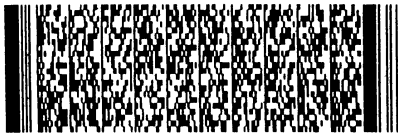


申請日期：	案號：87118646
類別：	

(以上各欄由本局填註)

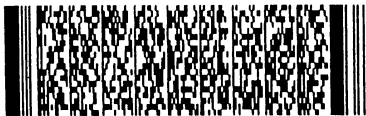
發明專利說明書		
一、 發明名稱	中 文	
	英 文	
二、 發明人	姓 名 (中文)	5. 阿蘭 賽藍登
	姓 名 (英文)	5. ALAIN SAILLAND
	國 籍	5. 法國
	住、居所	5. 法國里昂市亞伯特查琳耐厄路38號
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	
	姓 名 (名稱) (英文)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代表人 姓 名 (中文)	
	代表人 姓 名 (英文)	
		

本案已向

國(地區)申請專利	申請日期	案號	主張優先權
法國 FR	1997/11/07	97 14264	有

有關微生物已寄存於	寄存日期	寄存號碼
-----------	------	------

無

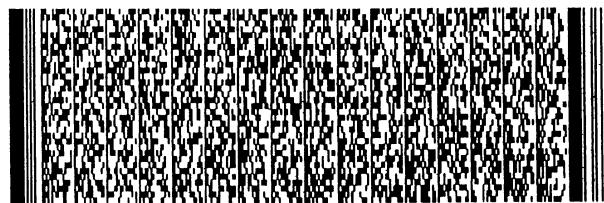
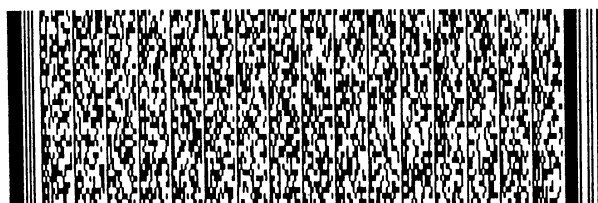


五、發明說明 (1)

本發明係關於編碼突變的羥苯基丙酮酸鹽二加氧酶(HPPD)之核酸序列，包含此序列作為編碼序列之嵌合基因，及其在分離對某些除草劑具有抗性之植物上的用途。

羥苯基丙酮酸鹽二加氧酶是催化對-羥苯基丙酮酸鹽(HPP)轉殖為黑尿酸鹽之反應的酵素。該反應在鐵(Fe^{2+})的存在下和氧的存在下發生(克洛奇(Crouch) N.P. 等人, Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, 1997)。可假設該HPPDs含有能夠催化該反應的活性部位，其中鐵、受酶質和水分子被連結在一起，但這種活性位置然到目前為止尚未有人說明。

亦已知有些分子抑制該酵素，且其與該酵素競爭性地結合，以便抑制HPP轉殖為黑尿酸鹽。有些這種分子已經作為除草劑使用，因為在植物中抑制該反應，導致被處理之植物的葉片變白，並使該植物死亡(帕黑特(Pallett) K.E. 等人, 1997 Pestic. Sci. 50 83-84)。以HPPD為目標，並曾在相關技藝中述及的除草劑特定言之為異噁唑類(歐洲專利418 175號、歐洲專利470 856號、歐洲專利487 352號、歐洲專利527 036號、歐洲專利560 482號、歐洲專利682 659號、美國專利第5 424 276號)，特定言之是異沙服托(isoxaflutole)，其為玉蜀黍的選擇性除草劑，二酮腈(歐洲專利496 630號、歐洲專利496 631號)，特定言之2-氟基-3-環丙基-1-(2- SO_2CH_3 -4- CF_3 苯基)丙烷-1,3-二酮和2-氟基-3-環丙基-1-(2- SO_2CH_3 -4-2,3 Cl_2 苯基)丙烷-1,3-二酮，三酮類(歐洲專利625 505號、歐洲專利625 508號、美國專利第5,506,195號)，特定言之蘇康三酮



五、發明說明 (2)

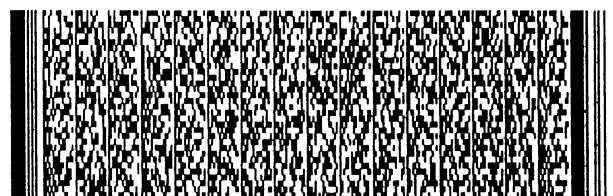
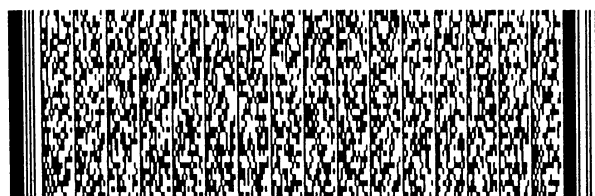
(sulcotrione) , 或另外的吡唑啉酸鹽 (pyrazolines) 。

使植物能耐受除草劑之主要策略有三種，亦即(1)利用可轉殖除草劑或其活性代謝物形成無毒性降解產物的酵素去除該除草劑之毒性如，例如耐受溴氧尼爾(bromoxynil)或巴斯塔(basta)的酵素(歐洲專利242 236號、歐洲專利337 899號)；(2)使目標酵素突變成對該除草劑或其活性代謝物較不敏感之功能性酵素，如，例如耐受草甘膦賽(glyphosate)的酵素(歐洲專利293 356號，帕吉特(Padgette) S.R. 等人, J. Biol. Chem., 266, 33, 1991)；或(3)過度表現敏感的酵素，使得目標酵素在該植物中產生的量充份相當於除草劑的量，由於該酵素的動力學常數，使得儘管有抑制劑的存在，仍有足夠的功能性酵素可以利用。

由於前述的第三個策略可成功地獲得耐受HPPD抑制劑之植物(WO 96/38567)，因此明瞭到這是第一次成功地使用這個簡單地過度表現該(非-突變)敏感之目標酵素的策略為植物賦與農業水準的除草劑耐受性。

儘管已成功利用簡單地過度表現目標酵素之策略，但仍需要改善該系統對HPPD抑制劑之耐受性，以便在無論何種條件下培養耐受性植物，或是在田野中使用任何商業劑量之除草劑時，均可獲得耐受性。

因此，本發明首先係關於突變的HPPD，其雖有功能，也就是所謂保留其催化HPP轉殖為黑尿酸鹽之特性，但比突變之前的天然HPPD對HPPD抑制劑較不敏感。



五、發明說明 (3)

從抑制作用的競爭特性來看，可假設該HPPD抑制劑與該酵素之活性部位結合，或在鄰近該活性部位之處結合，以便阻斷HPP接近該活性部位，並在鐵和水的存在下防止其轉殖。藉著突變來進行限制抑制劑接近該酵素之活性部位，同時保護HPP安全接近該活性部位的突變，則有可能獲得對HPPD抑制劑較不敏感之功能性突變酵素。

然後發現，藉由酵素C-末端部份發生突變，可能獲得對HPPD抑制劑較不敏感之功能性HPPDs，以使這些功能性HPPDs在植物中的表現可改善該植物對HPPD抑制劑的耐受性。

因此，本發明係關於新穎的功能性突變HPPD，其對HPPD抑制劑較不敏感，並在其C-末端部份含有至少一處突變。

根據本發明，"突變"或了解係指以另一個胺基酸置換原來序列中的胺基酸。在下文中將使用"突變的胺基酸"的說法來表示被另一個胺基酸置換的胺基酸，藉此指出在蛋白質原來序列中的突變位置。

已經在相關技藝中曾說明數種HPPDs及其原來序列，特定言之是細菌的HPPDs，如：假單胞菌(Pseudomonas)(魯奇(Ruetschi)等人，Eur. J. Biochem. 205, 459-466, 1992, WO 96/38567)，植物的HPPDs，如：芥菜(Arabidopsis)(WO 96/38567, Genbank AF047834)，或胡蘿蔔(WO 96/38567, Genbank 87257)，球蟲的(HPPD)(Coccidoides)(Genbank COITRP)，或哺乳動物的HPPD，如：小白鼠或豬。

經由採用相關技藝常用之方法，排列這些已知的序列，



五、發明說明 (4)

如，例如湯普遜(Thompson), J.D. 等人說明的方法(克魯斯塔(CLUSTAL), W: 經由將序列加重、位置-特異性的間隙罰則和重量母質的選擇，來改善漸進性多重序列的敏感性(improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22; 4673-4680, 1994)，並透過網際網路，利用電腦程式排列序列，例如：習此技藝者可參照序列與參考序列序之同質性，並找出關鍵胺基酸或其他限定之共同區域，使其有可能根據此參考序列，特別地定出C-末端區和N-末端區。

在本發明的案例中，參考序列為假單胞菌的序列，所有有關特定胺基酸位置的定義和指示均依據原來的假單胞菌HPPD序列。附圖1說明相關技藝曾說明之數種HPPD序列之排列；這些序列與作為參考序列的假單胞菌HPPD序列共同排列，並包括艾菲爾鏈黴菌(*Streptomyces avermitilis*) (Genebank SAV11864)、胡蘿蔔(*Daucus carota*)(Genebank DCU 87257)、擬南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)(Genebank AF047834)、玉蜀黍(*Zea mais*)、大麥(*Hordeum vulgare*)(Genebank HVAJ693)、禾生球腔菌(*Mycosphaerella graminicola*)(Genebank AF038152)、伊米提球蟲(*Coccicoides immitis*)(Genebank COITRP)和老鼠(*Mus musculus*)(Genebank MU54HD)的HPPD序列。該圖提供假單胞菌序列之胺基酸的編號，及這些序列共同的胺基酸，以星號標記這些胺基酸。以這種排列為基礎，很



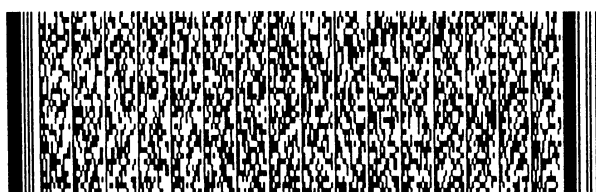
五、發明說明 (5)

容易藉著其位置及其性質，從假單胞菌胺基酸之定義中判別認出在另一個HPPD序列中相對應的胺基酸位置(將不同植物、哺乳動物和細菌來源的序列排列，證實熟諳此藝者已熟知這種排列方法，可概括應用在任何其他序列)。不同HPPD序列之排列亦說明於專利申請案WO 97/49816號中。

HPPDs之C-末端部份係酵素之活性部位所在，其與N-末端部份的差異在於確保該酵素穩定性的連接肽，及寡聚合作用(假單胞菌HPPD是四聚體，而植物HPPDs是二聚體)，如圖2所示之假單胞菌HPPD單體之三級結構的圖表說明所證實的。藉著研究結晶X-光繞射的傳統方法獲得此結構。連接肽使其可能劃分該酵素之C-末端部份之N-末端，以假單胞菌為例，該肽係位在胺基酸145到157之間(參照圖1)。

因此，C-末端部份之定義可為一方面由連接肽所定義之序列，另一方面由該酵素之C-末端所定義的序列組成，因此在HPPD之C-終端部份引起之突變即在此限定的區域中進行。以假單胞菌序為例，附圖1所示之序列排列所出示之全部序列中，將注意到在位置161和162之處的兩個胺基酸(D=Asp161和H=His162)。以假單胞菌HPPD而言，因此代表HPPD之C-末端部份的N-末端的連接肽之定義為位在胺基酸Asp161上游大約5到15個胺基酸之間。

根據本發明較佳的具體實施例，突變之進行係以位阻較大之胺基酸，或以離子化或可離子化之胺基酸置換其中之胺基酸。較佳係在低位阻之胺基酸上進行突變。根據本發



五、發明說明 (6)

明，低位阻的較佳胺基酸咸了解為甘胺酸或脯胺酸。

根據本發明之突變，可使用任何比被置換之胺基酸顯示出具有更大位阻的胺基酸。最好以下列胺基酸來置換突變位置的胺基酸：白胺酸、異白胺酸或色胺酸。

根據本發明，咸了解離子化或可離子化胺基酸為具有，除了可進入肽鍵的基團外，尚可具有胺基、羧酸(COOH)或銨或-COO⁻基團之任何胺基酸。具有此性質之較佳胺基酸如下：穀胺醯胺和穀胺酸。

根據本發明之較佳具體實施例，在數個HPPD序列共同的C-末端部份之胺基酸上進行突變，有可能藉著序列排列方法來判別這些序列。

根據本發明特定具體實施例，突變的HPPD在其C-末端部份包含下列肽序列：

-Phe-Xaa-Glu-Xab-Asn-Phe-

其中Xaa和Xab分別代表甘胺酸(Gly)或位阻大於甘胺酸的胺基酸，咸了解，如果Xaa或Xab代表Gly，此時另一個胺基酸則與Gly不同。Xaa和Xab中宜至少有一個代表Leu、Glu、Trp或Ile。

以假單胞菌HPPD序列而言，突變的胺基酸係選自下列胺基酸：Pro215、Gly298、Gly332、Phe333、Gly334和Gly336，更佳的是胺基酸Pro215和Gly336。

可提及下列較佳的突變實例：Pro215Leu、Gly336Glu、Gly336Trp或Gly336Ile。

咸了解瞭上述突變可成對組合，如，例如胺基酸Gly334和Gly336的雙重突變。



五、發明說明 (7)

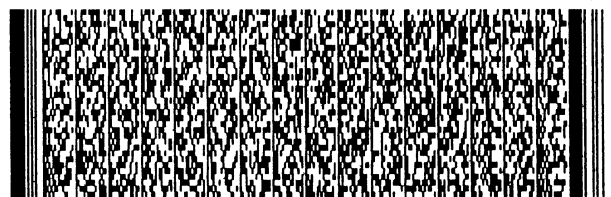
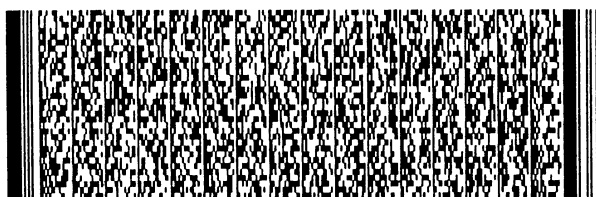
本發明亦關於編碼上述突變之HPPD之核酸序列。根據本發明，咸了解"核酸序列"是核苷酸序列，可以是DNA或RNA型，較佳是DNA型，且特別指雙股，無論其為天然或合成來源，尤其指其中編碼根據本發明之突變HPPD之編碼子的DNA序列，將根據在其中表現之宿主生物，利用熟諳此藝者所熟知之發揮最大效用的方法，使其發揮最大效用。

編碼原始未突變HPPD之序列可以來自任何來源。特定言之，它可以來自細菌。可被提及的有利實例是假單胞菌屬的細菌，例如螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)，或集胞藻屬(*Synechocystis*)的藍藻細菌。該序列亦可來自植物，特別是衍生自雙子葉植物者，如，菸草、芥菜、繖形植物，如：胡蘿蔔，或單子葉植物，如：玉蜀黍或小麥。該編碼序列，及其分離法和選殖法均說明於前文提及之參考文獻中，其內容已以提及之方式併入本文中。

編碼原始未突變之HPPD的核酸序列中，可利用任何適合使用相當於欲置換之胺基酸的編碼子來置換該序列中編碼突變胺基酸之編碼子的方法來進行突變，該編碼子已廣泛地述於文獻中，並係熟諳此技藝者所熟知。

可利用數種分子生物學方法來達成該突變。

第一個方法包括使細胞培養物在突變劑的存在或缺乏下，接受HPPD抑制劑的長期選拔壓力，此時HPPD基因在該選拔壓力及適當時在突變劑的影響之下自然突變，該基因有所改變，而得以編碼能夠在部份或完全抑制未改質之酵素的條件下表現HPPD活性的突變酵素。該細胞可以是植物



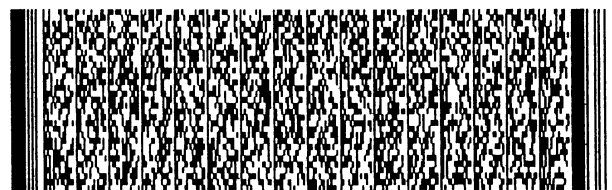
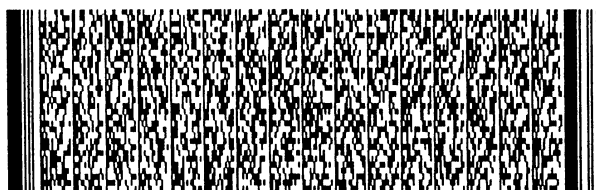
五、發明說明 (8)

細胞或細菌，後者可表現天然的HPPD(屬於細菌來源)或其他來源的HPPD(細菌、真菌、藻類或植物)，可將這些HPPD導入細菌中，此等細菌係呈適當形式用於生成突變，並容許表現該HPPD，如果有編碼該細菌之天然HPPD的基因存在，最好已經將其刪除。這類轉殖細菌的方法是熟諳此技藝者所熟知，並，如同突變的方法已詳細說明於文獻中(特定言之：山布魯克(Sambrook)等人之分子選殖法：實驗室手冊(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)，第2版，紐約冷泉港冷泉港實驗室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York))。

當該細胞為表現天然HPPD之植物細胞時，可分離並選殖突變的HPPD，或使用傳統的方法，從細胞培養物中再產生植物。所得的植物所表現之功能性突變HPPD對HPPD抑制劑之敏感性低於天然HPPD。該再生方法已詳細述於文獻中(包括先前摘錄的參考文獻)，並係熟諳此技藝者所熟知。

利用適當篩選助劑，選拔具有對HPPD抑制劑較不敏感之突變HPPD的細胞。以本發明之目的和尋求解決之道而言，亦即對HPPD抑制劑較不敏感的HPPD，可簡單操作之篩選助劑為包括決定出完全抑制原始未突變之HPPD的HPPD抑制劑，且其對表現該未突變之HPPD的細胞是致命的劑量，使細胞在突變之後接受此預定劑量，分離已經能抵抗該致命劑量的突變細胞，然後分離並選殖編碼該突變HPPD的基因。

這種由細胞培養物之進行突變之方法係在表現其天然



五、發明說明 (9)

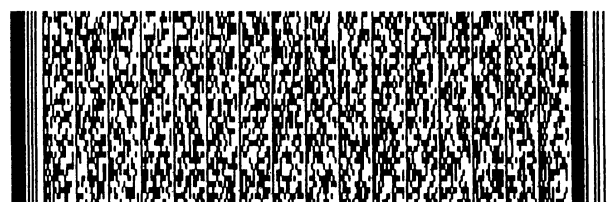
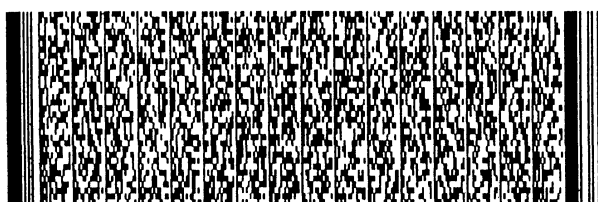
HPPD 之非常大量的假單胞菌細胞上進行，(參見，特定言之下文所述的明確實例)。在所有例子中，藉著上文定義之選拔法分離出的突變種，為在HPPD之C-末端部份出現突變的突變種。

另一種其他製備根據本發明之突變核酸序列及相應的蛋白質的方法，包括在例如數個C-末端部份中之序列中判別共同的胺基酸，在預先選出一個或多個胺基酸上進行定位突變，或在一個特定來源的HPPD中嘗試使突變重現，其係在其他來源之HPPD中進行隨機突變(細胞培養)而獲得突變種。獲得這些定位突變的方法是熟諳此技藝者所熟知，並廣泛地述於文獻中

(特定言之：定向突變作用：操作法(Directed Mutagenesis: A Practical Approach,) 1991, 由M.J. 麥克弗森(McPHERSON)編輯, IRL 出版社)，或是可能使用商業套組之方法(例如得自法馬公司(PHARMACIA)之U.S.E. 生成突變套組)。在所有的案例中，在這種定位突變後，適於使用與上述隨機突變法作用所使用之相同的方法來篩選比相應之未突變HPPD更不敏感的突變HPPDs。

因此本發明亦關於製備編碼根據本發明之突變HPPD之核酸序列的方法，該方法如上文中之定義。

本發明亦關於在轉殖植物的方法中，以編碼根據本發明之突變HPPD的核酸序列作為標記基因，或作為編碼序列之用法，而有可能賦與植物對屬於HPPD抑制劑之除草劑的耐受性。當然咸了解，該序列亦可與(一個)其他基因標記(群)，或編碼一種或多種農業特性的序列(群)混合使用。



五、發明說明 (10)

本發明亦關於嵌合基因(或表現卡匣)，其包括編碼序列及在5'或3'位置之異源性調節要素，其在宿主生物中能夠產生功能，特別是在植物細胞或植物中，而該編碼序列含有至少一個編碼如同先前定義之突變HPPD的核酸序列。

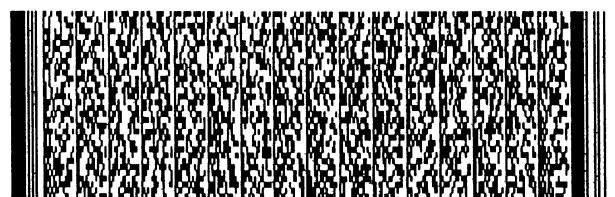
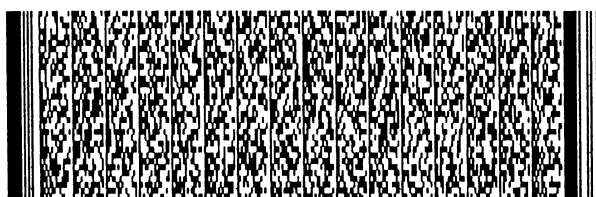
咸了解"宿主生物"為任何低等或高等的單細胞或多細胞生物，為了產製突變HPPD之目的，可將根據本發明之嵌合基因導入其中。這些生物，特定言之為細菌，例如大腸桿菌(*E. coli*)、酵母菌，特別是酒酵母菌(*Saccharomyces*)屬或克魯維爾酒酵母菌(*Kluyveromyces*)屬，畢赤酵母(*Pichia*)、真菌，特別是麴菌屬(*Aspergillus*)、桿狀病毒，或較佳的是植物細胞或植物。

咸了解根據本發明之"植物細胞"是任何衍生自植物並能夠形成未分化之組織，(如：癒傷組織)，分化的組織(如：胚芽、植物的一部份、植物或種子)等之細胞。

咸了解，根據本發明之"植物"為能夠產生光合作用之任何經過分化的多細胞生物，特定言之單子葉或雙子葉生物，更特別指栽培植物，其可以提供或不提供作為動物或人類營養用，如：玉蜀黍、小麥、油菜、大豆、稻米、甘蔗、甜菜根、菸草、棉花等等。

表現編碼HPPD之核酸序列所需的調節要素是熟諳此技藝者已熟知，並依宿主生物而異。特定言之，其包括啟動基因序列，轉錄活化劑和終止轉錄序列，包括起始和終止編碼子。判別和選拔調節要素的工具和方法是熟諳此藝者已熟知，並廣泛述於文獻中。

本發明更特別關於植物的轉殖作用。任何在植物中自然



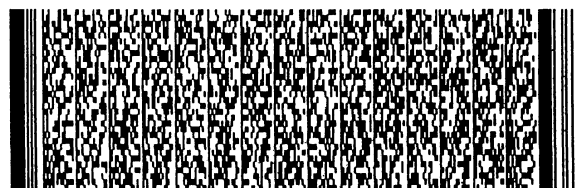
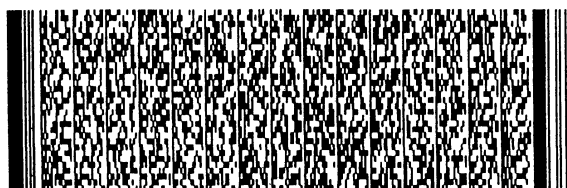
五、發明說明 (13)

已詳細說明於專門文獻中，尤其是在本發明中提及的參考文獻，更特別的是藉著使用根據本發明之載體。

有一系列方法是利用附接DNA序列之顆粒撞擊細胞、原生質體或組織。另一個系列的方法是利用已嵌入根癌土壤桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Ti質體或發根土壤桿菌(*Agrobacterium rhizogenes*) Ri質體中之嵌合基因轉移到植物內的方法。其他可使用的方法，如：顯微注射術或電穿孔法，或使用PEG的直接沉澱法。熟諳此藝者將依據宿主生物的性質，特別是植物細胞或植物，來選擇最適當的方法。

本發明亦關於宿主生物，特別是植物細胞或植物，其被轉殖且含有包括編碼如上述定義之突變HPPD序列之嵌合基因。

本發明亦關於含有轉殖細胞的植物，特定言之，從轉殖細胞再生的植物。可藉由任何適當方法獲得該再生作用，而該方法係依物種的性質而定，例如，述於上述參考文獻中者。可引用下列專利案或專利申請案，特別是關於轉殖植物細胞和使植物再生的方法：美國專利第4,459,355號、美國專利第4,536,475號、美國專利第5,464,763號、美國專利第5,177,010號、美國專利第5,187,073號、歐洲專利第267,159號、歐洲專利第604 662號、歐洲專利第672 752號、美國專利第4,945,050號、美國專利第5,036,006號、美國專利第5,100,792號、美國專利第5,371,014號、美國專利第5,478,744號、美國專利第5,179,022號、美國專利第



五、發明說明 (14)

5,565,346 號、美國專利第5,484,956 號、美國專利第5,508,468 號、美國專利第5,538,877 號、美國專利第5,554,798 號、美國專利第5,489,520 號、美國專利第5,510,318 號、美國專利第5,204,253 號、美國專利第5,405,765 號、歐洲專利第442 174 號、歐洲專利第486 233 號、歐洲專利第486 234 號、歐洲專利第539 563 號、歐洲專利第674 725 號、WO 91/02071 和 WO 95/06128。

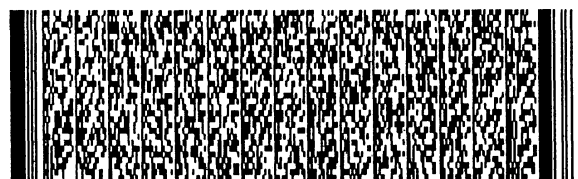
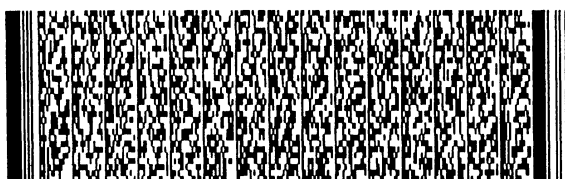
本發明亦關於轉殖的植物，其係由栽培及/或雜交上述再生植物而衍生出，並有關該轉殖植物的種子。

根據本發明所獲得的轉殖植物可以是單子葉類，如：穀類、甘蔗、稻米和玉蜀黍，或雙子葉類，如：菸草、大豆、油菜、棉花、甜菜根、苜蓿等等。

本發明亦關於藉由HPPD抑制劑的幫助，特別指先前定義的除草劑，進行選擇性除草，特別在農作物中除草之方法，該方法的特徵為在播種農作物之前、在農作物萌芽之前，或在農作物萌芽之後，將該除草劑施用在已經根據本發明轉殖的植物上。

本發明亦關於在一片含有已經利用根據本發明之嵌合基因轉殖之種子或植物的田間區域中控制雜草的方法，該方法包括在該片田間區域上施用一份劑量的HPPD抑制劑除草劑，其對該雜草有毒性，然而對已經利用根據本發明之嵌合基因轉殖的種子或植物並無明顯的影響。

本發明亦關於栽培已經根據本發明，利用根據本發明之嵌合基因轉殖之植物的方法，該方法包括將該經過轉殖之



五、發明說明 (15)

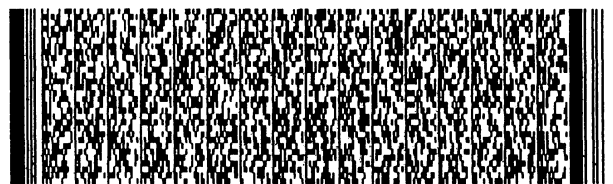
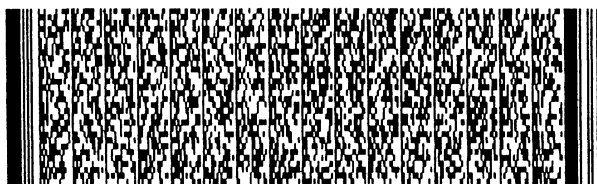
植物的種子栽種於適合栽培該植物的田間區域上，如果出現雜草，便對該片田間之該區域施用一份劑量之對該雜草有毒性的除草劑，該除草劑的目標為上文定義之HPPD，對該轉殖種子或該轉殖植物沒有明顯的影響，然後在其達到想要的成熟階段時收穫所栽培的植物，且若適當時，分離所收穫植物的種子。

在上文的兩個方法中，可根據本發明在播種農作物之前、在農作物萌芽之前，或在農作物萌芽之後，施用以目標為HPPD的除草劑。

在本發明之定義中，咸了解"除草劑"為具有獨立除草活性的物質，或這類物質可與改變其效力之添加物組合，如：例如增加其活性的製劑(增效劑)，或限制其活性的製劑(安全劑)。HPPD抑制劑除草劑，特定言之如先前定義者。當然咸了解，為了其實際上的應用，依其本身已知的方式，由上述除草劑與農業化學上常用的調配佐劑組合使用。

當已經根據本發明來轉殖的植物含有其他可耐受其他除草劑之基因時(例如編碼突變或未突變之EPSPS的基因，其賦與植物對草甘膦的耐受性)，或當經過轉殖之植物天生對其他除草劑敏感時，根據本發明之方法可包括同時或依順序先後錯開施用與該除草劑，例如草甘膦，組合的HPPD抑制劑。

本發明亦關於以編碼突變HPPD之嵌合基因，在植物物種之"轉殖作用/再生"循環期間，及在選擇上述除草劑時，作為標記基因的用途。



五、發明說明 (16)

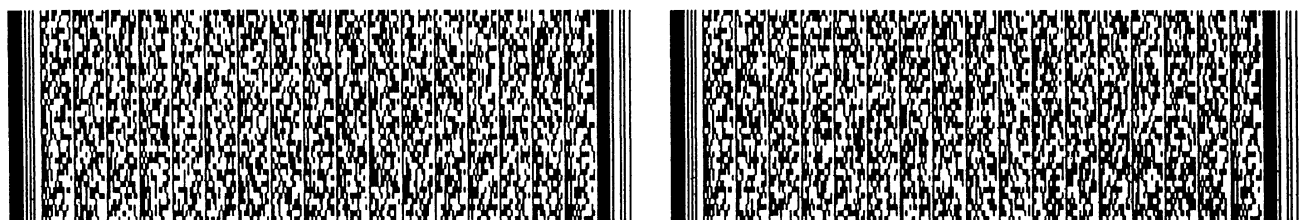
利用下列實驗實例的幫助，將更能明瞭本發明的各種觀點。

下文說明之此等實例中的所有方法或操作法只供範例，且可以從中選擇不同的方法來達到相同結果。這個選擇不影響其結果的品質，因此熟諳此藝者可使用任何適當的方法來達到相同的結果。操作DNA片段的方法，大部份述於"最新分子生物學方法(Current Protocols in Molecular Biology)"第1和2冊，奧斯伯(Ausubel) F.M. 等人中，由葛林出版協會與威利科際公司出版(Greene Publishing Associates and Wiley Interscience)(1989)，或述於在分子選殖法(Molecular cloning, T. Maniatis), E.F., 弗利奇(Fritsch), J. 山布魯布(Sambrook), 1982中。

實例1：篩選對2-氰基-3-環丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃苯基)丙烷-1,3-二酮具有耐受性之突變種的比色試驗

pRP C：載體pRP A(述於申請案WO 96/38567中)，其含有基因組DNA片段和為來自螢光假單胞菌A32之HPPD之基因編碼之編碼區，以NcoI分解、純化，然後連接表現載體pKK233-2(克隆科技公司(Clontech))內，其本身被NcoI分解，其位置在此載體中形成獨特的選殖位置。此證實所得的pRP C載體中，該基因的方向容許在trc啟動基因的控制下表現。

將含有1%瓊脂糖(奇布可公司(Gibco BRL)超純)、5 mM L-酪胺酸(希格馬藥廠(Sigma))和用於選拔上文提及之pRP C載體之製劑的YT營養液型培養基，以每孔100微升之比例分配至96孔培養盤中。並取10微升在指數生長期，並含有



五、發明說明 (17)

pRP C 載體之大腸桿菌的培養物分配至每孔中。在37℃下16小時之後，僅含有培養基的孔，或接受含有載體pKK233-2之大腸桿菌培養物接種的孔是半透明的，而以含有載體pRP C之大腸桿菌培養物接種的孔則變成棕色的。

以相同的培養基製備一系列試樣，其含有各種不同濃度(0 mM至14mM)的2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲基磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮(歐洲專利0 496 631號)，將其溶於水中，並調至pH 7.5。該分子為二酮腓，公認為HPPD活性的有效抑制劑(帕黑特(Pallett) K.E. 等人, 1997, Pestic. Sci. 50, 83-84)。在7 mM濃度之上述的化合物的存在下，觀察到含有載體pRP C之細菌培養物完全沒有變色。

下文中將證實藉由含有濃度7 mM之2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲基磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮的培養基變成棕色，來選拔藉著定位突變法及隨機突變法所獲得的HPPD突變種。

改用2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲基磺醯基-4-(甲硫基)苯基)丙烷-1,3-二酮和2-(2-氯-3-乙氧基-4-(乙基磺醯基)苯甲醯基)-5-甲基-1,3-環己二酮(WO 93/03009)取代2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲基磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮，獲得相同結果。這兩個分子分別在DMSO中形成終濃度3.5 mM和7 mM的溶液。

這些結果證實以HPPD活性為基礎的試驗，無論該活性的起源為何，都可判別對異噁唑類和三酮類的HPPD活性抑制劑具有耐受性的HPPD活性。



五、發明說明 (18)

實例2：螢光假單胞菌A32 HPPD基因利用羥胺的隨機突變法

利用標準方法萃取含有上述之pRP C載體的大腸桿菌培養物之質體DNA。在80℃下，由該DNA與羥胺一起培養1小時，羥胺為化學突變劑，使用得自上文提及之參考文獻的標準方法，使胸腺核苷置換胞嘧啶。以所得的有可能突變之質體DNA來轉殖大腸桿菌K12品系DH10B。使用實例1中所述的比色篩選試驗，可以在篩選數千個可能突變的純系之後，判別數個能夠使培養基變成棕色的菌落，亦即即使在7mM之2-氰基-3-環丙基-1-(2-甲基磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮的存在下也能夠轉殖HPP成為黑尿酸鹽。

在定出這些各式各樣突變種的序列後，使用此突變法/篩選法顯然已經單離出4株不同突變種，相當於三個不同的突變位置：

- 第一個位置：

由白胺酸置換脯胺酸215，該突變種命名為PfL215

- 第二位置：

- 由絲胺酸置換甘胺酸334，該突變種命名為PfS334

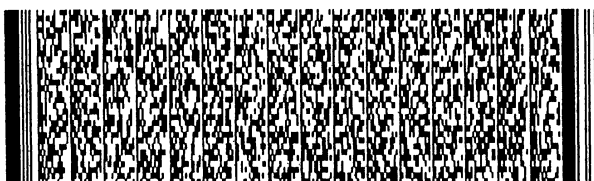
- 由天冬胺酸置換甘胺酸334，該突變種命名為PfD334

- 第三個位置：

由絲胺酸置換甘胺酸336，該突變種命名為PfS336。

這三個突變位置係位在該蛋白質之C-末端區，與未突變的HPPD相比較，造成有改良的耐受性。

藉由隨機突變法造成的改變，可在任何具有HPPD型活性



五、發明說明 (19)

(亦即轉殖4-羥苯基丙酮酸鹽成為黑尿酸鹽)，並可選殖其編碼區的蛋白質上進行。雖然本文中所述的HPPDs特別指得自螢光假單胞菌、擬南芥菜、胡蘿蔔、玉蜀黍和集胞藻屬的HPPDs，但對熟諳此藝者而言，所有這些改變顯然均可應用在其他的HPPDs。

實例3：螢光假單胞菌A32 HPPD基因利用序列相似性進行的定位突變法

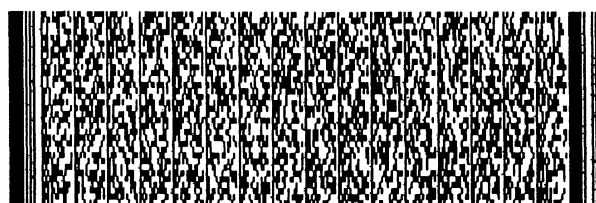
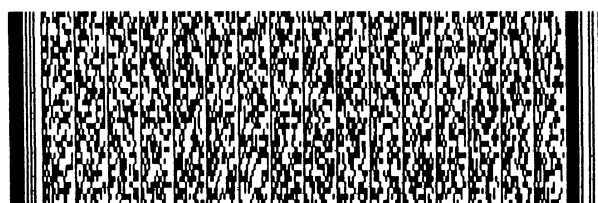
藉由排列來自螢光假單胞菌A32、擬南芥菜、小白鼠、豬和球蟲之蛋白質序列，有可能選出一定數目的胺基酸，發現其被保留在不同序列中，然後使它們發生突變，而獲得耐受性HPPDs；可將文獻所述之其他HPPDs的序列加至圖1所示的排列中。

序列識別1號

這些不同序列的排列清楚地顯示出其中一個最徹底的保留區位在位置333處的苯丙胺酸和位置337處的天冬醯胺之間。不僅該區域被高度地保留，此外它還包括位置334和336處的兩個甘胺酸，藉由隨機突變法來判別(在序列排列中以粗字體表示，並以星號標示)。突變法係在pRPF載體上，利用Pharmacia U.S.E.突變法套組進行。使用M寡核苷酸，使苯丙胺酸333、甘胺酸334、甘胺酸336和天冬醯胺337發生突變，亦使雙重甘胺酸334和甘胺酸336突變種發生突變，如下圖所示(見附錄的序列表，序列識別1號至序列識別12號)：

PHE333的突變，只被Trp置換

寡核苷酸1：GAAGTTGCCC TCGCCCCACC CATCGTCGCC CTT



五、發明說明 (20)

PHE333 的突變，只被LEU & ILE置換

寡核苷酸2：GAAGTTGCCC TCGCCRAKCC CATCGTCGCC CTT

GLY334 的突變，只被TRP置換

寡核苷酸3：CTTGAAGTTG CCCTCCCAA ACCCATCGTC GCC

GLY334 的突變，只被ASP置換

寡核苷酸4：CTTGAAGTTG CCCTCGTCAA ACCCATCGTC GCC

GLY334 的突變，只被SER置換

寡核苷酸5：CTTGAAGTTG CCCTCGCTAA ACCCATCGTC GCC

GLY334 的突變，只被LEU & ILE置換

寡核苷酸6：CTTGAAGTTG CCCTCRAKAA ACCCATCGTC GCC

GLY336 的突變，只被ASP置換

寡核苷酸7：CAGCGCCTTG AAGTTGTCCT CGCCAAACCC ATC

GLY336 的突變，只被GLU置換

寡核苷酸8：CAGCGCCTTG AAGTTYTCCT CGCCAAACCC ATC

GLY336 的突變，只被TPR置換

寡核苷酸9：CAGCGCCTTG AAGTTCCACT CGCCAAACCC ATC

GLY336 的突變，只被Ile置換

寡核苷酸10：CAGCGCCTTG AAGTTDACTC GCCAAACCCA

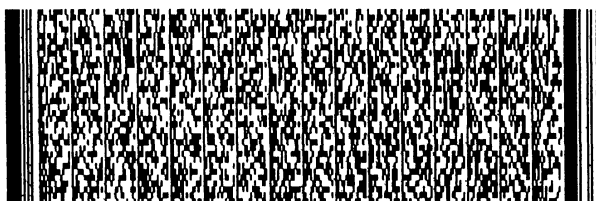
GLY334 & GLY336 的突變，其被所有其他的胺基酸來置換，因此可能獲得雙重突變種

寡核苷酸11：CGCTTGAAGT TNNNCTCNNN AAACCCATCG TC

ASN337 的突變，只被LEU & ILE置換

寡核苷酸12：GAACAGCGCC TTGAARAKGC CCTCGCCAAA CCC

在利用2-氰基-3-環丙基-1-(2-甲基磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮篩選數百個可能的突變種之後，在我



五、發明說明 (21)

們的比色檢測試驗中，判別出13個突變種，其中有10個是單一突變種，有3個是雙重突變種(參見綜合說明表)，其對2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲基磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮抑制劑具有耐受性。必需強調的是有些在這些定位之突變法的過程中判別之突變種與在實例2中判別之突變種相同(如：PfS334和PfD334)。

所得的突變種判別如下：

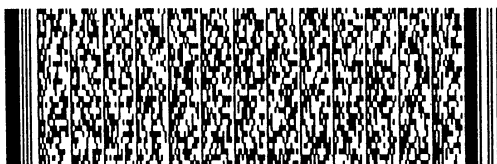
單一突變種：

以色胺酸置換苯丙胺酸333	命名為PfW333
以白胺酸置換苯丙胺酸333	命名為PfL333
以色胺酸置換甘胺酸334	命名為PfW334
以天冬胺酸置換甘胺酸334	命名為PfD334
以絲胺酸置換甘胺酸334	命名為PfS334
以脯胺酸置換甘胺酸334	命名為PfP334
以白胺酸置換甘胺酸334	命名為PfL334
以異白胺酸置換甘胺酸334	命名為PfI334
以天冬胺酸置換甘胺酸336	命名為PfD336
以穀胺醯胺置換甘胺酸336	命名為PfQ336
以穀胺酸置換甘胺酸336	命名為PfE336
以色胺酸置換甘胺酸336	命名為PfW336
以異白胺酸置換甘胺酸336	命名為PfI336
以白胺酸置換天冬醯胺337	命名為PfL337

雙重突變種：

以丙胺酸置換甘胺酸334並
以丙胺酸置換甘胺酸336

命名為PfA334-A336



五、發明說明 (22)

以丙胺酸置換甘胺酸334並

以精胺酸置換甘胺酸336

命名為PfA334-R336

以絲胺酸置換甘胺酸334並

以組胺酸置換甘胺酸336

命名為PfS334-H336

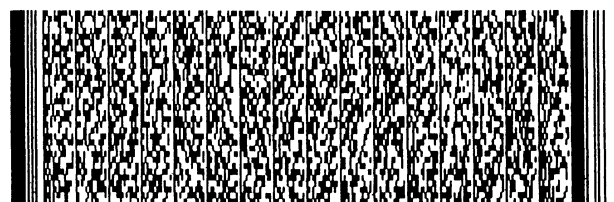
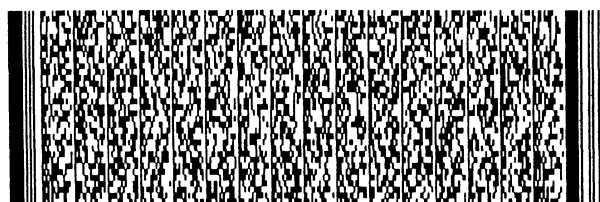
此結果證實可利用保留在不同HPPDs之蛋白質序列之間，且位在該蛋白質之C-末端部份的胺基酸突變，可能獲得對HPPD活性之抑制劑具有耐受性的HPPDs。因此，任何保留在不同HPPD胺基酸序列之間的區域都是獲得突變種的良好標的，該突變種有利於分析，決定其耐受性。有可能獲得耐受性HPPD之任何突變或多重突變，即使是本文中未舉例說明的蛋白質，亦是本發明主題的一部份。

該結果亦證實，為了獲得對此等不同抑制劑有良好耐受性之酵素，C-末端區絕對是使HPPD突變的優良標的。因此，很難在N-末端區定義出保留區，在螢光假單胞菌A32的例子中，其定義為由胺基酸1號至先前定義之連接肽，或在其他物種之HPPDs的案例中，則至其同等物。

任何具有HPPD-型活性(亦即能轉殖4-羥苯基丙酮酸鹽成為黑尿酸鹽並可選殖其編碼區)的蛋白質可依據，由序列排列演繹出的資訊為基礎，利用定位突變法進行(多項)改變。雖然在本文所述的HPPDs，特別來自螢光假單胞菌、擬南芥菜、胡蘿蔔、玉蜀黍和集胞藻屬，但所有的這些改變顯然均可應用在其他的HPPDs上。

實例4：螢光假單胞菌A32 HPPD基因之定位突變法

藉由實例2所述的隨機突變法獲得的結果，及在排列不同HPPD序列後所獲得的結果，清楚地證實了由F#333至



五、發明說明 (23)

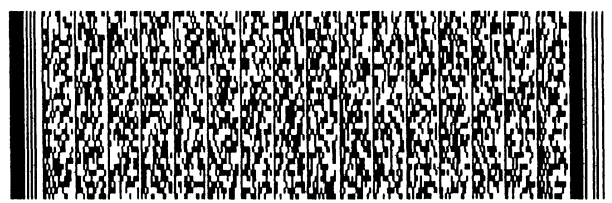
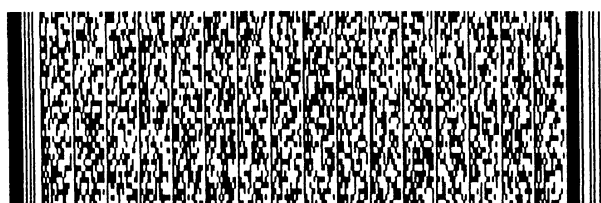
F#338(螢光假單胞菌HPPD的編號)所產生的肽在為了獲得耐受性而致突變的觀點上,是特別感興趣的區域。

就此資料之另一方面發現,藉由分析螢光假單胞菌品系A32酵素的立體結構,例如(圖1),發現該蛋白質單體之C-末端部份含有該酵素的催化位置。因此,首先而且主要進行突變之此C-末端區的胺基酸希望能夠修改蛋白質/抑制劑交互作用,藉此獲得更具耐受性的酵素。

可能導致Phe333至Phe338之六肽構型改變之點突變,在此肽未直接突變下,因此可藉由分析螢光假單胞菌HPPD蛋白質之立體結構來尋找。主要的想法是遠離活性部位相當遠且未被保留的胺基酸突變會影響此Phe333至Phe338肽之空間位置,並因此藉由間接效應,誘發對HPPD抑制劑之耐受性。

因此,在結構中尋找接近此六肽的胺基酸;少數的胺基酸,如:在位置287處的天冬胺酸和在位置298處的甘胺酸符合此標準[關於此資訊,該六肽之甘胺酸334的 α 碳原子位在離位於催化位置之鐵原子9.61 Å處,而位置298處之甘胺酸的 α 碳原子則位在離位置334處之甘胺酸5.75 Å處]。至於這兩個胺基酸,此甘胺酸298似乎是最好的候選者,因為任何突變法將造成胺基酸具有較大的側鏈,而此甘胺酸被穀胺酸(其側鏈帶負電)置換,就獲得改變的觀點來看,其具有充份肉眼可見的效果。

此外,當位在位置298處的甘胺酸被穀胺酸置換時,此穀胺酸之非常龐大的側鏈"撞到" β 折疊片的二級結構,其中有保留的LLQIF要素。此要素的苯丙胺酸312本身之位置



五、發明說明 (24)

即非常靠近鐵。

測試Gly298形成Glu298的突變作用。

利用pRP C載體的定位突變法(U.S.E.突變套組，法馬公司(Pharmacia))，使用第13號寡核苷酸(附錄的序列表-序列識別13號)，造成Gly298形成Glu298的突變：

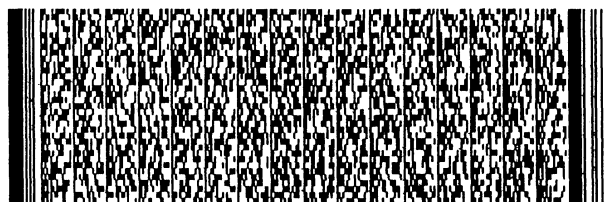
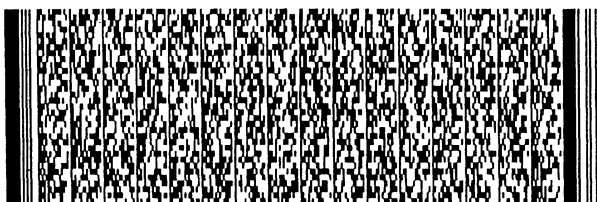
以穀胺酸置換GLY298

寡核苷酸13：GCCTTCCACGGAAGATTCGTCCAGCAGGATACC

此突變種命名為Pfe298，會使含有7mM RPA202248之篩選培養基轉變為棕色(參見綜合表)。

這點證實有可能在知道HPPD的立體結構後，來判別就HPPD抑制劑之耐受性的觀點而言有效之一定數目的突變，無論該HPPD是屬於細菌、植物或其他來源皆然。因此，完全有可能塑造可利用其蛋白質序列的任何HPPD結構，因為螢光假單胞菌HPPD的確實結構，係已知者。當塑造C-末端區時，此塑造過程特別令人感興趣，從原始序列的觀點來看，該區保留得最好，特別從對HPPD抑制劑之耐受性的觀點來看，它也是最有把握的。

依據由所塑造之HPPD的立體結構推衍而來的資料或依據在含或不含抑制劑下所獲得之結晶分析測得的立體結構推衍而來之資料，可利用定位之突變法引起(多項)改變，此等改變可在任何具有HPPD型活性(亦即能轉殖4-羥苯基丙酮酸鹽成為黑尿酸鹽)，並選殖或可選殖其編碼區的蛋白質上進行。而在本申請案中說明的HPPDs特別指得自螢光假單胞菌、擬南芥菜、胡蘿蔔、玉蜀黍和集胞藻屬的HPPD，但熟諳此藝者咸了解，所有的這些改變當然均可應



五、發明說明 (25)

用 在 其 他 HPPDs 上。

實例5：突變種螢光假單胞菌HPPDs在菸草中的表現

A) 嵌合基因之構築

pRP-VB3：以HindIII和XbaI分解雙載體pBI121(克隆科技)的DNA，並利用pfu聚合酶(史塔金公司(Stratagene))，以dNTPs填充末端；純化該載體。以HindIII和SacI分解純系pRP-S的DNA，該純系已述於申請案PCT 96/38567的實例2中，且包括序列"雙重組織蛋白啟動基因-TEV-OTP-HPPD基因-Nos終止轉錄序列"，並利用pfu聚合酶(史塔金公司)，以dNTPs填充末端；然後將經過純化的嵌插序列連接到前述之經過純化的載體內。利用SalI分解作用確認方向。因此純系pRP-VB3具有下列嵌合基因結構：

RB/Nos 啟動基因/NPTII/Nos 終止轉錄序列/雙重組織蛋白
啟動基因/tev/otp/HPPD/Nos 終止轉錄序列

RB= 根癌土壤桿菌T-DNA的右側邊緣

Nos 啟動基因= 根癌土壤桿菌膽脂鹼合成酶的啟動基因

NPTII= 編碼對康黴素具有抗性的第II型新黴素磷酸轉移酶的序列

NOS 終止轉錄序列= 根癌土壤桿菌膽脂鹼合成酶的終止轉錄序列

雙重組織蛋白啟動基因= 述於歐洲專利507 689號中

tev=TEV 促進子(加林頓與弗利德公司(Carrington &



五、發明說明 (27)

載體內，利用pfu聚合酶(史塔金公司)，以dNTPs填充其末端，純化之後，以BamHI分解並純化。

pRP-VB83-g：以BstEII分解純系pRP-VB3之DNA，並利用pfu聚合酶(史塔金公司)，以dNTPs填充末端；然後將經過純化的載體與本身連接，藉此排除此載體獨特的BstEII位置。

pRP-RD224：以BamHI和SacI分解純種系pRP-VB3-f的DNA，純化並連接到已經以BamHI和SacI分解並純化過的載體pRP-VB3-g內。因此純系pRP-RD224具有下列的結構：

RB/Nos 啟動基因/NPTII/Nos 終止轉錄序列/雙重組織蛋白
啟動基因/tev/otp 截斷的 HPPD/Nos 終止轉錄序列/LB

LB=根癌土壤桿菌T-DNA的左側邊緣

pRP-RD224 突變種：利用KpnI和BstEII分解帶有突變HPPDs之載體的DNAs和含在載體PKK233-2中的未突變之HPPD，純化，然後連接到已經利用KpnI和BstEII分解並純化過的載體pRP-RD224內。以KpnI和BstEII分解，已經整合了突變HPPD基因之轉化體來選拔嵌插序列之大小。將所得的純系命名為pRP-RD224，在此純系上進行已經在HPPD上完成的突變；依此方式，產生下列純系，例如：pRP RD224 Pf(未突變的酵素)，pRP RD224 PfD336(在位置336處具有天冬胺酸的酵素)，pRP RD224 PfQ336(在位置336處具有穀胺醯胺的酵素)，pRP RD224 Pfl333(在位置333



五、發明說明 (28)

處具有白胺酸的酵素)，及pRP RD224 PfA334-336(在位置334處和位置336處具有丙胺酸的酵素，也就是雙重突變種)。

B) "小哈瓦那(Petit havana)"菸草的轉殖作用

利用述於在歐洲專利申請案第0 508 909號之轉殖作用和再生作用的程序，將前述嵌合基因轉殖到"小哈瓦那"菸草中。

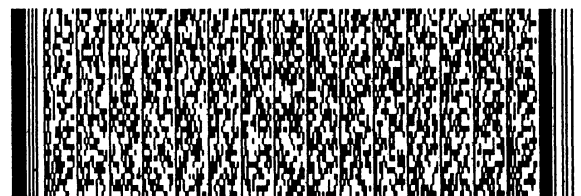
1) 轉殖作用：

將載體載入無致癌基因之根癌土壤桿菌品系EHA101中。

2) 再生作用：

使"小哈瓦那"菸草在基礎的Murashige和Skoog(MS)培養基上，從葉片的移植物中再生，該培養基包括30克/公升蔗糖和350毫克/公升西法塔克辛(cefotaxime)，以及各種劑量，亦即10 ppm、20 ppm和40 ppm的2-氯基-1-[4-(甲磺醯基)-2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基環丙基)丙烷-1,3-二酮(歐洲專利496630號)，其為2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮的類似物，或直接給予2或4或8 ppm的2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮。從溫室植物中移出葉片的移植物，並藉著葉片培養盤技術(Science 1985，第227冊，第1229-1231頁)，以三個連續階段進行轉殖之：

- 首先包括在MS培養基中誘發其發芽15天，該培養基中添加30克/公升蔗糖，並含有0.05毫克/公升萘乙酸(ANA)和2毫克/公升 胺基嘌呤(BAP)，並含有各種不同劑量之



五、發明說明 (29)

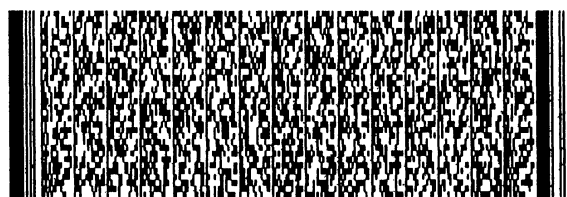
除草劑，亦即2-氟基-1-[4-(甲磺醯基)-2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基環丙基)丙烷-1,3-二酮(歐洲專利496630號)，或2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮。

- 然後使在此階段形成的嫩芽在MS培養基中培養10天，在該培養基中添加30克/升蔗糖並含有各種不同劑量的除草劑，但不含任何的荷爾蒙。

- 然後移出已經發育之嫩芽，並在含有一半濃度的鹽類、維生素和糖類，及各種不同劑量之異沙服托(isoxaflutole)，但不含任何荷爾蒙的MS生根培養基中培養。在大約15天後，將已經生根的嫩芽置於土壤中。

C) 測定小植株在活體外對除草劑的耐受性

由選出的製劑與突變種pRP RD224 PfL333、pRP RD224 PfA334-A336、pRP RD224 PfD336和pRP RD224 PfQ336反應，來完成本實驗。它們證實，在轉殖作用/再生作用分析法中，在最高劑量之除草劑下使用未突變之HPPD，不能獲得嫩芽/小植株，相反的，突變種則有可能獲得，其歸因於改善了該酵素的耐受性，即使在40 ppm 2-氟基-1-[4-(甲磺醯基)-2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基環丙基)丙烷-1,3-二酮(歐洲專利496630號)，或8 ppm的2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮之高劑量處，仍可獲得小植株。此等當使用突變HPPD時，可在使用高濃度之選出的製劑下獲得之小植株及彼等當用野生HPPD時不可能獲得的這些小植株，是完全正常的植株。



五、發明說明 (30)

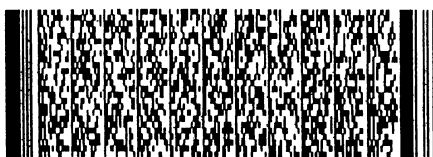
我們可強調，突變種 pRP RD224 PfD336 和 pRP RD224 PfL333，在統計上比突變種 pRP RD224 PfQ336 和 pRP RD224 PfA334-A336 是更有效的，因為它們能夠獲得較多數量的耐受性小植株。

螢光假單胞菌之 HPPD 的綜合說明表

HPPD 型	在篩選試驗中的活性*	
	使用選拔劑的劑量為	
	0 mM	7 mM
野生型	10	0
突變的		
PfL215	10	7
PfE298	8	3
PfL333	5	4
PfW333	-	-
PfS334	7	7
PfD334	1	1
PfW334	6	6
PfP334	5	5
PfL334	5	4
PfI334	5	4
PfS336	-	-
PfD336	2	1
PfQ336	8	8
PfE336	10	8
PfW336	10	10
PfI336	10	8
PfL337	8	8
PfA334-A336	8	8
PfA334-R336	8	7
PfA334-H336	5	5

*：篩選試驗述於實例 1。

“-”未取得數據



五、發明說明 (31)

數字10相當於與在缺乏抑制劑下，利用未突變之HPPD所獲得的相同程度的高活性，而數字0相當於受到2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮完全抑制時，或因為突變導致該酵素失去活性時之無活性；數字1至9相當於中間活性，活性係隨著數字增加。

這些結果證實將對HPPD活性之抑制劑具有耐受性的HPPD導入植物中，將使植物對這些相同抑制劑具有耐受性，因此，其耐受性顯然比利用未突變之HPPD所獲得的耐受性優異。

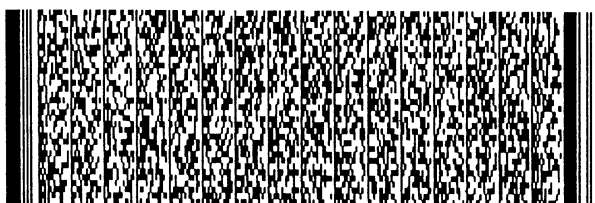
實例6：集胞藻屬HPPD基因之定位突變法

在螢光假單胞菌HPPD中選出在對HPPD抑制劑之耐受性有效的突變位置，並將該位置轉位至另一個HPPD中。

此轉位作用儘可能與螢光假單胞菌之HPPD不同，且與其他已知之HPPDs不同。為了此作業所選用的基因為編碼集胞藻屬HPPD的基因，該基因係由有系統地定出藍藻細菌之基因組的序列而得知，但未曾選殖其本身。因此該基因係首次分離，然後在大腸桿菌中表現。

1) 基因之分離

利用標準方法萃取和純化藍藻細菌集胞藻屬PCC6803的基因組DNA，而這在實例1)中藉著加入而被排除。採用聚合酶鏈反應(PCR)，使用含在其緩衝溶液中之1.25單位的pow聚合酶(百靈藥廠(Boehringer))，在含有200 uM dNTP(去氧核糖核苷酸三磷酸鹽)的50微升反應體積中，擴增200微克此基因組DNA。採用合成的寡核苷酸序列16和



五、發明說明 (32)

17(附錄的序列識別16和17號)作為引子，其係來自已在Genebank中公開之集胞藻屬HPPD的序列。

寡核苷酸16 ATTATGGAAT TCGACTATCT T

寡核苷酸17 CAGTATTCAT AATGTTAATT ATG

利用柏金-艾瑪(Perkin-Elmer) 9600裝置進行擴增程式，亦即94℃ 5分鐘，然後循環50次之94℃ 1分鐘，49℃ 1分鐘和72℃ 1分鐘，然後在72℃下5分鐘。

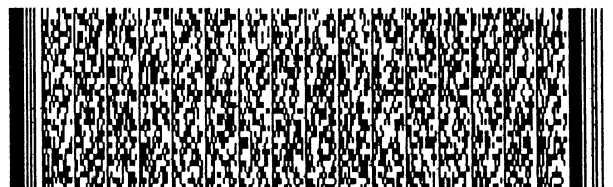
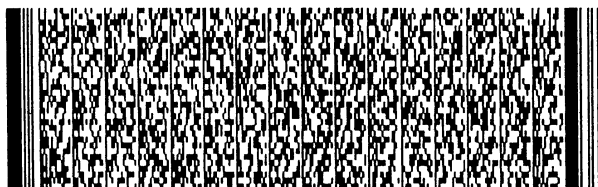
2) 基因之選殖和表現

純化PCR所獲得的擴增片段，以EcoRI分解，再度純化，然後選殖到先以EcoRI和SmaI分解過的載體ptrc-99A(法馬公司(Pharmacia))中。以重組質體轉殖細菌JM105。定出序列後證實選殖之片段符合已公告的集胞藻屬HPPD序列。

利用前述之比色試驗(參見實例1)，添加濃度為1 mM之IPTG(異丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃苷)，以便誘發表現該蛋白質，由培養基變成棕色觀察到所獲得之集胞藻屬HPPD之二加氧酶活性。在相同的條件下，但在含有7 mM 2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氯甲基苯基)丙烷-1,3-二酮之培養基中，沒有使該培養基變成棕色，藉此證實集胞藻屬HPPD之活性受到2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氯甲基苯基)丙烷-1,3-二酮的抑制。

3) 定位突變法

藉由螢光假單胞菌A32 HPPD之蛋白質序列和集胞藻屬PCC6803 HPPD排列，推測假單胞菌HPPD位置334和336處的甘胺酸(在實例3的圖中以星號表示的甘胺酸，且其非常高



五、發明說明 (33)

度地保留)，是在集胞藻屬HPPD中之位置318和320處(在圖3中排列的蛋白質序列中以粗字體表示)。

取得螢光假單胞菌之位置334處的數個突變種後，利用寡核苷酸MUGLYA和MUGLYB來完成兩個定位突變法實驗(U.S.E.，法馬公司)，該寡核苷酸計劃用於利用精胺酸或絲胺酸，或利用脯胺酸或丙胺酸來置換位置318處的甘胺酸(集胞藻屬的位置，相當於螢光假單胞菌之位置334處的甘胺酸)(序列識別18和19號)。

可能以SER & ASN來置換GLY318

寡核苷酸18 CGGGCAAAG GATTARCCA AGGAACTTT CAAG

可能以PRO & ALA來置換GLY318

寡核苷酸19 CGGGCAAAAG GATTSCNCA AGGAACTTT
CAAG

在這兩個實驗中，突變法後得到之純系使篩選培養基在7 mM 2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氯甲基苯基)丙烷-1,3-二酮下變成棕色(實例1所述的試驗)。定出每實驗中各一個突變種的序列。

以精胺酸置換甘胺酸318，命名為SyN318，類似PfD334(實例3)。

以丙胺酸置換甘胺酸318，命名為SyA318，類似PfA334(在實例3中)。

這些結果證實該突變造成耐受性，經證實與特定HPPD有關的耐受性可轉位至屬於其他物種和其他物界的另一個HPPD上。

這些結果亦證實在HPPD之C-末端部份中之蛋白質序列的



五、發明說明 (34)

改變，無論HPPD的起源為何(細菌或其他來源)，均可造成對HPPD抑制劑的耐受性。

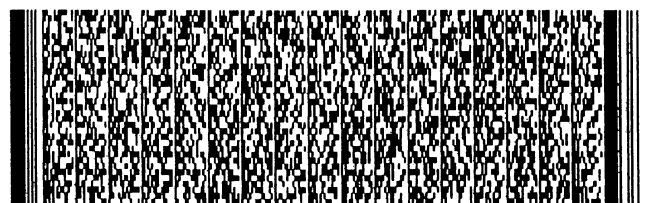
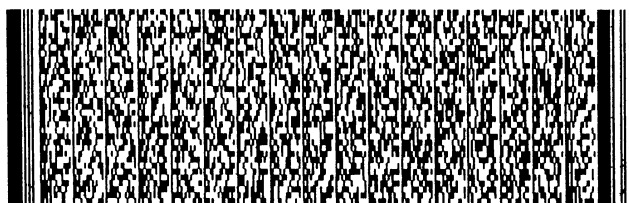
實例7：突變HPPD的生化研究：集胞藻屬之突變種

檢查先前實例中獲得的突變種SyN318和SyA318，與集胞藻屬之未突變HPPD比較與HPPD抑制劑(亦即2-氰基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮)有關之生化特徵 K_m 及 IC_{50} 。利用下列方法進行此分析法：

a) 活性測定法

利用高效液相層析法(HPLC)測定酵素與其受酶質HPP一起培養後形成的產物(亦即黑尿酸鹽)含量，來決定HPPD之活性。取12到48毫微莫耳之不同含量的黑尿酸鹽注射到能夠測定黑尿酸鹽滯留時間之管柱中，其高峰面積與產物的注射量有相關係性。

在200微升終體積中完成活性測定，其中含有：12.6 mM 抗壞血酸鹽、178 μ M 鐵($FeH_8N_2O_8S_2 \cdot 6H_2O$)(預先在0.1 M tris-乙酸鹽緩衝溶液，pH 6中製備)、50微克含HPPD之粗萃物、352 μ M HPP和0.1 M tris-乙酸鹽緩衝溶液，pH 7.5。首先在30°C下，由酵素與鐵一起培養1分鐘，然後在30°C下與抗壞血酸鹽一起培養5分鐘，隨後藉著加入受酶質(亦即HPP)，開始該反應。在30°C下持續培養1分30秒，然後添加70微升20%過氯酸中止該反應。然後在20°C及15,300 rpm下離心5分鐘，排除蛋白質。回收上澄液。然後取75微升分析用混合物注射至連接HPLC系統的Pico Tag C18管柱中，分析所形成之黑尿酸鹽量。以1毫升/分鐘之流速進行溶離。如下述進行等濃度溶離：(1)-0%緩衝溶液



五、發明說明 (35)

B(亦即100%緩衝溶液A：

水、3%(體積/體積)乙腈、0.1%(體積/體積)三氟乙酸)6分鐘；(2)-100%緩衝溶液B(100%乙腈)至第11分鐘；(3)-0%緩衝溶液B至第19分鐘。在離開管柱時，測定288nm吸光度來檢測黑尿酸鹽。藉由色譜上的高峰面積決定所形成產物量。

b) K_m 之決定

使用不同濃度的HPP，測量反應的初速，決定出HPPD對HPP的 K_m 。該反應在上述條件下，使用5.5 μM 到1400 μM 的HPP濃度進行。

c) IC_{50} 之決定

在30℃下，由酵素與鐵、抗壞血酸鹽、濃度1056 μM 之受酶質和各種不同濃度之抑制劑一起培養10分鐘後，在上述條件下測量該反應之初速，決定 IC_{50} 。2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氯甲基苯基)丙烷-1,3-二酮的使用濃度從 10^{-10} 變化至 $10^{-4} M$ 。

計算該酵素對其受酶質，亦即4-羥苯基丙酮酸鹽的 K_m 值，並在不相上下的活性下，計算 IC_{50} 值，將其記錄在下表中：

	天然的 HPPD	SyN318	SyA318
K_m	60 μM	470 μM	320 μM
IC_{50}	80 nM	80 μM	40 μM

這些結果證實雖然在蛋白質之C-末端部份進行的突變藉



五、發明說明 (36)

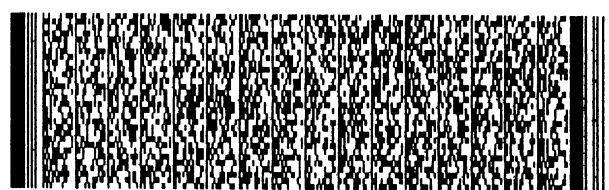
由減少該酵素對受酶質的親和力(K_m)而具有影響力，但它們藉由減少該酵素對抑制劑之親和力(IC_{50})甚至具有更強的影響。因此突變種HPPD之 IC_{50} 對未突變HPPD之 IC_{50} 的比例(其反映出對抑制劑之親和力的喪失)，對SyN318和SyA318而言分別是1000和500；而突變種HPPD之 K_m 對未突變HPPD之 K_m 的比例(其反映出對受酶質之親和力的喪失)，對SyN318和SyA318而言分別是8和5。這點非常妥當地解釋的事實是雖然這兩個突變種對該酵素之受酶質具有稍低的親和力，但對該酵素之抑制劑特別具有明顯較低的親和力，包括2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮。

這些結果證實，實例1所述的比色篩選試驗確實能夠檢測出對HPPD活性之抑制劑具有耐受性的突變HPPDs。因此該方法可有效用來篩選和判別對HPPD抑制劑具有耐受性之HPPD突變種。雖然以篩選方法之用法迅速簡便，且這正是被使用之原因，但為了完成類似的分析，顯然可以使用任何其他的方法；有可能使用

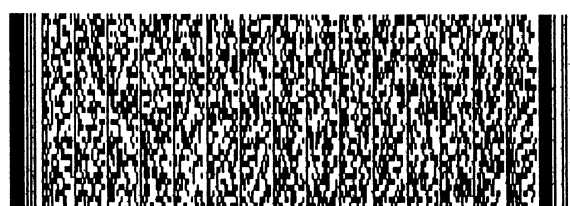
- 測量活性及其抑制作用之篩選方法，其係以HPP的消失(放射活性分析法、分光光度分析法或其他分析法)，或氧之消耗量，或以黑尿酸鹽的出現為根據基礎(與另一種酵素活性偶合)

- 活體內偶合篩選法，如：細菌在HPPD抑制劑的存在下，以HPP為唯一碳源下生長，藉此而得以只選出具有耐受性HPPD之純系

- 同樣地完全有可能使用植物轉殖載體、轉殖系統、再



藉著聚合酶鏈反應(PCR)，使用引子A和B擴增含在載體pTRC 99A中的集胞藻屬HPPD基因。寡核苷酸A能夠在HPPD基因的上游添加BamHI位置，並在BamHI位置和該基因起點之間添加一部份OTP序列。寡核苷酸B能夠在該基因下游添加BstEII位置。引子A與B示於序列識別20和21號中：



五、發明說明 (38)

寡核苷酸A：

5' NNNNNNNNNN GGATCCGGTG CATGGAATTC GACTATCTTC3'

寡核苷酸B：

5' NNNNNNNNNN GGTCACCACT ATTCATAATG TTAATTATG3'

在52℃的雜化溫度下進行該擴增反應。然後在瓊脂糖凝膠上分離該PCR產物。切下相當於HPPD基因的DNA帶並純化。

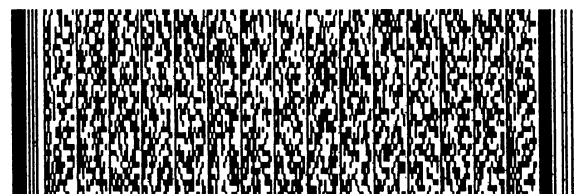
在37℃下，以BamHI分解所擴增的片段1小時，然後在60℃下以BstEII分解1小時。然後在瓊脂糖凝膠上分離該嵌插序列。切下相當於HPPD基因的DNA帶並純化。

然後將該片段選殖到雙載體中。後者先經過BamHI和BstEII分解，然後在瓊脂糖凝膠上分離出相當於截斷HPPD之片段。依HPPD基因相同的方式純化此載體。

在16℃下，利用T4 DNA連接酶處理16小時，完成雙載體和插入序列之間的連接。使用連接混合物轉殖大腸桿菌DH10B細胞。在含有50微克/毫升康黴素的LB培養基上選拔陽性純系。在完成迷你製程，並在37℃下以BamHI和SacI分解質體DNA 1小時後，在瓊脂糖凝膠上檢查在雙載體中是否出現所需之嵌插序列。然後使用重組載體來轉殖根瘤土壤桿菌EHA105細胞。在含有50微克/毫升康黴素的LB培養基上進行選拔。因此該重組載體帶有含康黴素抗藥性基因之T-DNA，和在雙重組織蛋白啟動基因控制下可編碼OTP-集胞藻屬HPPD單位的序列，以及Nos終止轉錄序列。

C)PBD6菸草品種的轉殖作用/再生作用

依實例5所述進行轉殖作用，但先使用200毫克/毫升康



五、發明說明 (39)

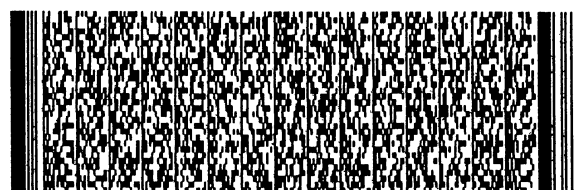
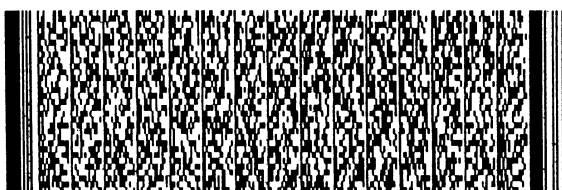
徽素進行選拔。

另一方面，切下在康徽素上獲得的嫩芽，並分別移至缺少荷爾蒙的培養基中，以便促進其生根，其中含有2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮，以便選拔對此除草劑有耐受性之導入外來基因的小植株。該培養基為MS培養基(希格馬公司 M-5519 4.4克/公升)，其中含有350毫克/公升西法塔克辛(Cefotaxime)、1%蔗糖(重量/體積)和0或8 ppm的2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮。在轉殖細胞中過度產生HPPD，能夠發育出有葉綠素之小植株，其對2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮有耐受性，而衍生自未轉殖細胞的小植株似乎顯然全部都是白色，且對除草劑敏感。

兩週後，將充份發育根部的小植株移至土壤中，並在溫室中培養。

D) 結果

在每種構築體的案例中，從平均60個葉片培養盤中再生約40個嫩芽。在含有2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮的培養基上培養2天後，一些小植株開始轉變為白色。在生根8天後，此變白現象明顯得足以判斷。在8 ppm的2-氟基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氟甲基苯基)丙烷-1,3-二酮下，觀察到含有野生型酵素的植物之存活率只有40%，而與含有酵素SyA318的植物為72%，含有酵素SyN318的植物則為88%。因此，含有突變酵素的植物具有之耐受性優於含有野生型酵素之植物



五、發明說明 (40)

的耐受性。

在超過一個月之後，在8 ppm之2-氯基-3-環丙基-1-(2-甲磺醯基-4-三氯甲基苯基)丙烷-1,3-二酮下，以野生型HPPD轉殖時，綠色小植株的數目為0%，而使用SyN318時，此百分比為17%，突變種SyA318則為19%。

同時，如果在濃度從5到10 ppm之2-氯基-1-[4-(甲磺醯基)-2-三氯甲基苯基]-3-(1-甲基環丙基)丙烷-1,3-二酮(歐洲專利496630號)(一種較弱的HPPDs抑制劑)的存在下進行再生作用，這三個基因均有可能獲得在外形上完全一致的植物。這證實，如果必要時，過度表現突變或未突變的HPPD，能夠在實驗室中獲得耐受性。

這些結果似乎與在活體外藉由酵素動力學所獲得的結果一致，且似乎確實有可能在活體外的生化測定和在活體內所獲得的結果之間建立相關性。

此後項實例證實，在活體外篩選(實例1)、生化分析(實例6)和植物的耐受性之間，至少有部份一致性。

序列一覽表

(1) 共同資訊：

(i) 申請者：

(A) 姓名：RHONE-POULENC AGROCHIMIE

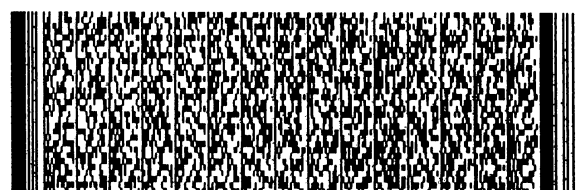
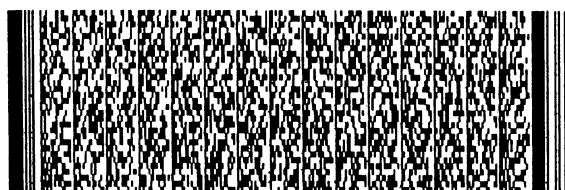
(B) 街道：14-20 Rue Pierre BAIZET

(C) 城市：LYON

(E) 國家：France

(F) 郵遞區域：69009

(ii) 發明標題：突變的羥苯基丙酮酸鹽二加氧酶、



五、發明說明 (41)

DNA 序列，以及含這類基因且耐受除草劑之植物的分離法

(iii) 序列數目：21

(iv) 電腦可讀形式：

(A) 媒體形式：軟碟

(B) 電腦：IBM PC 可相容的

(C) 操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D) 軟體：PatentIn Release #1.0，版本#1.30

(EPO)

(2) 序列識別1號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別1號

GAAGTTGCCC TCGCCCCACC CATCGTCGCC CTT

33

(2) 序列識別2號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33個鹼基對

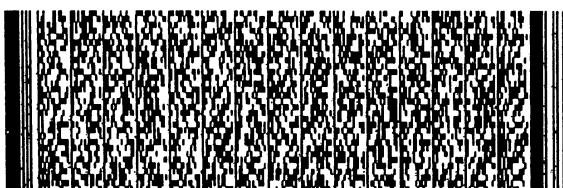
(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別2號



五、發明說明 (42)

GAAGTTGCCC TCGCCRAKCC CATCGTCGCC CTT

33

(2) 序列識別3號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個 鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別3號

CTTGAAGTTG CCCTCCCAAA ACCCATCGTC GCC

33

(2) 序列識別4號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個 鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別4號

CTTGAAGTTG CCCTCGTCAA ACCCATCGTC GCC

33

(2) 序列識別5號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個 鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀



五、發明說明 (43)

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別5號

CTTGAAGTTG CCCTCGCTAA ACCCATCGTC GCC

33

(2) 序列識別6號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別6號

CTTGAAGTTG CCCTCRAKAA ACCCATCGTC GCC

33

(2) 序列識別7號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別7號

CAGCGCCTTG AAGTTGTCCT CGCCAAACCC ATC

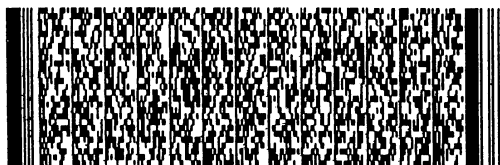
33

(2) 序列識別8號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33個鹼基對

(B) 類型：核苷酸



五、發明說明 (44)

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別8號

CAGCGCCTTG AAGTTYTCCT CGCCAAACCC ATC

33

(2) 序列識別9號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別9號

CAGCGCCTTG AAGTTCCACT CGCCAAACCC ATC

33

(2) 序列識別10號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：32個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別10號

CAGCGCCTTG AAGTTDACTC GCCAAACCCA TC

32

(2) 序列識別11號之資訊：

(i) 序列特徵：



五、發明說明 (45)

(A) 長度：32 個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別11號

CGCTTGAAGT TNNNCTCINN AAACCCATCG TC

32

(2) 序列識別12號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別12號

GAACAGCGCC TTGAARAKGC CCTCGCCAAA CCC

33

(2) 序列識別13號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別13號

GCCTTCCACG GAAGATTCGT CCAGCAGGAT ACC

33



五、發明說明 (46)

(2) 序列識別14號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：23 個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別14號

TCGAGAGAGA GGTGACCGAG AGA

23

(2) 序列識別15號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：23 個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別15號

TCGATCTCTC GGTCACCTCT CTC

23

(2) 序列識別16號之資訊：

(i) 序列特徵：

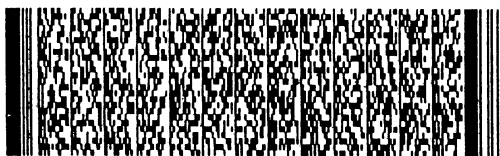
(A) 長度：21 個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA



五、發明說明 (47)

(xi) 序列說明：序列識別16號

ATTATGGAAT TCGACTATCT T

21

(2) 序列識別17號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：23個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別17號

CAGTATTCAT AATGTTAATT ATG

23

(2) 序列識別18號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：34個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別18號

CGGGCAAAAG GATTARCCA AGGAACTTT CAAG

34

(2) 序列識別19號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：34個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股



五、發明說明 (48)

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別19號

CGGGCAAAAG GATTTCNCA AGGAACTTT CAAG

34

(2) 序列識別20號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：40個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別20號

NNNNNNNNN GGATCCGGTG CATGGAATTC GACTATCTTC

40

(2) 序列識別21號之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：39個鹼基對

(B) 類型：核苷酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別21號

NNNNNNNNN GGTCACCAGT ATTCATAATG TTAATTATG

39

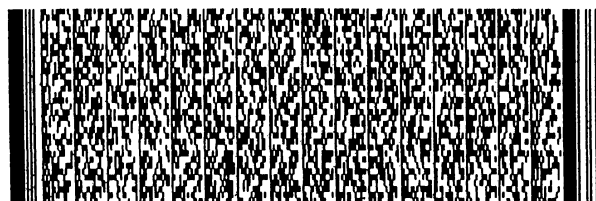


四、中文發明摘要 (發明之名稱：突變的羥苯基丙酮酸鹽二加氧酶、含此基因且耐受除草劑之DNA序列及植物的分離法)

本發明係關於編碼突變的羥苯基丙酮酸鹽二加氧酶(HPPD)之核酸序列，其對HPPD抑制劑具有改良的耐受性，並有關包含該序列作為編碼序列之嵌合基因，及其在分離對某些除草劑具有抗性之植物上的用途。

英文發明摘要 (發明之名稱：MUTATED HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE, DNA SEQUENCE AND ISOLATION OF PLANTS WHICH CONTAIN SUCH A GENE AND WHICH ARE TOLERANT TO HERBICIDES)

The present invention relates to a nucleic acid sequence encoding a mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) which exhibits improved tolerance to HPPD inhibitors, to a chimeric gene which comprises this sequence as the coding sequence and to its use for isolating plants which are resistant to certain herbicides.



鼠溪鼠	伊米提球蟲	禾生球腔菌	大麥	玉米	擬南芥菜	胡蘿藳	艾非爾鏈黴菌	螢光假單胞菌
SOIQRYVDYNGAGVQVHIALKTBIDITTAIRLNR-----GTETLAAP-33	SOIEEYVDPYMGAGVQHIALRTNNIIDAITNLKAR-----GTETAKVP-ET	SOIEEYVDPYNGROVQVHIALRTPIRIEAVENLRGR-----GVETISVE-DT	SOIQETFLHHGGPGVOUULVAA5BDVRLTKRKTRAR5ANAGFPDFLFPPILPK	SOIQETFLDHGGPGVOVJHVALA5DDVRLTLRDXQAR5ANAGCFRPLNPF78D	SOIQETFLKINEGAGLQVHIALA5SDIPTLTRRERGR68IGQFDFH8PPT	SOIQETFLKINEGAGVQVULALV5HSDIPTLTRRERGR68IGQFDFH8PPT	SOIDBYLTFYGGAGVQVHIALNTWDIVETVTRTRDA-----GVQFLDT-D5	QOIBBFTLQFNGBOIQITVAPFL8DDLLKTBIDILK3I-----GGRFTTAPDT
..4111	..4111	..4111	..4111	..4111	..4111	..4111	..4111	..4111
1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	340	350	360	370				
YYLLMBRLKSAKIQVKSSHDVLEELHILVD-YDEKQ---YLLQITPKPM	YYEDKRIRLKROGIVLDBDPRFLKSLDILID-YDENQ---YLLQITPKPL	YYEBRRLRLKAGRKLBESFDIIOKTLNILD-YDEGQ---YLLQITPKPL	YYEGVRRRLAQ--DVLSEAQIKRCQBLQVLD-ADQG---VLLQITPKPV	YYDGVRRRLAQ--DVLSEAQIKRCQBLQVLD-ADQG---VLLQITPKPV	YYQNLKRRVQ--DVL8DDQIKKCEHLOILVD-ADQG---TLLOITPKPL	YYKHLKRRVQ--DVL8DEQIKKCEHLOILVD-ADQG---TLLOITPKPV	YYDTLOBRVQ---DTRVVDVTLRLKILAD-ADKDG---YLLQITPKPV	YYEHLMBRLP---NMBEYVQVHIALQVLLDGS85ODKLLLOIF3SETL
..41	..41	..41	..41	..41	..41	..41	..41	..41
1	1	1	1	1	1	1	1	1
260	290	300	310					
QDRPTLFLVLTQR-----H-----NIQGFQAGNYSLPKAPRR-K	MDRPTVPIEIIQR-----N-----NPSGFQAGNYSLPKALIR-K	MDRPTVPIEIIQR-----N-----NPSGFQAGNYSLPKALIR-K	QDRPTLFLMTHIQRIGCTCKDERG8YKQGGCGGQPKANTBFLFK8INDYR	QDRPTLFLMTHIQRIGCTCKDERG8YKQGGCGGQPKANTBFLFK8INDYR	QDRPTLFLMTHIQRIGCTCKDERG8YKQGGCGGQPKANTBFLFK8INDYR	QDRPTLFLMTHIQRIGCTCKDERG8YKQGGCGGQPKANTBFLFK8INDYR	QDRPTLFLMTHIQRIGCTCKDERG8YKQGGCGGQPKANTBFLFK8INDYR	QDRPTLFLMTHIQRIGCTCKDERG8YKQGGCGGQPKANTBFLFK8INDYR
..41	..41	..41	..41	..41	..41	..41	..41	..41
1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	330	340						

圖 1 (續)

圖式

鼠溪鼠	IIIVQKAREGQAKIVREFFWVEQDKFGKVKFAVLQTYGDTHITILVKKINVT
伊米提球蟲	ESVTFSAVRNQAENVSDPRIVTEDEQOIKNATIRITQGTTHITILIBRSOYR
禾生球腔菌	LAVYRRAVANQABSVSPHTDSCDEKDVISNAIKTYGDTTHITIPQRTTYT
大麥	ABAFPAARRRQARPAFAFVVDLQRO--FAFAVEVLQYDVVLRFVSSPDGT
玉米	BDATPASVVAQARPAFQPVVDLQRO--FLAHEVELYQDVVLRFVSSPDCA
擬南芥	BSATFIEVANQALPFSPPVILNRN--VTIAKVKLYQDVVLRFVSSYKQED
胡蘿蔔	AAAFENSVNQRNPASAPVEILDQ--ANLAEVELYQDVVLRFVSSYQREB
艾菲爾鏈黴菌	RAAIVYVAIIEIGQASVAFYEELQDEHGTIVLAALATTGKTRHTLVDRIGYD
螢光假單胞菌	QKAYRRALFKLAQPIHIRTQPMELN---LPAIKQIQGAPLYLIDRFQRO
螢光假單胞菌編號	1 100 110 120 130
鼠溪鼠	G---RFLPGFPAFTTYKDTLLPKLPRCNLEKIIDHIVGNQPPQEPQSSASBY
伊米提球蟲	G---QFMFGTRMB3NDADA7BKJLPKVLBRIDBCVGNQDMDEPERVCDTY
禾生球腔菌	G---PFLPGTR3CTTVD8ANKJLPVNLKAI DHCVGQNDMSBQDACDPY
大麥	D--VPFLPGFQGVTHFDADV-----YGLTRFDHVGVP--ELAPAAVYI
玉米	AG--SPFLPGFQGVN3FQAAD-----YGLSRFDHIVGNVP--ELAPAAVY
擬南芥	TEKBEFLPGFBRVKNDA58FP-ID--YQIRRLDIAVONVP--ELQPALTY
胡蘿蔔	G---LEFLPGFRAVKGOTASFPDLD--YQIRRLDIAVONVT--ELQPVBYI
艾菲爾鏈黴菌	G---PYLPGYVVA---PIVEFFANRTFOAIDHCVGQVRELGRNENKVOFY
螢光假單胞菌	5--BIYDIDVVFLEGVDRHP-VG--AQLKIIIDLTBIVYRGRPAVYMANFY
螢光假單胞菌編號	1 140 150 160 170
鼠溪鼠	LKHQLFURFNSVDDTVQVTEYS9LSLSIVVTNTYBR8IKQDINKTPAQ-RKK
伊米提球蟲	KKLLQFURFNSVDDKXDCITEFSALKGIYMA3PNDIVGAFINTEPAKXG-KKQ
禾生球腔菌	KKLCQFURFNSVDDKXDCITEFSALKBIVMS3PNQVVQDINTEPAVIG-KKK
大麥	AGTQFHEFAFTABDVQIT6GQLNSVVLANN8BQVLLPLNRFVHIGTKR
玉米	AGTQFHEFAFTABDVGTABSGQLNBHVLANN8BQVLLPLNRFVHIGTKR
擬南芥	AGTQFHEFAFTABDVGTABSGQLNSAVLANN8BQVLLPLNRFVHIGTKR
胡蘿蔔	KQFTQFHEFAFTABDVGTABSGQLNSAVLANN8BQVLLPLNRFVHIGTKR
艾菲爾鏈黴菌	NKYVQFTN7KBEFVODDIATBYSALNSKVVADDTLKVKFTINTEPALA-KKK
螢光假單胞菌	BDLPNFRIRIYF---DIKQBYTQULTBKANTAFDCKIRIPLNRE9SK--QA
螢光假單胞菌編號	1 180 190 200 210 220

圖 1 (續)

圖式

鼠溪鼠
伊米提球蟲
禾生球腔菌
大麥
玉米
擬南芥
胡蘿蔔
艾菲爾鏈黴菌
發光假單胞菌
發光假單胞菌編號

QALRGNLTDLSPNGVRSQM
QALRQTL1-----
QDLRONTL-----
KSLRAKQ8---AAVQGS--
KSLRAKQ8AAAAAAQGS--
KTLRAKQLVG-----
KTLRAKQITGSAA-----
QBRKGNLT-----
QVRRGVLSTD-----
1
350

圖 1 (結束)

圖式

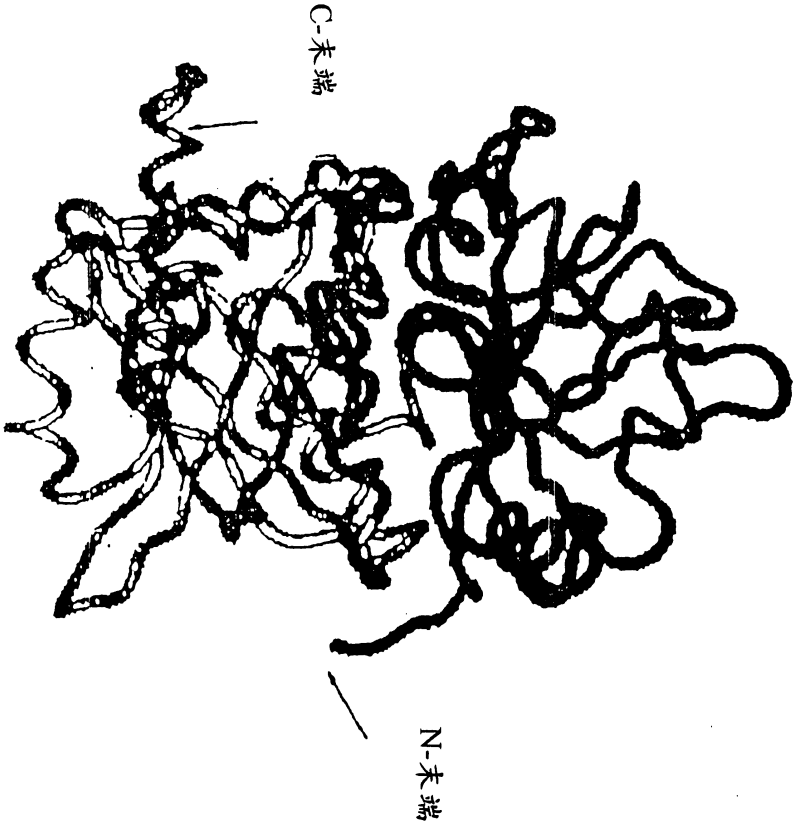


圖 2

圖式

序列 1：螢光假單孢菌(細菌)HPPD 357 個胺基酸

序列 2：集胞藻菌(藍藻細菌)HPPD 339 個胺基酸

Seq_1 MADLYENPMGL MGFEFIELAS PTPNTLEPIF B.LMGFTKVA THRSKD..VH
Seq_2 MEFDYLELYV DDYQSAHRCY QRQWGFTCVN KIITDQGIG

Seq_1 LYRQGAINLI LNNEPHSVAS Y..FAAZHGK SVCGMAPRVK DSQKAYKRAL
Seq_2 IYQQGQILLI ISASESSLR YADYLQKHPP GVGEVAWQVA NWQKIQHQLS

Seq_1 ELGAQPIHIE TGPMEINLPA IKGIGGAPLY LIDRFEGEGSS IYDIDFVFLE
Seq_2 EL....Q.IE TTPVIH..PL TRAEGLTFLL WGDVH...HS IYPVRSELNQ

Seq_1 GVDRHPVGAG LKIIDHLTHN VYGRMAYWA NFYEKLFNFR EIRYFDINGE
Seq_2 NKTLE..GVG LTTIDEVVLN LAADQFTQAS QWYQQVFGWS VQQSFTVNTF

Seq_1 YTGLTSKAMT APDGMIRIPL NEESSKGAGQ IEEFLMQFNG EGIQHVAFLS
Seq_2 HSGLYSEALA SANGKVQFNL NCPTNN.SSQ IQTFLANNEG AGIQHVAFST

Seq_1 DDLIKTWDHL KSIQMRMTA PPDYYEMLE GRLPNHG.SP VGELQARGIL
Seq_2 TSITRTVAHL RERGYNFLKI PTGYQQQRN SSYFNYSALD WDTLQCLEIL

Seq_1 LDGSSZSGDK RLLQIPSET LMGP..VFPE FIQRKG.DDG FGEGNFKALF
Seq_2 LDDQDNTG.E RLLQIFSQP CYGVGTLFWE IIERHRKAG FGQGNFOALY

* *

Seq_1 ESTERDQVRR GVLSTD
Seq_2 EAVETLEKQL EVP..

圖 3

公告本

九十年一月三日

90 1 3 修正
年 月 日 全本

申請日期：89.11.7

案號：87118646

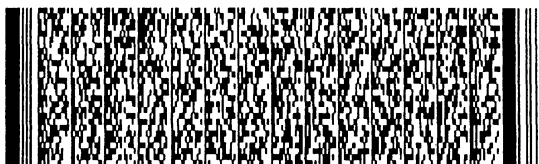
類別：C12N 15/53, A01H 5/100

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

591108

一、 發明名稱	中文	突變的羥苯基丙酮酸鹽二加氧酶、含此基因且耐受除草劑之DNA序列及植物的分離法
	英文	MUTATED HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE, DNA SEQUENCE AND ISOLATION OF PLANTS WHICH CONTAIN SUCH A GENE AND WHICH ARE TOLERANT TO HERBICIDES
二、 發明人	姓名 (中文)	1. 菲利浦 道德克 2. 海倫 波頓 3. 佛羅倫斯 度曼斯 4. 麥索 羅卓斯
	姓名 (英文)	1. PHILIPPE BOUDEC 2. HELENE BOURDON 3. FLORENCE DUMAS 4. MATTHEW RODGERS
	國籍	1. 法國 2. 法國 3. 法國 4. 英國
	住、居所	1. 法國里昂市蓋曼爾第耐維厄路7號 2. 法國艾考里市愛麗第楚里茲街8號 3. 法國佛瑞蘇沙儂市帝拉派翠莉路3號 4. 英國艾塞克斯市盎格區佛菲德路英國隆寶蘭農業有限公司
三、 申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 法商隆寶蘭農業有限公司
	姓名 (名稱) (英文)	1. RHONE-POULENC AGRO
	國籍	1. 法國
	住、居所 (事務所)	1. 法國里昂市皮爾巴扎特路14-20號
	代表人 姓名 (中文)	1. 法蘭克 鐵塔滋
	代表人 姓名 (英文)	1. FRANCK TETAZ



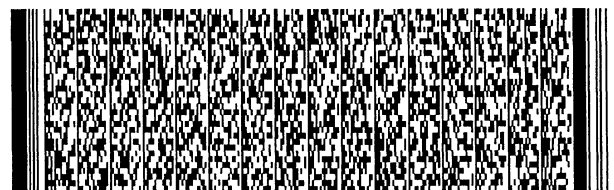
五、發明說明 (11)

表現之基因的啟動序列，特定言之，特別在植物葉部表現的啟動基因，如：所謂的細菌、病毒或植物來源的構成性啟動基因，如，例如在歐洲專利0 507 698號中描述的組織蛋白啟動基因，或稻米肌動蛋白之啟動基因，或是植物病毒基因之啟動基因，如，例如花椰菜鑲嵌病毒(CAMV 19S或35S)之啟動基因，或其他所謂的光-依賴性啟動基因，如：植物核酮糖二羧化酶/加氧酶(RuBisCO)之小亞單元的基因，或任何合適之已知的啟動基因，均適合在植物中用來作為啟動基因調節序列。

依據本發明，亦可能由啟動基因調節序列與其他位在啟動基因與編碼序列之間的調節序列組合使用，如：轉錄活化劑(促進子)，例如述於申請案W0 87/07644號中的菸草鑲嵌病毒(TEV)轉譯活化劑，或是由加林頓(Carrington)與弗利德(Freed)說明的菸草蝕刻病毒(TEV)活化劑。

可使用任何細菌來源的相應序列，如：來自根癌土壤桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的nos終止轉錄序列，或植物來源的序列，如：組織蛋白之終止轉錄序列，作為終止轉錄調節序列，或作為聚腺苷酸化序列。

根據本發明一項特定具體實施例，使用編碼轉運肽之核酸序列，該核酸序列的5'編碼突變的HPPD，將該轉運肽序列安置在啟動基因區和編碼突變HPPD的序列之間，以容許表現轉運肽/突變HPPD融合蛋白質，該突變HPPD如先前定義。轉運肽可以指揮突變HPPD進入質體內，更特定言之葉綠體內，當它通過質體膜時，在轉運肽和突變HPPD之間裂解該融合蛋白質。轉運肽可以是單一的，如：EPSPS轉運



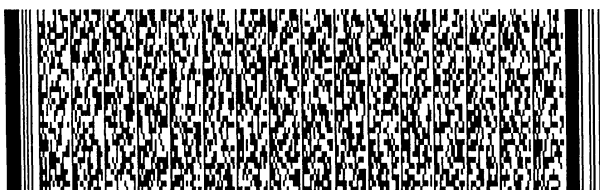
五、發明說明 (12)

肽(述於美國專利第5,188,642號中)，或為植物核酮糖二羧化酶/加氧酶小亞單元(RuBisCO ssu)的轉運肽，若適當時包括成熟RuBisCO ssu之N-末端部份的數個胺基酸(歐洲專利189 707號)，或為多重轉運肽，其包括第一個植物轉運肽，與具有質體位置的成熟蛋白質之N-末端序列的一部份融合，此部份再與第二個植物轉運肽融合，如歐洲專利508 909號所述，且更特別的是，最適切的轉運肽包括與玉蜀黍RuBisCO ssu之N-末端的22個胺基酸融合之向日葵RuBisCO ssu的轉運肽，其再與如歐洲專利508 909號所述之編碼序列之玉蜀黍RuBisCO ssu的轉運肽融合。

本發明亦關於轉運肽/突變之HPPD融合蛋白質，該融合蛋白質的兩個要素如上文定義。

本發明亦關於轉殖宿主生物之選殖及/或表現載體，該載體含有至少一個如上文定義之嵌合基因。除了上文的嵌合基因外，該載體亦含有至少一個複製起點。該載體可包括已經藉著導入根據本發明之嵌合基因轉殖成之質體、黏接質體、噬菌體或病毒。這類轉殖載體，依據待轉殖之宿主生物而異，是熟諳此藝者已熟知，並廣泛地說明於文獻中。所使用之轉殖載體，特別指用來轉殖植物細胞或植物的轉殖載體為病毒，其可用來轉殖發育中的植物，且其可另外含有它本身的複製和表現要素。根據本發明，轉殖植物細胞或植物的載體最好是質體。

本發明係關於轉殖宿主生物的方法，特別是植物細胞，其係藉由整合至少一個如上文定義之核酸序列或一個嵌合基因，可藉由任何適當的已知方法達成轉殖作用，該方法



五、發明說明 (26)

Freed))

otp= 最適當化之轉運肽(歐洲專利508 909 號)

pRP-VB3-b : 以BamHI 分解純系pRP-VB3 的DNA , 純化 , 然後連接到載體pZERO-1(英維金公司(Invitrogen))內 , 其不含BstEII 和SalI 限制酶切割位置 , 並以BamHI 分解 , 再純化所得的載體。依此方式將OTP之一部份、HPPD之基因和Nos 終止轉錄序列轉移到pZERO-1 內。

pRP-VB3-c : 以SalI 分解純系pRP-VB3-b 的DNA , 純化 , 然後在如下所示之接合體(寡核苷酸14和15-附錄的序列識別14 號和15 號)的存在下連接 , 而得以利用BstEII 限制酶切割位置來置換SalI 限制酶切割位置。

```

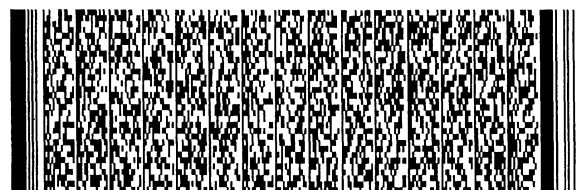
5' TCGAGAGAGAGGTGACCGAGAGA   3'
3'   CTCTCTCCACTGGCTCTCTAGCT   5'

```

pRP-VB3-d : 以BamHI 分解純系pRP-VB3-c 的DNA , 純化該嵌插序列 , 然後選殖到已經利用BamHI 分解的PUC19 載體(Biolabs)內。依此方式將OTP之一部份、HPPD 基因和Nos 終止轉錄序列轉移到PUC19 內。

pRP-VB3-e : 因為PUC19 載體不具有PmlI 和StuI 限制酶切割位置 , 所以利用PmlI 和StuI 分解純系pRP-VB3-d 的DNA , 純化 , 然後與其本身連接 , 藉此使其得以刪除HPPD 基因中的Not 位置 , 並縮短HPPD 之編碼部份約500 個鹼基對 , 以便後續有助於篩選已經整合突變種HPPDs 之轉殖菌落。

pRP-VB3-f : 以NotI 分解載體pRP-VB3-e , 並利用pfu 聚合酶(史塔金公司) , 以dNTPs 填充末端 , 之後 , 純化DNA ; 然後以BamHI 分解 , 純化 , 並選殖到KpnI- 分解過的PUC19



公告本

案號 87118646

91 年 9 月

91 9 27 修正
年 月 日
修正

圖式簡單說明

圖1 表示已知之HPPD序列與假單胞菌HPPD序列之排列。

圖2 表示假單胞菌HPPD單體之三級結構圖示。

圖3 表示螢光假單胞菌A32 HPPD(seq-1)與集胞藻屬
PCC6803 HPPD(seq-2)之排列。



六、申請專利範圍

1. 一種功能性突變羥苯基丙酮酸鹽二加氧酶(HPPD)，其對HPPD抑制劑較不敏感，其特徵在於其C-末端部份含有一或二處突變，其中，就假單胞菌HPPD序列而言，該突變胺基酸係選自下列胺基酸：Pro215、Gly298、Phe333、Gly334和Gly336。

2. 一種突變羥苯基丙酮酸鹽二加氧酶(HPPD)，其對HPPD抑制劑較不敏感，其特徵在於在其C-末端部份含有下列的序列：

-Phe-Xaa-Glu-Xab-Asn-Phe-

其中Xaa和Xab分別代表甘胺酸(Gly)或位阻大於甘胺酸的胺基酸，咸了解，如果Xaa或Xab代表Gly時，另一個胺基酸則與Gly不同。

3. 根據申請專利範圍第2項之突變的HPPD，其特徵在於Xaa和Xab中至少有一個代表Leu、Glu、Trp或Ile。

4. 根據申請專利範圍第3項之突變的HPPD，其特徵在於Xab代表Glu、Trp或Ile。

5. 根據申請專利範圍第4項之突變的HPPD，其特徵在於Xab代表Trp。

6. 根據申請專利範圍第1項之突變的HPPD，其特徵在於就假單胞菌HPPD序列而言，該突變胺基酸係選自下列胺基酸：Pro215和Gly336。

7. 根據申請專利範圍第6項之突變的HPPD，其特徵在於其含有選自下列的突變：Pro215Leu、Gly336Glu、Gly336Trp或Gly336Ile。



六、申請專利範圍

8. 一種核酸序列，其編碼根據申請專利範圍第1至7項中任一項之突變的HPPD。

9. 一種嵌合基因，其係由編碼序列和位於5'和3'位置之異源性調節要素所組成，能夠在宿主生物中發揮功能，特徵在於該編碼序列含有至少一個根據申請專利範圍第8項之核酸序列。

10. 根據申請專利範圍第9項之嵌合基因，其特徵在於該宿主生物係選自細菌，酵母菌，畢赤酵母(*Pichia*)，真菌，桿狀病毒，或植物細胞和植物。

11. 根據申請專利範圍第10項之嵌合基因，其中該細菌為大腸桿菌(*E. coli*)。

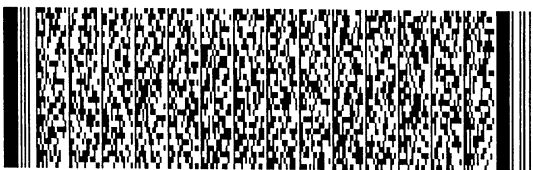
12. 根據申請專利範圍第10項之嵌合基因，其中該酵母菌為酒酵母菌屬(*Saccharomyces*)或克魯維爾酵母菌屬(*Kluyveromyces*)。

13. 根據申請專利範圍第10項之嵌合基因，其中該真菌為麴菌屬(*Aspergillus*)。

14. 根據申請專利範圍第10項之嵌合基因，其特徵在於該宿主生物為植物細胞或植物。

15. 根據申請專利範圍第14項之嵌合基因，其特徵在於其含有編碼突變HPPD之核酸序列之5'端，編碼植物轉運肽的核酸序列，將該序列安置在啟動基因區和編碼突變HPPD的序列之間，而得以容許其表現轉運肽/突變的HPPD融合蛋白質。

16. 一種轉運肽/突變HPPD融合蛋白質，其中轉運肽係指



六、申請專利範圍

揮突變HPPD進入質體內且該突變HPPD係如申請專利範圍第1至7項中任一項所定義者。



公告本

案號 87118646

九十年一月二日

修正

圖式

鼠溪球腔菌 伊米球腔菌 大麥 擬南芥 胡蘿蔔 艾菲爾鏈黴菌 發光假單胞菌 編號
鼠溪球腔菌 伊米球腔菌 大麥 擬南芥 胡蘿蔔 艾菲爾鏈黴菌 發光假單胞菌 編號
鼠溪球腔菌 伊米球腔菌 大麥 擬南芥 胡蘿蔔 艾菲爾鏈黴菌 發光假單胞菌 編號
鼠溪球腔菌 伊米球腔菌 大麥 擬南芥 胡蘿蔔 艾菲爾鏈黴菌 發光假單胞菌 編號

-----MTTNRN--KQPKPERG-----RPLIIFUS
MADPADSPTIQ-----PAQPSD-----LN-----QYROYDI
MADGALLVTSQNGRTSPLYDSDQVVP---APNALVGOE---VNYROYDI
MEPTPTPAA-TQAAAATVPEIDAP---IR-MVREPRSDRPIITLSFINI
MEPTPTAAGAAVVAASABQAPRLVGHNFVPRNTRSDRPIITLAFIUI
MGIQDAVEE-NQNHDDQNASPEQKLVQFSKIVRQPKRSDKPKVRIPI
MCKK-QSEAB-ILSSNSNTBPAITKLVOFNFPVRAANPKSDIIPAVKRPDI
-----HTQTHIT-----PDTAQADP-----FPVKQADA
-----MADLYEN-----PHG-----LMOPEP
1 1
1 10
VTFWGNAKQAASTYCRQGFBIPLAYROLTOSRKNVGINIKQKIVYVL
VIMVYGNAKQAAATYVYTFMQFBRVAYROLTOSKAVSINVRNRIITFIL
ABFWGNAKQVYVQFYITBQGFBRVAYROLTOSKFFASINVRNRIITFIL
VTFWGNADAAAGRPALALADPLAASDLSSTONSMASQLRSGSLATLE
VELWCADAAASAGRPALALADPLAASDLSSTONSMASQLRSGSLATLE
IBFWCGDATTNVRKRFSGRLGAPBARKDLSSTONMVIASYLITSGDLRFLF
IETFCODATTNVRKRFSGRLGAPBARKDLSSTONMVIASYLITSGDLRFLF
VVEFVGNAKQAA-EYSTAFQMLVAYSQPENGBRTABVYLTTHQSARFVL
IKLABPTPMTLEPIFEDQPTKVAITUR-----BKD---VILYRQQAINLIL
1 1 1 1
1 1 1 1
20 30 40 50
CGALN-----PMN-----KRYODILVYJICDGVKDLAFKVEHC
TSEPLR-SVBOA---SRFP---EDRLALKEDIALHLKRIKQDVVKDVAFRVDCV
TSPVRSBAQRT---LXAAPLADQARLDERTYDILDKIKQDVVKDVAFRVDDV
TAPYANGCDNA-----TASLEPFBADAAARFSAIDIGIIVRSVALRVADA
TAPYANGCDNA-----TASLEPFBADAAARFSAIDIGIIVRSVALRVADA
TAPYEPGLEAGEIKPTT8I9SPDQSCRSFFSGIOLQVRAVAIIVERDA
TAPYEP8ITTS808---ALIP9FBASGFUSFAAKIOLAVRAIALRVADV
TEVIK--P--A---TPHG-----HFLADHVAESHOQVVDLAIIRVEDA
NREPH-----S-----VAGYFAAEIHO9SVCCVAFRVKDS
* * * * *

圖 1