】

表8

TuMV接種物をチャレンジされたmiR-HC-Pro^{159a}及びmiR-P69^{159a}のトランスジェニックアラビドプシスの感染性アッセイ

トランスジェニック系列	幼植物の数			
	耐性	罹病率	総計	耐性率(%)
miR-HC-Pro ^{159a} #10	12	0	12	100
miR-HC-Pro ^{159a} #11	12	0	12	100
miR-HC-Pro ^{159a} #12	9	0	9	100
miR-HC-Pro ^{159a} #13	10	0	10	100
miR-P69 ^{159a} #1	0	8	8	0
col-0	1	11	12	8.3

20

【0370】

【0388】 TuMVの感染14日後に、全身の葉のサンプルを回収して、ELISAにより抽出物をアッセイした。結果は、2つの異なる実験からの9又は12の植物のELISAの読みの平均である。結果(図34)は、miR-HC-Pro^{159a}植物がTuMV感染に対して完全に耐性であったことを示す。読みは基質の加水分解の30分後に採られた。

30

【0371】

実施例27

ホモ重合性pre-miRNAsを用いた

同じ転写物からの一つより多いmiRNAsの生産

【0389】 重合性pre-miRNAsは、一つより多いmiRNA前駆体ユニットからなる人工miRNA前駆体である。それらは、異なるmiRNA前駆体によるヘテロ重合体、又は同じmiRNA前駆体のいくつかのユニットを含むホモ重合体の何れかであり得る。前の実施例において、ヘテロ重合体pre-miRNAsが異なる成熟人工miRNAsを生産できることを証明した。例えば、pre-miR-PDSa^{169g}-CPC3^{159a}はpre-miR-CPC3^{159a}とpre-miR-PDS1^{169g}からなるダイマーであり、植物細胞中で発現されたときに、miR-PDS1^{169g}とmiR-CPC3^{159a}を生産できる。ここでは、異なる成熟人工miRNAsを生産するためのホモ重合体miRNA前駆体の使用が記載される。

40

【0372】

【0390】 pre-miR-P69^{159a}とpre-miR-HC-Pro^{159a}をpre-miR159aバックボーンから生成した。それらは同じmiRNA前駆体に由来する。それらを共に連結することにより、ホモ重合体pre-miRNA, pre

50

- mi R - P 6 9 ^{1 5 9 a} - H C - P r o ^{1 5 9 a} を形成させる。D N A 配列は以下の通りである。

【 0 3 7 3 】

[0 3 9 1] p r e - m i R P 6 9 ^{1 5 9 a} - H C - P ^{1 5 9 a}

【化 1 4】

5' c a g t t t t g c t t a t g t c g g a t c c a t a a t a t a t t t t g a
c a a g a t a c t t t t g t t t t t t c g a t a g a t c t t t g a t c t g a c
g a t g g a a g c c a c a a g a c a a t c g a g a c t t t t c a t g a g t
t g a g c a g g g t a a a g a a a a g c t g c t a a g c t a t g g a t c
c c a t a a g c c c t a a t c c t t t g t a a a g t a a a a a a g g a t t
t g g t t t a t a t g g a t t g c a t a t c t c a g g a g c t t t a a c t
t g c c c t t t t a a t g g c t t t t a c t c t t t c **AAAGTCTCGA**
TTGTCTTGTGGc ATCCCGGGTCAAAGGGTGGGCGA
CTAGGA c a g t t t t g c t t a t g t c g g a t c c a t a a t a t a
t t t g a c a a g a t a c t t t t g t t t t t t c g a t a g a t c t t g a t
c t g a c g a t g g a a g c a g t c g a g t g c g t g a g c a a g t c a
t g a g t t g a g c a g g g t a a a g a a a a g c t g c t a a g c t a t
g g a t c c c a t a a g c c c t a a t c c t t t g t a a a g t a a a a a a
g g a t t t t g g t t a t a t g g a t t g c a t a t c t c a g g a g c t t
t a a c t t g c c c t t t t a a t g g c t t t t a c t c t t t c **ACTTGC**
TCACGCACTCGACTGc 3' (配列番号: 166)

10

20

【 0 3 7 4 】

[0 3 9 2] 小文字の配列は A t - m i R 1 5 9 バックボーンである。太字の配列は m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} である。イタリック体は m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} である。太字のイタリック体はリンカー配列である。

【 0 3 7 5 】

[0 3 9 3] タバコ過性発現システムを用いて、このホモ重合体 m i R N A 前駆体が所望の成熟 m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} 及び m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} を生産できるか否かをチェックした。この実験においては、3つの処理を実施した: (1) アグロバクテリアの 35S::p r e - m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} による処理、(2) アグロバクテリアの 35S::p r e - m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} による処理、及び(3) アグロバクテリアの 35S::p r e - m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} - H C - P r o ^{1 5 9 a} による処理。ノーザン分析は、ホモ重合体 m i R N A 前駆体、p r e - m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} - H C - P r o ^{1 5 9 a} が成熟 m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} と m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} を生産できることを示した(図 35)。

30

【 0 3 7 6 】

実施例 28

40

イントロン配列に挿入された p r e - m i R N A s からの m i R N A s の発現

[0 3 9 4] R N A スプライシングの間に、イントロンが初期 R N A 転写物から放出されて、m i R N A s の前駆体として機能する可能性があり得る。この実施例においては、p r e - m i R N A s のそのようなイントロン配列への挿入により人工 m i R N A s を生産することが記載される。

【 0 3 7 7 】

[0 3 9 5] ほとんどのイントロンは配列 5' - G U - 3' で始まって配列 5' - A G - 3' で終わる。これらの配列はそれぞれスプライシングドナー部位及びスプライシングアクセプター部位と呼ばれる。これらの配列に加えて、イントロン内に位置するブランチ部位もイントロンの成熟に重要である。当該ブランチなしでは、イントロンが切り出され

50

て初期RNA転写物から放出され得ない。ブランチ部位はスプライシングアクセプター部位の20 - 50 nt上流に位置する。スプライドナー部位とブランチ部位の間の距離は異なるイントロンで大きく異なる。この理由のため、これら2つの部位、即ち、イントロンのスプライドナー部位とブランチ部位の間に人工pre-miRNAsを挿入することを決定した。

【0378】

【0396】 アラビドプシスCARPRICE (CPC) 遺伝子は3つのエクソンと2つのイントロンを含む。ブランチ部位の5' - CU(A/G)A(C/U) - 3' (式中、Aは全ての配列において保存されている) のコンセンサス配列に続き、開始コドンの128から132 nt (イントロン1) 及び722から725 nt (イントロン2) に位置する2つのブランチ部位が予測される。111から114 nt 及び272から697 nt の配列はそれぞれイントロン1及びイントロン2の中に位置しており、miR159aバックボーンを含む人工miRNA前駆体により置換した。DNA配列は以下のとおりである。

10

【0379】

【0397】 CPCゲノム配列

【0380】

【化15】

```

atgttttcgttcagacaaggcggaaaaaatggataaa
cgacgacggagacagagcaaaggccttcttgtt
tccgaagGTCTGATTTCTCTTTGTTTCTCTCTATAT
CTTTTTGATCGGTTTGAGTCTGATTTTGTATGTTT
GTTTCGCAGaggtgagtagtatcgaatgggaagctg
tgaagatgtcagaagaagaagaagatctcatttctc
ggatgtataaactcgttggcgacagGTTAGAGACTC
TTTCTCTCTCGATCCATCTTGTTGCTTTCTCTTTT
TTTTTGGTCTTTTCATGTTTTTGTCGAATCTGCTTAGA
TTTTGATCTCAAAGTCGGTCGTTTATTTATGCATT
TTCTTGGTTTTTTCTATTATATTATTGGGTCTAACT
TACCGAGCTGTCAATGACTGTGTTTCAGCCTGATTT
TTGATCTTGTTATTATTCTCTGTTTTTTGTTTTAG
TTGTTCAAATAGCAAAACCTAATCAAGATTTTCGTT
TTCAGTTTTCTTTTTTTTATATATGATTCTTTAGCAA
AACATATTCTTAATTTTATGTCAGAACTCACTTTGG
CTAGTTTTGGTTCAATTTTGTATTACAGCATGTTTGT
ATGAAGTCAAAGTGTAATTTACGATTTTGGTTTCGG
TTCCATAGAATTTTAACCGAATTACAAACTTTATG
CGGTTTTTTATCGGAATAAAAGGTATTTGGTTAAGT
GTAAGTTCCTCAACA CTGACTGTTAGCCTATCCTA
CGTGGCGCGTAGgtgggagttgatcgccggaagga
tcccgggacggacgccggaggagatagagagatatg
gcttatgaaacacggcgctcgtttttgccaacagacg
aagagacttttttaggaaatga (配列番号: 167)

```

20

30

40

【0381】

【0398】 小文字の配列はエクソンである。太字のイタリック体の配列はブランチ部位である。太字の配列が人工pre-miRNAsにより置き換えられた。イントロン配

50

列は普通の文字、太字及び太字イタリック体の配列を含む。

【0382】

[0399] 構築物 35S::CPC-A及び35S::CPC-Bを生成して、人工 miRNA s の生産のために人工 pre-miRNA を挿入するためにスプライスされていない CPC 転写物のイントロン1又はイントロン2を用いることができるか否かをチェックした。CPC-A 構築物においては、pre-miR-HC-Pro^{159a}をイントロン1に挿入したが、イントロン2は変化させなかった。CPC-Bにおいては、pre-miR-HC-Pro^{159a}をイントロン2に挿入したが、イントロン1は変化させなかった(図36)。35S::CPC-A, 35S::CPC-B, 35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}, 及び35S::pre-miR159aを有するアグロバクテリア細胞に、一過性発現のためにニコチアナベンサミアナの葉を浸潤させた。miR-HC-Pro^{159a}に相補なプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションは、CPC-A及びCPC-Bを浸潤させた4つの別個の実験の葉のサンプルがmiR-HC-Pro^{159a}を発現させたことを示した(図37)。この結果は、CPC転写物のイントロン1及びイントロン2の両者を用いて人工 miRNA s を生産できることを示す。

10

【0383】

[0400] 構築物 35S::CPC-C及び35S::CPC-Dを生成して、両イントロンにおいて miRNA s を生産する能力を決定した。CPC-C 構築物においては、pre-miR-HC-Pro^{159a}をイントロン1に挿入し、そしてpre-miR-P69^{159a}をイントロン2に挿入した。CPC-Dにおいては、pre-miR-P69^{159a}をイントロン1に挿入し、そしてpre-miR-HC-Pro^{159a}をイントロン2に挿入した(図38)。35S::CPC-C, 35S::CPC-D, 35S::pre-miR-HC-Pro^{159a}, 及び35S::pre-miR-P69^{159a}を有するアグロバクテリア細胞に、一過性発現のためにニコチアナベンサミアナの葉を浸潤させた。図39は、4つの個別の実験のノーザンブロットの結果を示す。4つのサンプル全てがmiR-HC-Pro^{159a} miRNA 及びmiR-P69^{159a}に相当するシグナルを示し、サンプル1のシグナルが弱いことに注目されたい(35S::CPC-Cの図39)。この弱いシグナルは、この特定のサンプルの低い一過性発現効率によると言えよう。類似の状況は35S::CPC-Dの実験において遭遇した。これらの結果は、一つの転写物において同時に2つの異なる人工 miRNA s を生産するためにCPCイントロンを使用できることを証明する。

20

30

【0384】

[0401] 上記の実施例は、発明を例示するためであって、その範囲を限定するために提供されたのではない。発明の他の変更物が当業者には容易に認識されて請求の範囲に包含される。例えば、上記の実施例においては、pre-miR159aとpre-miR169gを用いることにより、人工 miRNA s を生成させた。しかしながら、他のpre-miRNA s、例えば本明細書に記載したものを、pre-miR159aとpre-miR169gと交換して用いることができた。本明細書に引用された全ての刊行物、特許、特許出願、及びコンピュータプログラムは引用により本明細書に編入される。この明細書において及び請求の範囲において、単一形態の「a」、「an」及び「the」は、コンテキストが明らかに他を指し示さない限り、複数のレファレンスを含む。さらに、この明細書において及び請求の範囲において、用語「comprising」又は「comprise」はオープンエンドであることを意図し、引用された要素又は工程のみならず、いかなる追加の要素又は工程をも含むと認識される。

40

【図面の簡単な説明】

【0385】

【図1】[0015] 図1は、miR172a-2の周囲の配列により形成された予測上のヘアピン構造を示す。成熟マイクロRNAをグレーのボックスで示す。

【図2】[0016] 図2は、miR172-aの過剰発現表現型を示す。a, 野生型

50

(コロンビア生態型)植物、3.5週齢。b, EAT-D植物、3.5週齢。c, 野生型の花。d, EAT-Dの花。第2の螺旋器官(whorl organs)(花弁)の不在に注意。矢印は、先端の葉縁(margins)と傷痕を有する乳頭状突起(stigmatic papillae)に沿った胚珠(ovules)を有する萼片(sepal)を示す。e, 35S-EAT植物からの芝生の葉の縁(cauline leaf margin)。矢印は、葉縁から防御する乳頭状突起の束を示す。単生の雌器(矢印)35S-EAT植物の芝生の葉の葉腋から出てくる。

【図3】[0017] 図3は、APETALA2(AP2)に相補なmiRNAを含むEAT遺伝子を示す。a, EAT遺伝子の第5染色体上の位置。T-DNAの挿入と35Sエンハンサーの配置を示す。miR172a-2に対応する21-nt配列をEAT遺伝子の下に示す(配列番号:86)。b, 仮想21-nt miR172a-2/AP2 RNA二重鎖をAP2の遺伝子構造の下に示す。二重鎖中のGUの揺らぎ(wobble)に下線を引く。c, AP2 21-nt領域(黒いバー)のアラインメント及び周囲の配列と3つの他のアラビドプシスAP2ファミリーメンバー、及び2つのトウモロコシAP2遺伝子(IDS1及びGL15)。d, miR172a-2 miRNA(黒いバー)のアラインメント及びアラビドプシス、トマト、ダイズ、ポテト及びイネからのmiR172-様配列と周囲配列。

【図4】[0018] 図4は、miR172a-2のmiRNAの配列を示す。a, 野生型(レーン3と7)及びEAT-D(レーン4と8)からの全RNAのノーザンプロット。プロットは、miR172a-2のmiRNAに対するセンスオリゴ(レーン1-4)又はアンチセンスオリゴ(レーン5-8)により釣られた。100pgのセンスオリゴ(レーン2と6)及びアンチセンスオリゴ(レーン1と5)をハイブリダイゼーション対照として負荷した。ヌクレオチドサイズマーカーを左に示す。b, miR172a-2のmiRNAのS1ヌクレアーゼマッピング。未消化(レーン1)か又は又は野生型(レーン2)、EAT-D(レーン3)、又はtRNA(レーン4)からの全RNAにハイブリダイゼーション後に消化した5'-エンド標識されたプローブ。

【図5】[0019] 図5は、miR172ファミリーメンバーの発現発現パターンを示す。a, 発芽の2、5、12、21日後に収穫された野生型の種苗(それぞれ、レーン1-4)から、又は成熟葉(レーン5)及び花のつぼみ(レーン6)からの全RNAのRT-PCR。PCRのためのプライマーを左に示す。b, 野生型(Col)と比較した、示された変異体のmiR172のノーザン分析。プロットは、miR172a-2に対するオリゴにより釣った;しかしながら、全てのmiR172がクロスハイブリダイズするべきである。

【図6】[0020] 図6は、仮想EAT標的遺伝子の発現分析を示す。a, 野生型(Col)又はEAT-D葉のつぼみから単離された、ポリA+ RNAのノーザン分析。ハイブリダイゼーションのためのプローブを右に示す。b, AP2抗体により釣った、野生型又はEAT-Dの花のつぼみからの蛋白質のウェスタンプロット。Rbcl, 負対照としての、リブローズ1, 5-ビスホスフェートカルボキシラーゼのラージサブユニット。

【図7】[0021] 図7は、LAT-Dの同定を示す。a, At2g28550とAt2g28560の間の、LAT-D中のT-DNA挿入物の位置。4X 35SエンハンサーはAt2g28550からの約5kbである。b, 野生型対LAT-D植物におけるAt2g28550発現のRT-PCR分析。

【図8】[0022] 図8は、EAT-DがLAT-Dに対して上位である。EAT-DとLAT-D植物の間の遺伝上のクロスであり、結果のF1植物をそれらの開花時間(ロゼット葉の数により測定)と共に示す。

【図9】[0023] 図9は、At2g28550(2-28550)とAt5g60120(6-60120)変異体の機能の損失を示す。各系のT-DNAの位置をイントロン/エクソン構造と共に示す。

【図10】[0024] 図10は、miR172のmiRNAファミリーの可能性のあ

10

20

30

40

50

る機能を示す。a, *mirR172a-2* 及びその親族の一過性発現が *AP2* 標的の一過性ダウン制御を誘導するかもしれない。b, 様々な位置におけるダイサー分割が、*mirR172* ファミリーから少なくとも4つの異なる *miRNAs* を生成するかもしれない (*miRNA* コンセンサス配列と共に単一のヘアピンとして示される)。各 *miRNA* の5' 及び3' エンドの配列を、楕円で示された不変の中央の15 nt と共に示す。個々の *miRNAs* により認識される仮想標的を、各々の下に括弧で示す。

【図11】[0025] 図11A-Cは、ニコチアナベンサミアナのフィットエンデサチユラーゼ (*PDS*) *mRNAs* を分割するようにデザインされた人工マイクロRNA (*miRNA*) を示す。図11Aは、*CaMV* の35Sプロモーター (35S) と *NOS* ターミネーター (*Tnos*) の制御下の *pre-miR159a* 配列構築物の構造を示す。成熟 *miRNA* の配置と位置を矢印により示す。図11Bは、*miR159a* (配列番号: 141) 中の点変異 (矢印により示される) が、それを *miR-PDS^{159a}* (配列番号: 142) に変換することにより、ニコチアナベンサミアナの *PDS* の *mRN* 中の領域の完全に相補になることを示す。図11Cは、アグロバクテリア浸潤ニコチアナベンサミアナ葉のノーザンブロット分析が、空のベクター (*vector*) 又は人工 *miRNA* (*miR-PDS^{159a}*) を浸潤させたサンプル中の、浸潤から1, 2, 3日後の (*d.p.i.*) *miR-PDS^{159a}*, *miR-PDS^{159a}** 及び *miR¹⁵⁹* の発現を示すことを示す。

【図12】[0026] 図12は、*miR-PDS^{159a}* (配列番号: 142) が *PDS mRNA* (配列番号: 143) の分割を引き起こすことを示す。図12Aは、浸潤の1又は2日後 (*d.p.i.*) の空のベクター又は *miR-PDS^{159a}* により浸潤されたサンプルからの *PDS mRNA* のノーザンブロット分析を示す (上部パネル)。図12Bは、*miRNA* の分割の部位を示す。5' RACE分析を、*miR-PDS^{159a}* 構築物により浸潤されたサンプルに実施したところ、6クローン中の5つの5' エンド配列が矢印により示されるとおりに *miRNA* の分割部位を示した。

【図13】[0027] 図13は、*miR-PDS^{169g}* の発現が *PDS mRNA* の分割をもたらすことを示す。図13Aは、それがそれを *miR-PDSa^{169g}* (配列番号: 145) 又は *miR-PDSb^{169g}* (配列番号: 146) に変換することにより、ニコチアナベンサミアナの *PDS* の *mRNA* 中の領域の完全に相補になる *miR169g* 中の点変異 (下線のヌクレオチド) を示す。図13Bは、2つの異なる *miR169g* 発現構築物のノーザンブロット分析を示す。全RNAを、非浸潤の葉から (C) 又は0.3 kb (0.3 kb) 又は0.2 kb (0.2 kb) 断片のコンテクストにて *pre-miR169g* 配列を含むアグロバクテリアを浸潤された葉から、又はアラビドプシスの葉 (+) から抽出した。矢印は、*miR169* シグナルの位置を示す。図13Cは、0.3 kbの構築物を含む浸潤された葉の中の *miR-PDSa^{169g}* (a) 及び *miR-PDS^{169g}* (b) の発現を示すノーザンブロットを示すが、対照においては含まず、空のベクター (*vector*) を用いた。図13Dは、*miRNA* の分割の部位を示す。5' RACE分析を、*miR-PDS^{156g}a* (配列番号: 145) 及び b (配列番号: 146) 構築物により浸潤されたサンプルに実施し、独立のクローンから同定された5' エンド配列を、矢印により、分析されたクローンの数と共に示す。 *PDS* の *mRNAs* は、配列番号: 147 及び配列番号: 148 である。図13Eは、空のベクター (C) 又は *miR-PDSa^{169g}* (a) 又は *miR-PDS^{169g}* (b) を発現する構築物を有するアグロバクテリア株を浸潤させた植物内の *PDS mRNA* レベルを検出するためのノーザンブロット分析を示す。

【図14】[0028] 図14A-Cは、ニコチアナベンサミアナの *rbcs mRNA* のマイクロRNA - 指向性分割を示す。図14Aは、*miR159a* (配列番号: 141) 内の点変異 (矢印により示される) がそれを *miR-rbcs^{159a}-A* (配列番号: 149) に変換することにより、全てのニコチアナベンサミアナの *rbcs* の *mRNAs* (*rbcs mRNA* と示す; 配列番号: 150) に共通の領域に対して相補にな

10

20

30

40

50

ることを示す。miRNA:mRNAの塩基対を垂直線により示し、そしてG:Uの揺らぎ(wobble)の塩基対をコロンにより示す。図14Bは、ニコチアナベンサミアナの葉を浸潤させたアグロバクテリアのノーザンブロット分析が、空のベクター(C)又は人工のmiRNA(A)を浸潤させたサンプル内で浸潤の2日後に(d.p.i.)miR-rbcS^{159a}-Aの発現を示すことを示す。図14Cは、RT-PCR分析を用いてBに示されるのと同じサンプル内で6つ全ての遺伝子についてのrbcSのmRNAの富裕性を検出した。EF1のmRNAの増幅は負荷対照として作用した。

【図15】[0029] 図15A-Bは、図11-14において示される作業において使用された遺伝子と関連配列の模式的描写を示す。図15Aは、ニコチアナベンサミアナからの完全なPDS遺伝子が公知でないため(セグメントの損失が破線により示される)、参照配列として用いられたリコペルシカムエスキュレンタムからのPDS遺伝子を示す。大きなグレーの矢印は、テキストにおいて記載されたmiR-PDS構築物により標的とされた位置を示す。小さな矢印は、5' RACE分析のために使用されたプライマーを示す。公知のニコチアナベンサミアナPDS断片を配列のオリジンと共に示す。図15Bは、本明細書にて描写されたrbcS遺伝子配列をアッセンブルするために使用された、別に報告された配列を示す。グレーの矢印は、miR-rbcS^{159a}-Aにより標的とされた配列の位置を示し、矢印は図14A-14Cにおいて示されたRT-PCR実験に使用されたプライマーの位置を示す。

【図16】[0030] 図16A-16Bは、アラビドプシスのmiR159aとmiR169gに導入された変化の要約を示す。図16Aは、miR159a(配列番号:141)と比較した、miR-PDS^{159a}(配列番号:142)とmiR-rbcS^{159a}-A(配列番号:149)の配列を示す。各ケースにおける塩基の変化に下線を引き、未修飾の位置は星印を付す。図16Bは、miR169g(配列番号:144)と比較した、miR-PDS^{169g}(配列番号:145)とmiR-PDSb^{169ga}(配列番号:146)の配列を示す。各ケースにおける塩基の変化に下線を引き、未修飾の位置は星印を付す。

【図17】[0031] 図17は、野生型、変異体及びトランスジェニック植物中のアラビドプシスの毛根の発生を示す。パネルA:野生型の毛根は多数の毛根構造を示す。パネルB:cpc変異体中の極めて僅かな毛根。パネルC:35S::CPC植物は、より多くの毛根を示す。パネルD:gl2変異体中の、より多い毛根。この図面は、Wadara((2002)Development 129:5409-5419)から引用される。

【図18】[0032] 図18は、トランスジェニック植物中のアラビドプシスの毛根の発生を示す。パネルa:XVE::pre-miRCPC1^{159a}のインデューサー(エストラジオール)なし。パネルb:XVE::pre-miRCPC1^{159a}のインデューサー(エストラジオール)あり。パネルc:XVE::pre-miR159aのインデューサー(エストラジオール)なし。パネルd:XVE::pre-miR159aのインデューサー(エストラジオール)あり。

【図19】[0033] 図19は、トランスジェニック植物中のアラビドプシスの毛根の発生を示す。パネルa:35S::pre-miR159。パネルb:35S::pre-miRCPC1^{159a}。パネルc:35S::pre-miRP69^{159a}。

【図20】[0034] 図20は、トランスジェニック植物中のアラビドプシスの毛根の発生を示す。パネルa:35S::pre-miR159。パネルb:35S::pre-miRCPC1^{159a}。

【図21A】[0035] 図21A-21Eは、重合体pre-miRNAをデザインするためのプロセスのダイアグラムを表す。図21A:3つの異なるpre-miRNAsの増幅の生成物(pre-miR A, pre-miR B及びpre-miR C)であって、AvrII, SpeI及びXhoI部位が増幅により追加された。

【図21B】図21B:pre-miR AをSpeI及びXhoIにより消化して、pre-miR BをAvrII及びXhoIにより消化する。

10

20

30

40

50

【図 2 1 C】図 2 1 C：消化された pre-miR A と pre-miR B を連結することにより、ダイマーの pre-miRNA を形成する。

【図 2 1 D】図 2 1 D：-miR A - B を Spe I 及び Xho I で消化して、pre-miR C を Avr II 及び Xho I で消化する。

【図 2 1 E】図 2 1 E：消化された pre-miR A - B と pre-miR C を連結することにより三重合体 pre-miRNA を形成させる。

【図 2 2】[0036] 図 2 2 は、pre-miR PDS 1^{169g} と pre-miR CPC 3^{159a} を含むダイマー構築物のダイアグラムである。

【図 2 3】[0037] 図 2 3 A 及び 2 3 B は、成熟 miR DPS 1^{169g} (図 2 3 A) 及び miR CPC 3^{159a} (図 2 3 B) の上記ダイマー構築物からの生産が成功したことを示す。レーン 1 は、35S::pre-miR PDS 1^{169g} であり、レーン 2 は 35S::CPC 3^{159a} であり、そしてレーン 3 は 35S::pre-miR PDS 1^{169g} - CPC 3^{159a} である。

【図 2 4】[0038] 図 2 4 は、miR 159a 前駆体 (配列番号：161) の構造を示す。

【図 2 5】[0039] 図 2 5 は、miR-HC-Pro^{159a} のノーザンブロット分析が、3つの異なる処置：(1) 35S::pre-miR-HC-Pro^{159a} によりアグロバクテリアの細胞を処置、(2) 35S::HC-Pro によりアグロバクテリアの細胞を処置、そして (3) 35S::pre-miR-HC-Pro^{159a} 及び 35S::HC-Pro によりアグロバクテリアの細胞を処置、と共に実施されたことを示す。

【図 2 6】[0040] 図 2 6 は、miR-P69 のノーザンブロット分析を示し、4つの異なる処置を実施した：(1) 35S::pre-miR-P69^{159a} によりアグロバクテリアの細胞を処置、(2) XVE::pre-miR-P69^{159a} によりアグロバクテリアの細胞を処置、(3) 35S::P69 を有するアグロバクテリアの細胞、及び (4) 35S::pre-miR-P69^{159a} 及び 35S::P-P69 を有するアグロバクテリアの細胞。

【図 2 7】[0041] 図 2 7 は、ランダムに拾い上げた T₂ 35S::pre-miRHC-Pro^{159a} トランスジェニック系列 (植物) の成熟人工 miRNA レベルのノーザンブロット分析を示す。当該 T₂ 植物はトランスジェニックであることが知られているが、それらが WT を除去するために Kan 含有培地上で最初に選択されたからである。当該 T₂ 植物はヘテロ接合体 (1 コピー) 又はホモ接合体 (2 コピー) の何れかであり、比は 2 : 1 であるべきである。

【図 2 8】[0042] 図 2 8 は、ランダムに拾い上げた T₂ 35S::pre-miR-P69^{159a} トランスジェニック系列 (植物) の成熟人工 miRNA レベルのノーザンブロット分析を示す。

【図 2 9】[0043] 図 2 9 は、miR-HC-Pro^{159a} 人工 miRNA を発現する T₂ トランスジェニック植物が TuMV 感染に耐性であることを示す。写真は接種の 2 週間後に (感染の 14 日後に) 撮られた。miR-HC-Pro^{159a} を発現する T₂ トランスジェニック植物 (系列 # 11 ; 図 3 3 B) は、正常なインフルオレッセンスを発したが、WT と miR-P69^{159a} を発現する T₂ トランスジェニック植物 (系列 # 1 ; 図 3 3 B) は、ウイルス感染の兆候を示した。バーは 3 cm を表す。

【図 3 0】[0044] 図 3 0 は、TuMV 感染により引き起こされたインフルオレッセンスの兆候を示す。(上のパネル) TuMV 感染の 14 日後、T₂ トランスジェニック miR-P69^{159a} 植物 (系列 # 11) と col-0 植物はインフルオレッセンス内の花の間の短い節間を示したが、T₂ miR-HC-Pro^{159a} トランスジェニック植物 (系列 # 11) は正常なインフルオレッセンスの発生を呈した。バーは 1 cm を表す。(下部のパネル) TuMV 感染したアラビドプシス植物の上のインフルオレッセンスのクローズアップ観察。T₂ トランスジェニック miR-P69^{159a} 植物 (系列 # 11) と col-0 植物は、老化期と受粉の欠損を示したが、T₂ トランスジェニック miR

10

20

30

40

50

- H C - P r o ^{1 5 9 a} 植物 (系列 # 1 1) は正常な花と長角果の発生を示した。偽の感染に関しては、植物にバッファのみを接種した。バーは 0 . 2 c m を表す。

【図 3 1】 [0 0 4 5] 図 3 1 は、T u M V 感染により引き起こされる長角果の兆候を示す。T u M V 感染した T₂ トランスジェニック m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} 植物 (系列 # 1 1) 及び W T (c o l - 0) 植物においては、長角果が小さくて発生不全であった (m a l l - d e v e l o p e d) 。 T₂ トランスジェニック m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} 植物 (系列 # 1 1) は、T u M V 感染に対して耐性であり、正常な長角果の発生を示した。バッファを接種した植物 (偽接種された) を対照として用いた。バーは 0 . 5 c m を表す。

【図 3 2】 [0 0 4 6] 図 3 2 は、異なるトランスジェニックと W T 植物の葉における T u M V コート蛋白質 (C P) のレベルのウエスタンブロット分析を示す。

【図 3 3】 [0 0 4 7] 図 3 3 は、(A) 3 5 S : : m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} , 3 5 S : : m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} , 及び W T (C o l - 0) 及びの代表的植物のウエスタンブロット分析及び (B) トランスジェニック植物により生産された m i R N A s のノーザンブロット分析を示す。

【図 3 4】 [0 0 4 8] 図 3 4 は、異なるトランスジェニック及び非トランスジェニックアラビドプシスにおける T u M V の E L I S A 検出を示す。

【図 3 5】 [0 0 4 9] 図 3 5 は、ホモ - ダイマー m i R N A 前駆体、p r e - m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} - H C - P r o ^{1 5 9 a} が成熟 m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} 及び m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} を生産可能なことを示す、p r e - m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} , p r e - m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} 及び p r e - m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} - H C - P r o ^{1 5 9 a} のノーザンブロット分析を示す。

【図 3 6】 [0 0 5 0] 図 3 6 は、m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} を C P C 遺伝子のイントロン 1 又はイントロン 2 の何れかの中に置いた構築物を示す。

【図 3 7】 [0 0 5 1] 図 3 7 は、図 3 6 の構築物のノーザンブロット分析を示し、そして C P C 転写物のイントロン 1 とイントロン 2 を用いて人工の m i R N A s を生産できることを証明する。

【図 3 8】 [0 0 5 2] 図 3 8 は、p r e - m i R - H C - P r o ^{1 5 9 a} をイントロン 1 又はイントロン 2 の何れかの中に置いて、且つ p r e - m i R - P 6 9 ^{1 5 9 a} を C P C 遺伝子のイントロン 2 又はイントロン 1 の何れかの中に置いた構築物を示す。

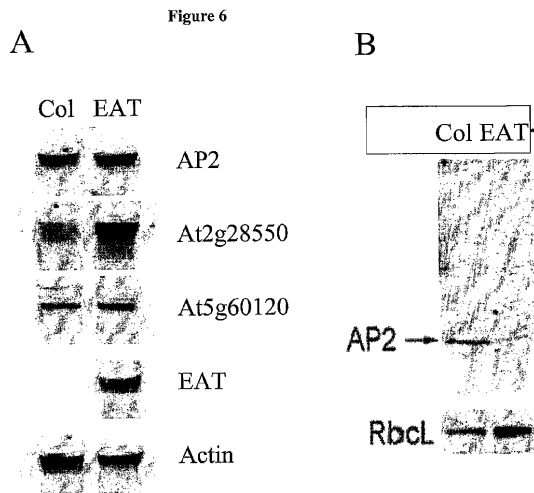
【図 3 9】 [0 0 5 3] 図 3 9 は、図 3 8 の構築物のノーザンブロット分析を示し、そしてそれが 2 つの異なる人工 m i R N A s を同時に一つの転写物中にて生産するために C P C イントロンを使用できることを証明する。

10

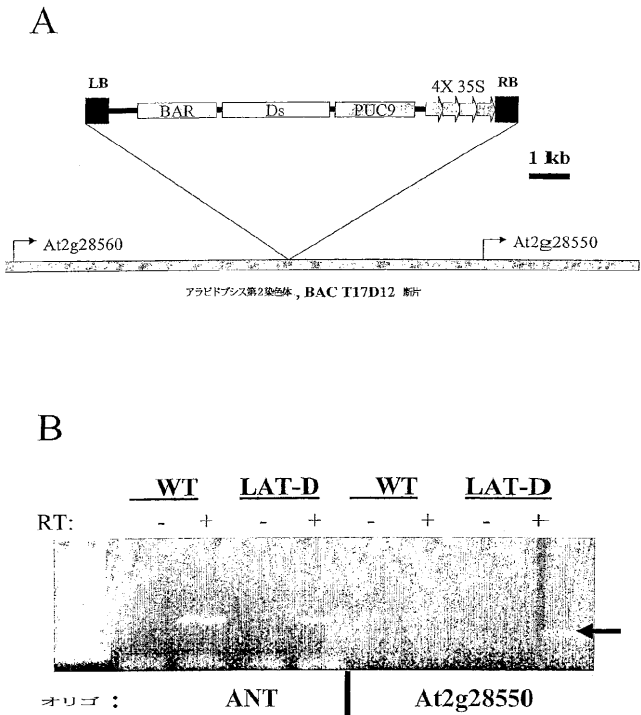
20

30

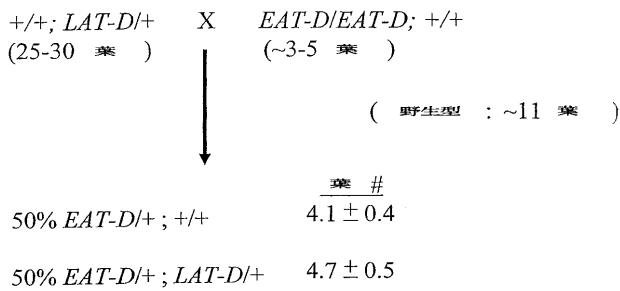
【図 6】



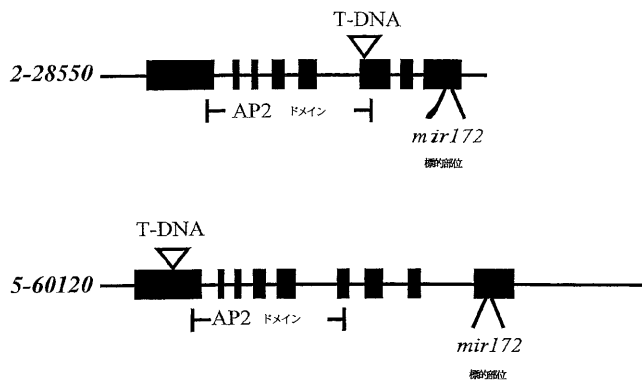
【図 7】



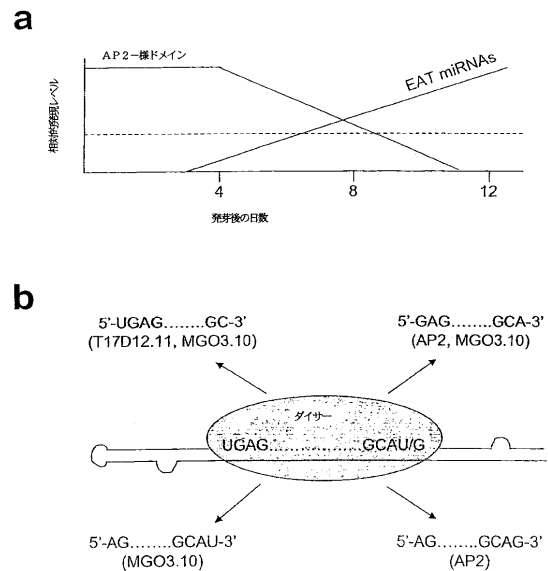
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【図 1 1】

FIG. 11A

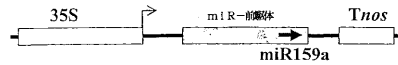


FIG. 11B

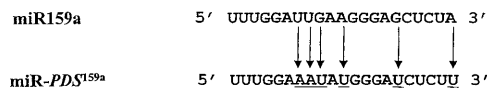
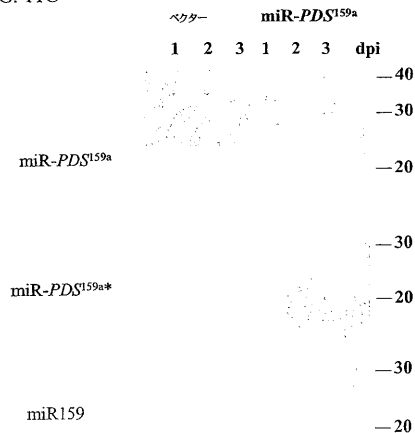


FIG. 11C



【図 1 2】

FIG. 12A

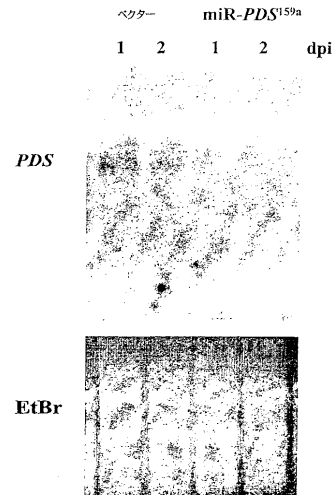
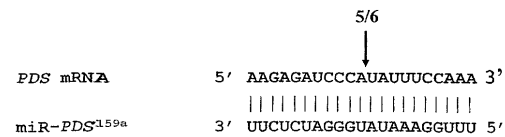


FIG. 12B



【図 1 3】

FIG. 13A

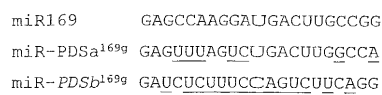


FIG. 13B

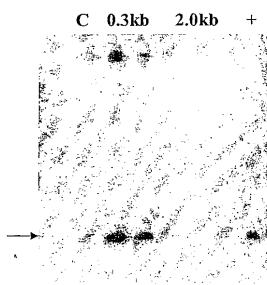


FIG. 13C

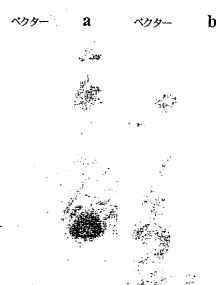


FIG. 13D

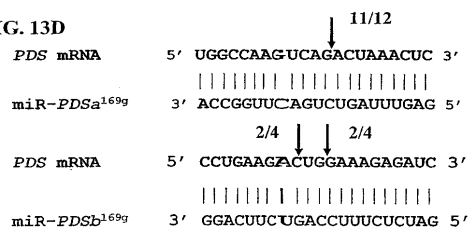
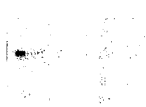
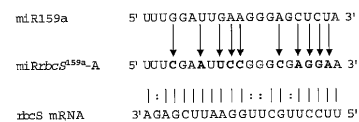


FIG. 13E



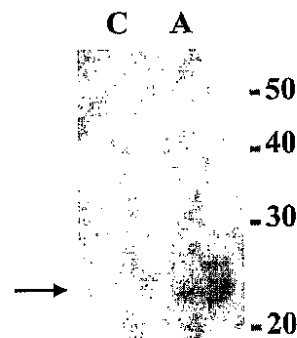
【図 1 4 A】

Fig. 14 A

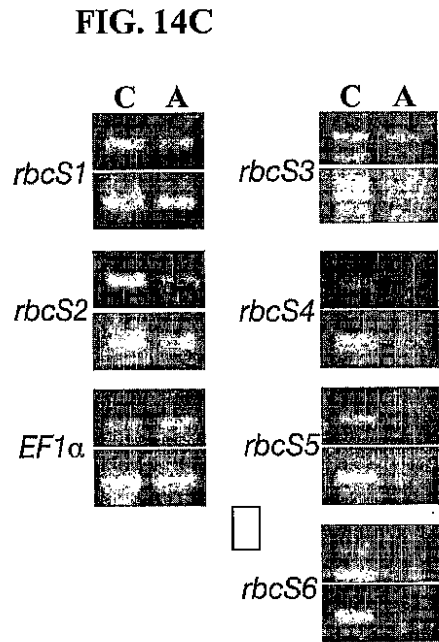


【図 1 4 B】

FIG. 14B



【 図 1 4 C 】



【 図 1 5 】

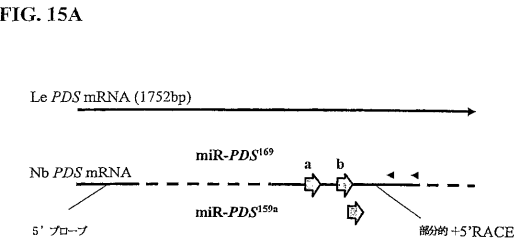
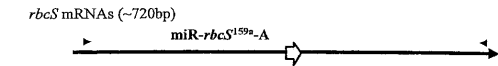


FIG. 15B



【 図 1 6 A 】

FIG. 16A

miR159a 5' UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA 3'
miR-PDS159a 5' UUUGGAAAUAUGGGAUCUCUU 3'
miR-rbcS159a-A 5' UUUCGAUUCCGGCCGAGGAA 3'
*** **

【 図 1 6 B 】

FIG. 16B

miR169g 5' GAGCCAAGGAUGACUUGCCGG 3'
miR-PDS169g 5' GAGUUUAGUCUGACUUGGCCA 3'
miR-PDSb169g 5' GAUCUCUUCCAGUCUUCAGG 3'
** *

【 図 1 7 】

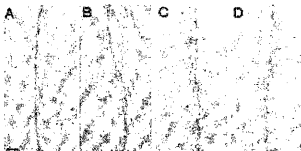


Figure 17

【 図 1 9 】

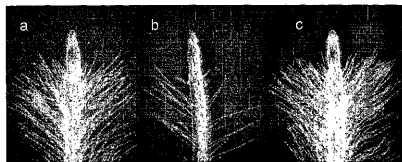


Figure 19

【 図 1 8 】

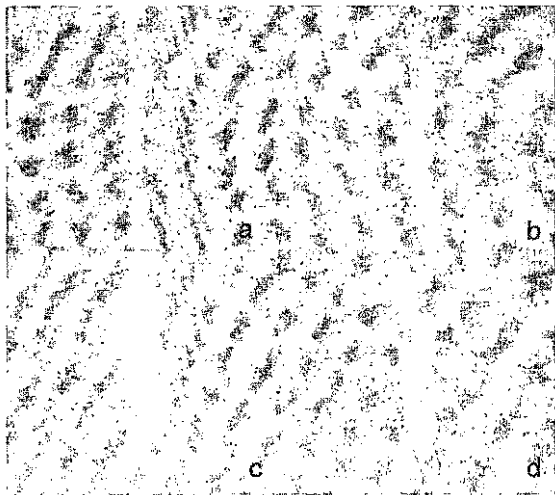


Figure 18

【 図 2 0 】

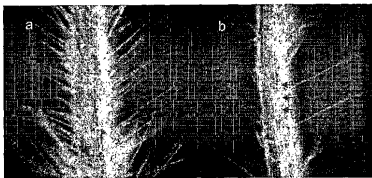


Figure 20

【 図 2 1 A 】

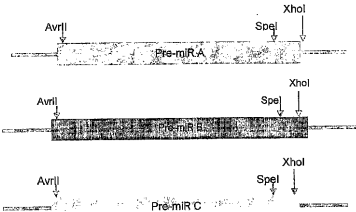
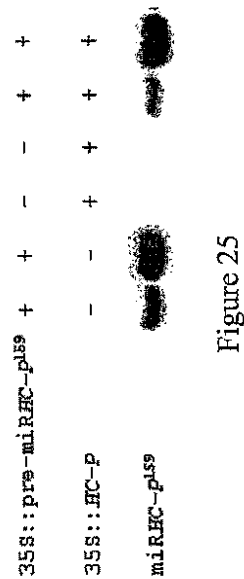
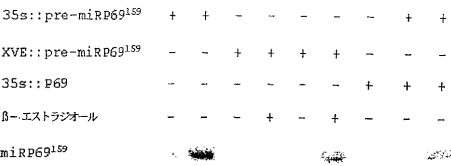


FIG. 21A

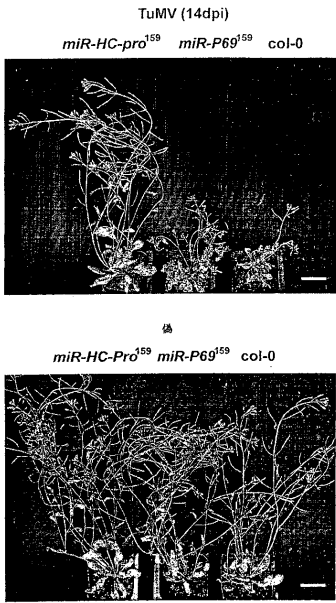
【 図 2 5 】



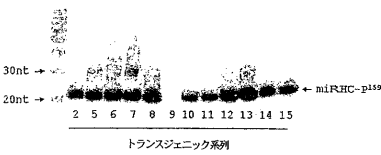
【 図 2 6 】



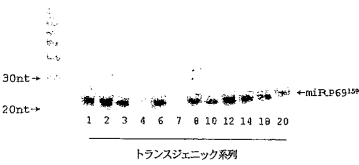
【 図 2 9 】



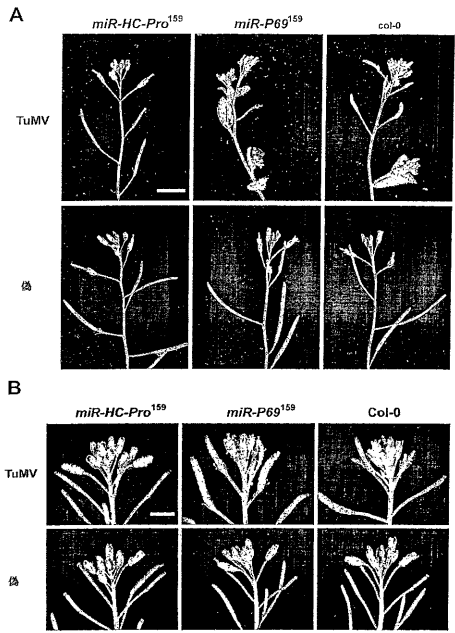
【 図 2 7 】



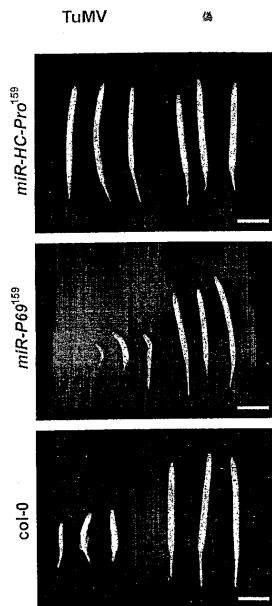
【 図 2 8 】



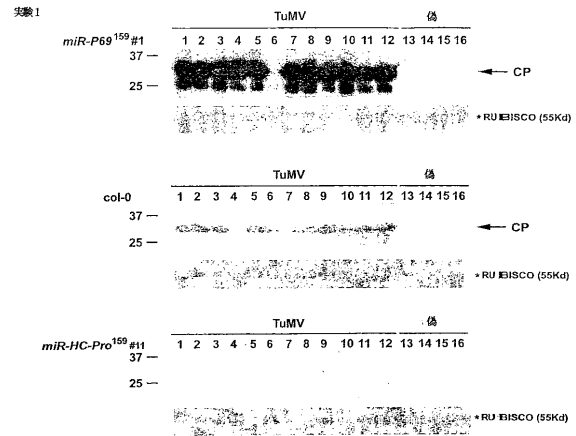
【 図 3 0 】



【図 3 1】



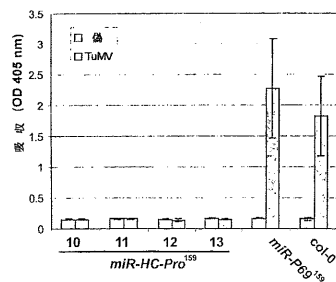
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】

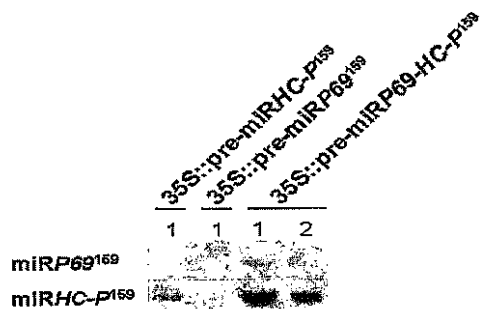
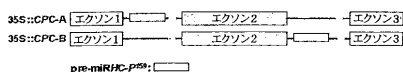


Figure 35

【図 3 6】



【図 3 7】

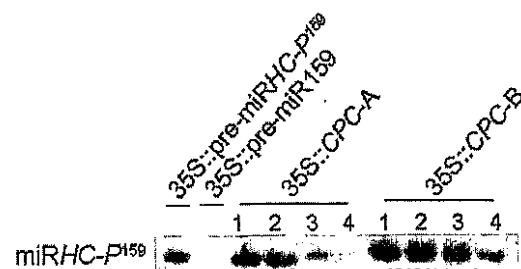


Figure 37

【図 3 8】



【 図 3 9 】

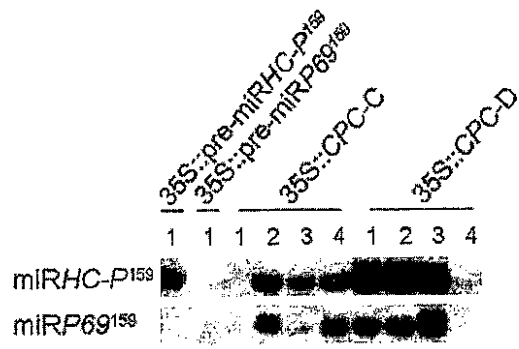


Figure 39

【 配 列 表 】

2008522585000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/36373																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12N 15/63(2006.01),15/82(2006.01),15/85(2006.01) C12N 5/10(2006.01),5/14(2006.01),5/16(2006.01) USPC: 435/455,419,468;800/278,285,286 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/455, 419, 468; 800/278, 285, 286 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, Agricola, CAPUS, Biosis																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X --- Y</td> <td>US 2004/0053411 A1 (CULLEN et al) 18 March 2004 (18.03.2004), pages 1, 3, 4, 7-9, 14, 15</td> <td>1-3, 43-45 ----- 4, 19, 46, 60</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>HUNTER et al. Missing links: miRNAs and plant development. Curr. Opin. Genet. Dev. 2003, Vol. 13, pages 372-378, see whole document.</td> <td>1-4, 19, 43-46, 60</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KHVOROVA et al. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 17 October 2003, Vol. 115, pages 209-216, see whole document</td> <td>1-4, 19, 43-46, 60</td> </tr> <tr> <td>X --- Y</td> <td>BODEN et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. Nucl. Acids Res. 13 February 2004, Vol. 32, No. 3, pages 1154-1158, see pages 1155-1157.</td> <td>1, 2 ----- 43, 44</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>RHOADES et al. Prediction of plant microRNA targets. Cell. 23 August 2002, Vol. 110, pages 513-520, see whole document.</td> <td>1-4, 19, 43-46, 60</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X --- Y	US 2004/0053411 A1 (CULLEN et al) 18 March 2004 (18.03.2004), pages 1, 3, 4, 7-9, 14, 15	1-3, 43-45 ----- 4, 19, 46, 60	A	HUNTER et al. Missing links: miRNAs and plant development. Curr. Opin. Genet. Dev. 2003, Vol. 13, pages 372-378, see whole document.	1-4, 19, 43-46, 60	A	KHVOROVA et al. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 17 October 2003, Vol. 115, pages 209-216, see whole document	1-4, 19, 43-46, 60	X --- Y	BODEN et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. Nucl. Acids Res. 13 February 2004, Vol. 32, No. 3, pages 1154-1158, see pages 1155-1157.	1, 2 ----- 43, 44	A	RHOADES et al. Prediction of plant microRNA targets. Cell. 23 August 2002, Vol. 110, pages 513-520, see whole document.	1-4, 19, 43-46, 60
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X --- Y	US 2004/0053411 A1 (CULLEN et al) 18 March 2004 (18.03.2004), pages 1, 3, 4, 7-9, 14, 15	1-3, 43-45 ----- 4, 19, 46, 60																		
A	HUNTER et al. Missing links: miRNAs and plant development. Curr. Opin. Genet. Dev. 2003, Vol. 13, pages 372-378, see whole document.	1-4, 19, 43-46, 60																		
A	KHVOROVA et al. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 17 October 2003, Vol. 115, pages 209-216, see whole document	1-4, 19, 43-46, 60																		
X --- Y	BODEN et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. Nucl. Acids Res. 13 February 2004, Vol. 32, No. 3, pages 1154-1158, see pages 1155-1157.	1, 2 ----- 43, 44																		
A	RHOADES et al. Prediction of plant microRNA targets. Cell. 23 August 2002, Vol. 110, pages 513-520, see whole document.	1-4, 19, 43-46, 60																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Special categories of cited documents:</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Special categories of cited documents:			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Special categories of cited documents:																				
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																		
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																		
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family																		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																			
Date of the actual completion of the international search 01 September 2006 (01.09.2006)		Date of mailing of the international search report 02 OCT 2006																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Ashwin Mehta Telephone No. 571 272-1600																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/36373

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	McMANUS et al. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. RNA. 2002, Vol. 8,	1, 2
—	pages 842-850, see pages 843-844.	43, 44
Y		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/36373

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-18, 26-42, 47-59, 67-90
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Group I, 1-4, 19, 43-46, 60

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/36373

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-4, 19, 43-46, 60, drawn to a first method, for down regulating a target sequence in a cell, comprising introducing into the cell a nucleic acid construct comprising a polynucleotide encoding a modified miRNA precursor capable of forming a double-stranded RNA or a hairpin, wherein the miRNA is fully complementary to the target sequence; or wherein the method comprising introducing two or more of said polynucleotides.

Group II, claim(s) 1-4, 19, 43-46, 60, drawn to a second method, for down regulating a target sequence in a cell, comprising introducing into the cell a nucleic acid construct comprising a polynucleotide encoding a modified miRNA precursor capable of forming a double-stranded RNA or a hairpin, wherein the miRNA is fully complementary to the target sequence except for GU base pairing; or wherein the method comprising introducing two or more of said polynucleotides.

Group III, claim(s) 1-4, 19, 43-46, 60, drawn to a third method, for down regulating a target sequence in a cell, comprising introducing into the cell a nucleic acid construct comprising a polynucleotide encoding a modified miRNA precursor capable of forming a double-stranded RNA or a hairpin, wherein the miRNA is fully complementary to the target sequence in the first ten nucleotides counting from the 5' end of the miRNA; or wherein the method comprising introducing two or more of said polynucleotides.

Group IV, claim(s) 20-23, 61-64, drawn to a first product, an isolated nucleic acid construct comprising a polynucleotide encoding a modified miRNA precursor capable of forming a double-stranded RNA or a hairpin, wherein the miRNA is fully complementary to the target sequence; or wherein the nucleic acid construct comprises two or more of said polynucleotides.

Group V, claim(s) 20, 21, 24, 25, 61, 62, 65, 66, drawn to a second product, an isolated nucleic acid construct comprising a polynucleotide encoding a modified miRNA precursor capable of forming a double-stranded RNA or a hairpin, wherein the miRNA is fully complementary to the target sequence except for GU base pairing; or wherein the method comprising introducing two or more of said polynucleotides.

Group VI, claim(s) 20, 21, 61, 62, drawn to a third product, an isolated nucleic acid construct comprising a polynucleotide encoding a modified miRNA precursor capable of forming a double-stranded RNA or a hairpin, wherein the miRNA is fully complementary to the target sequence in the first 10 nucleotides counting from the 5' end of the miRNA; or wherein the method comprising introducing two or more of said polynucleotides.

Claims 5-18, 26-42, 47-59, and 67-90 are multiple dependent claims and are not searchable.

The inventions listed as Groups I-VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the technical feature shared between the groups is a polynucleotide encoding a miRNA that has complementarity to the target sequence, either fully complementary, fully complementary except for GU base pairing, or only complementary in the first 10 nucleotides to the target sequence. US 2004/0053411 (published 18 March 2004) teaches a method of inhibiting expression of a gene in a plant cell, comprising expressing a miRNA precursor

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.**
PCT/US05/36373

having a stem loop structures and that complementarity in at least the first 10 nucleotides starting at the 5' end, to the target sequence (page 5, paragraph [0047]-page 7, paragraph [0060]; page 14, claims; drawings, sheet 3). The shared technical feature is therefore not special.

フロントページの続き

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

(72)発明者 トボダ, ジョーズ・レイジェス
メキシコ国 メキシコ・シティー, コロンビア・ロレンソ・ボトゥリニ, スル 81 ナンバー 409

(72)発明者 チャン, シューレン
アメリカ合衆国ニューヨーク州10021, ニューヨーク, イースト・シックスティサード・ストリート 504, アpartment 7エス

(72)発明者 征矢野 敬
アメリカ合衆国ニューヨーク州10022, イースト・フィフティーサード・ストリート 320, アpartment 10エイチ

(72)発明者 チュア, ナム・ハイ
アメリカ合衆国ニューヨーク州10021, ニューヨーク・イースト・セブンティセカンド・ストリート 422, アpartment 33シー

(72)発明者 ニュ, クィー・ウェン
アメリカ合衆国ニューヨーク州10310, スターテン・アイランド, デラフィールド・プレイス 100

(72)発明者 リン, シー・シュン
アメリカ合衆国ニューヨーク州10021, ニューヨーク, イースト・シックスティサード・ストリート 500, アpartment 21エフ

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD05 CA17 CB02
4B024 AA08 BA79 CA02 CA09 CA11 DA01 EA04
4B065 AA88X AA88Y AB01 AC20 BA02 CA53