(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-512020
(P2004-512020A)
(43)公表日　平成16年4月22日(2004.4.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/15	C12N 1/15		4B063
C12N 1/19	C12N 1/19		4B065
C12N 1/21	C12N 1/21		
C12N 5/10	C12Q 1/02		

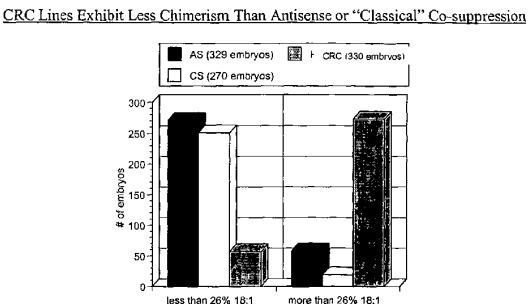
審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 138 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-506219(P2002-506219)
(86)(22)出願日　平成13年6月22日(2001.6.22)
(85)翻訳文提出日　平成14年12月16日(2002.12.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/019962
(87)国際公開番号　WO2002/000904
(87)国際公開日　平成14年1月3日(2002.1.3)
(31)優先権主張番号　60/213,961
(32)優先日　平成12年6月23日(2000.6.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　390023674
イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー
E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
アメリカ合衆国、デラウエア州、ウイルミントン、マーケット・ストリート　１００７
(71)出願人　502333736
パイオニア・ハイ－ブレツド・インターナシヨナル・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国アイオワ州５０３０９デスモイネス・ローカストストリート４００・キヤピタルスクエア８００
最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換え構築物ならびにこれを遺伝子発現を減少させる際に用いる方法

(57)【要約】
内在性mRNAおよび実質的に類似の内在性mRNAの発現を減少させるのに有用な組換え構築物について開示する。特に、とりわけ好適な核酸配列およびその逆相補体を含む組換え構築物を用いて、この好適な核酸配列に近接した相同的な内在性RNA（すなわち標的RNA）の発現を変化させることが可能である。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）に近接した２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項２】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の５’に位置するＲＮＡ領域と、
（ｃ）（ａ）の３’に位置する、（ｂ）のＲＮＡの逆相補体と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項３】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の５’に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項４】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の３’に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項５】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の中に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項６】
宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）が非天然型の合成ＲＮＡ配列を含む、請求項１～５のいずれかに記載の組換え構築物。
【請求項７】
宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）が植物ウイルスのＲＮＡを含まないことを特徴とする、請求項１～５のいずれかに記載の組換え構築物。
【請求項８】

標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項１～５に記載の組換え構築物のうちいずれかを用いて宿主を形質転換し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項９】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項６に記載の組換え構築物を用いて宿主を形質転換し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項１０】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項７に記載の組換え構築物を用いて宿主を形質転換し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項１１】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）に近接した２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項１２】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の５’に位置するＲＮＡ領域と、
（ｃ）（ａ）の３’に位置する、（ｂ）のＲＮＡの逆相補体と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項１３】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の５’に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項１４】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の３’に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項１５】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の中に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項１６】

宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）が非天然型の合成ＲＮＡ配列を含む、請求項１１～１５のいずれかに記載のＲＮＡ。
【請求項１７】
宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）が植物ウイルスのＲＮＡを含まない、請求項１１～１５のいずれかに記載のＲＮＡ。
【請求項１８】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項１１～１５のＲＮＡのうちいずれかを宿主に導入し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項１９】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項１６に記載の組換え構築物を宿主に導入し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項２０】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項１７に記載の組換え構築物を宿主に導入し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項２１】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、前記領域が（ａ）に近接していることを条件とする）と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項２２】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされるＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、（ａ）の５’に位置することを条件とする）と、
（ｃ）（ａ）の３’に位置する、（ｂ）の核酸の逆相補体と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項２３】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の５’に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少さ

せるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項２４】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の３’に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項２５】
宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の中に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、組換え構築物。
【請求項２６】
宿主のゲノムの核酸配列が、この宿主で発現されない配列である、請求項２１～２５に記載の組換え構築物。
【請求項２７】
宿主のゲノムの核酸配列が、この宿主で発現される配列である、請求項２１～２５に記載の組換え構築物。
【請求項２８】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項２１～２５に記載の組換え構築物のうちいずれかを用いて宿主を形質転換し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項２９】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項２６に記載の組換え構築物を用いて宿主を形質転換し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項３０】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項２７に記載の組換え構築物を用いて宿主を形質転換し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項３１】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、この領域が（ａ）に近接していることを条件とする）と、を有するＲＮＡであって、

宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項３２】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされるＲＮＡ領域（ただし、前記配列が、標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、（ａ）の５’に位置することを条件とする）と、
（ｃ）（ａ）の３’に位置する、（ｂ）のＲＮＡの逆相補体と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項３３】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、この領域が（ａ）の５’に位置することを条件とする）と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項３４】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の３’に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項３５】
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の中に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであることを特徴とする、ＲＮＡ。
【請求項３６】
宿主のゲノムの核酸配列が、この宿主で発現されない配列である、請求項３１～３５のいずれかに記載のＲＮＡ。
【請求項３７】
宿主のゲノムの核酸配列が、この宿主で発現される配列である、請求項３１～３５のいずれかに記載のＲＮＡ。
【請求項３８】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項３１～３５に記載のＲＮＡのうちいずれかを宿主に導入し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項３９】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、

（ａ）請求項３６に記載のＲＮＡを宿主に導入し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項４０】
標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）請求項３７に記載のＲＮＡを宿主に導入し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含むことを特徴とする、方法。
【請求項４１】
必須植物遺伝子を同定またはスクリーニングするための方法であって、
（ａ）構成的プロモーターを含み、必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる組換え構築物を用いて、植物細胞を形質転換し、
（ｂ）工程（ａ）で得られた形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｃ）必須植物遺伝子の発現を減少させない対照物から得られる形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｄ）工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化と、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化とを比較することを含み、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化が工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化を実質的に超えるものであることを特徴とする、方法。
【請求項４２】
必須植物遺伝子を同定またはスクリーニングするための方法であって、
（ａ）必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる構成的プロモーターをさらに含む請求項１～５のいずれかに記載の組換え構築物を用いて、植物細胞を形質転換し、
（ｂ）工程（ａ）で得られた形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｃ）必須植物遺伝子の発現を減少させない対照物から得られる形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｄ）工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化と、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化とを比較することを含み、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化が工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化を実質的に超えるものであることを特徴とする、方法。
【請求項４３】
必須植物遺伝子を同定またはスクリーニングするための方法であって、
（ａ）必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる構成的プロモーターをさらに含む請求項６のいずれかに記載の組換え構築物を用いて、植物細胞を形質転換し、
（ｂ）工程（ａ）で得られた形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｃ）必須植物遺伝子の発現を減少させない対照物から得られる形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｄ）工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化と、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化とを比較することを含み、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化が工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化を実質的に超えるものであることを特徴とする、方法。
【請求項４４】
必須植物遺伝子を同定またはスクリーニングするための方法であって、
（ａ）必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる構成的プロモーターをさらに含む請求項７のいずれかに記載の組換え構築物を用いて、植物細胞を形質転換し、
（ｂ）工程（ａ）で得られた形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｃ）必須植物遺伝子の発現を減少させない対照物から得られる形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、

（ｄ）工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化と、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化とを比較することを含み、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化が工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化を実質的に超えるものであることを特徴とする、方法。

【請求項４５】

２つの相補的なＲＮＡ配列をコードするＤＮＡ配列が、配列番号１２、１３または３４に記載の配列のうちいずれかの中で構成されることを特徴とする、請求項１～５のいずれかに記載の組換え構築物。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

技術分野

本発明は、遺伝子発現を減少させることに関し、特に、内在性ｍＲＮＡおよび実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させる上で有用な組換え構築物に関する。

【０００２】

発明の背景

多くの遺伝子の協調発現を必要とする複雑な生理学的・生化学的にプロセスのひとつに植物の発達がある。こうした遺伝子発現の協調パターンを変えることで、栄養面または耐病性面で形質が改善された新種の植物を作り出すことができる。組換えＤＮＡ手法が用いられるようになったことで、他の植物遺伝子の発現に直接的な影響をおよぼすことなく特定の植物遺伝子各々の発現パターンを変えることが可能になった。このようにして、植物全体、特定の組織または発達段階において個々の遺伝子の発現パターンを強めたり少なくしたりすることができる。したがって、プロモーターとターミネーターとを用いてトランスジーンを構築し、これをさまざまな生物体で発現させることが現在では常道となっている。

【０００３】

しかしながら、文献では導入したトランスジーンに予想通りの発現パターンを示さないものがあるという報告がいくつかなされている。このような予想外の発現パターンは、線虫から植物まで多岐にわたる生物体で見られる。たとえば、強力なプロモーターの制御下で内在性遺伝子のトランスジェニックコピーを導入した植物のなかには、ときおりその遺伝子に対するｍＲＮＡを蓄積できないものがある。さらに、トランスジーンに対する配列相同性を持つ内在性遺伝子から得られるｍＲＮＡはいずれも、内在性遺伝子産物の発現を効果的に排除しつつｍＲＮＡを蓄積することができない。これは、ペチュニアに含まれるカルコン合成酵素のトランスジーンが内在性カルコン合成酵素遺伝子の抑制を引き起こしたことで初めて明らかになった（Ｎａｐｏｌｉら （１９９０） Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ２：２７９～２８９）。

【０００４】

導入したトランスジーンと内在性遺伝子の両方の発現が抑制されるため、この現象は「コサプレッション（同時抑制）」と呼ばれた（概要については、Ｖａｕｃｈｅｒｅｔら （１９９８） Ｐｌａｎｔ Ｊ １６：６５１～６５９；Ｇｕｒａ （２０００） Ｎａｔｕｒｅ ４０４：８０４～８０８を参照のこと）。コサプレッション技術はＪｏｒｇｅｎｓｅｎらに付与された１９９９年７月２７日発行の米国特許第５，２３１，０２０号の主題をなしている。コサプレッションは、植物生物学者の間では「ジーンサイレンシング」または転写後型ジーンサイレンシング（ＰＴＧＳ）とも呼ばれ、蠕虫およびハエについて研究している者の間では「ＲＮＡ干渉」と呼ばれ（ＭｏｎｔｇｏｍｅｒｙおよびＦｉｒｅ （１９９８） ＴＩＧ １４：２５５～２５８；Ｆｉｒｅら （１９９８） Ｎａｔｕｒｅ ３９１：８０６～８１１；Ｈａｍｍｏｎｄら （２０００） Ｎａｔｕｒｅ ４０４：２９３～２９６；１９９９年７月１日公開の国際特許出願公開第ＷＯ９９／３２６１９号公報）、真菌を扱う研究者には「ｑｕｅｌｌｉｎｇ」と呼ばれている（ＲｏｍａｎｏおよびＭａｃｉｎｏ （１９９２） Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ６：３３４３～３３５３）。

【０００５】
アンチセンスＲＮＡ遺伝子またはセンスＲＮＡ遺伝子の一方によって特定の遺伝子の発現が阻害される機序は明確になっていない。トランスジェニック植物で所望の下方制御が達成される頻度は一般に低く、遺伝子、そのプロモーターの強度と特異性、形質転換方法、トランスジーン挿入イベントの複雑さなどによって異なる。（Ｇｒａｎｔ （１９９９） Ｃｅｌｌ ９６：３０３～３０６；Ｓｅｌｋｅｒ （１９９９） Ｃｅｌｌ ９７：１５７～１６０。）
【０００６】
ＰＴＧＳはウイルスおよびトランスポゾンによる感染に対処するために発達した古くからの自己防衛機構のひとつではないかと推測される。この病原体由来の耐性は、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）または他の何らかの異常な核酸が宿主の細胞に存在することが引き金になって生じるように思われる。これはウイルスによる襲撃を示すものである。通常、細胞のまわりを自由に移動しているＲＮＡは、宿主遺伝子とこの遺伝子がコードするタンパク質との間の中間体としての一本鎖メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）のはずである。異常なＲＮＡが侵入してくると、この侵入してきた核酸配列にマッチするｍＲＮＡはいずれも活動停止してしまう。引き金となるものが宿主の遺伝子配列の一部と相同であれば、宿主とウイルス遺伝子の両方がサイレンシングされる（Ｂａｕｌｃｏｍｂｅ （１９９６） Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ８：１８３３～１８４４）。１９９９年４月１日に公開されたＷＯ９９／１５６８２および１９９８年８月２０日に公開されたＷＯ９８／３６０８３には、ジーンサイレンシング材料と方法とについて説明されている。これらの公報には、特に、サイレンシング対象の標的遺伝子と相同な遺伝子配列の全体または一部と結合させた植物ウイルスの核酸配列を含む発現構築物を導入することによる植物ゲノム遺伝子発現のサイレンシングについて記載されている。
【０００７】
１９９９年１０月２１日に公開されたＷＯ９９／５３０５０には、発現されるＲＮＡが分子内二本鎖ＲＮＡ構造を形成できるように、センス配列とアンチセンス配列とで構成され、標的核酸に特異的なＲＮＡ分子をコードするキメラ構築物が記載されている。このようなＲＮＡがトランスジェニック生物体で発現すると、細胞内の相同的な標的核酸配列がすべてジーンサイレンシングされる。
【０００８】
Ｂｉｒｄらに付与された１９９９年８月２５日発行の米国特許第５，９４２，６５７号ならびに１９９３年１１月２５日公開のＷＯ９３／２３５５１号には、標的遺伝子およびプロモーターの各々と相同な複数の異なるＤＮＡ領域を有する単一の制御遺伝子を導入することで、２つまたはそれ以上の遺伝子を阻害する植物遺伝子の発現の協調阻害について記載されている。このプロモーターは、各標的遺伝子の発現を阻害する上記のような異なる領域のＲＮＡから転写するように適合化された植物で作用するものである。
【０００９】
本発明では、これまで従来の説明がなされていなかった方法で後述するような好適なＤＮＡ配列またはこの配列由来のＲＮＡ配列を利用することについて説明する。これらの配列ならびにその逆相補体を用いて、ＤＮＡ配列またはこの配列由来のＲＮＡ配列と近接した核酸断片との間で実質的な類似点のある内在性ゲノム配列の発現を減少させることができる。この現象の詳細について本願明細書で説明する。
【００１０】
発明の開示
本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）に近接した２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少さ

せるものである、組換え構築物に関する。
【００１１】
第２の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の５’に位置するＲＮＡ領域と、
（ｃ）（ａ）の３’に位置する、（ｂ）のＲＮＡの逆相補体と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。
【００１２】
第３の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の５’に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。
【００１３】
第４の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の３’に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。
【００１４】
第５の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の中に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。
【００１５】
上記組換え構築物の別の態様において、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は非天然型の合成ＲＮＡ配列を含むものである。
【００１６】
上記組換え構築物のさらに他の態様において、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は植物ウイルスのＲＮＡを含まないものである。
【００１７】
第６の実施形態において、本発明は、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）上述した組換え構築物のうちいずれかを用いて宿主を形質転換し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含む方法に関する。
【００１８】
第７の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）に近接した２つの相補

的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであるＲＮＡを含む、組換え構築物に関する。
【００１９】
第８の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の５’に位置するＲＮＡ領域と、
（ｃ）（ａ）の３’に位置する、（ｂ）のＲＮＡの逆相補体と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであるＲＮＡを含む、組換え構築物に関する。
【００２０】
第９の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の５’に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであるＲＮＡを含む、組換え構築物に関する。
【００２１】
第１０の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の３’に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであるＲＮＡを含む、組換え構築物に関する。
【００２２】
第１１の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）の中に位置する２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであるＲＮＡを含む、組換え構築物に関する。
【００２３】
上記ＲＮＡの別の態様において、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は非天然型の合成ＲＮＡ配列を含むものである。
【００２４】
上記組換え構築物のさらに他の態様において、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は植物ウイルスのＲＮＡを含まないものである。
【００２５】
第１２の実施形態において、本発明は、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、
（ａ）上述したＲＮＡのうちいずれかを宿主に導入し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含む方法に関する。
【００２６】
第１３の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（た

だし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、前記領域が（ａ）に近接していることを条件とする）と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。

【００２７】

第１４の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされるＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、（ａ）の５’に位置することを条件とする）と、
（ｃ）（ａ）の３’に位置する、（ｂ）の核酸の逆相補体と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。

【００２８】

第１５の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の５’に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。

【００２９】

第１６の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の３’に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。

【００３０】

第１７の実施形態において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、
（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の中に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有し、
発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。

【００３１】

上記組換え構築物の別の態様において、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は非天然型の合成ＲＮＡ配列を含むものである。

【００３２】

上記組換え構築物のさらに他の態様において、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は植物ウイルスのＲＮＡを含まないものである。

【００３３】

第１８の実施形態において、本発明は、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、

（ａ）上述した組換え構築物のうちいずれかを用いて宿主を形質転換し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含む方法に関する。
【００３４】
第１９の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、この領域が（ａ）に近接していることを条件とする）と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、ＲＮＡに関する。
【００３５】
第２０の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされるＲＮＡ領域（ただし、前記配列が、標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、（ａ）の５’に位置することを条件とする）と、
（ｃ）（ａ）の３’に位置する、（ｂ）のＲＮＡの逆相補体と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、ＲＮＡに関する。
【００３６】
第２１の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、この領域が（ａ）の５’に位置することを条件とする）と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、ＲＮＡに関する。
【００３７】
第２２の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の３’に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、ＲＮＡに関する。
【００３８】
第２３の実施形態において、本発明は、（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、
（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされ、かつ、（ａ）の中に位置する、２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであることを条件とする）と、を有するＲＮＡであって、
宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、ＲＮＡに関する。
【００３９】

上記ＲＮＡの別の態様において、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は非天然型の合成ＲＮＡ配列を含むものである。

【００４０】

上記組換え構築物のさらに他の態様において、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は植物ウイルスのＲＮＡを含まないものである。

【００４１】

第２４の実施形態において、本発明は、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、

（ａ）上述したＲＮＡのうちいずれかを宿主に導入し、

（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含む方法に関する。

【００４２】

第２５の実施形態において、本発明は、必須植物遺伝子を同定またはスクリーニングするための方法であって、

（ａ）構成的プロモーターを含み、必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる組換え構築物を用いて、植物細胞を形質転換し、

（ｂ）工程（ａ）で得られた形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、

（ｃ）必須植物遺伝子の発現を減少させない対照物から得られる形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、

（ｄ）工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化と、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化とを比較することを含み、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化が工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化を実質的に超えるものである方法に関する。

【００４３】

第２６の実施形態において、本発明は、必須植物遺伝子を同定またはスクリーニングするための方法であって、

（ａ）ＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む本発明の組換え構築物であって、必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる構成的プロモーターをさらに含む本発明の組換え構築物のうちいずれかを用いて、植物細胞を形質転換し、

（ｂ）工程（ａ）で得られた形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、

（ｃ）必須植物遺伝子の発現を減少させない対照物から得られる形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、

（ｄ）工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化と、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化とを比較することを含み、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化が工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化を実質的に超えるものである、方法に関する。

【００４４】

本件出願の一部をなす以下の詳細な説明および添付の図面ならびに配列表から、本発明を一層よく理解することができる。

【００４５】

配列表の簡単な説明

添付の配列表（配列番号１～３５）は、本願明細書にて述べるさまざまなプラスミドを設計する上で用いるオリゴヌクレオチド配列、あるいは、これらのプラスミドのうちいくつかに見られる相補的な領域の配列を説明するものである。

配列番号１は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ９１を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。

配列番号２は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ９１を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。

配列番号３は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ９１を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号４は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ９１を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号５は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ９１を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号６は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ９１を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号７は、さまざまな制限酵素部位をプラスミドｐＫＳ１７に挿入してプラスミドｐＫＳ１０２を作製するのに用いるリンカーオリゴヌクレオチドである。
配列番号８は、ダイズＣｅｒ３遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ１００を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号９は、ダイズＣｅｒ３遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ１００を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号１０は、ダイズＣｅｒ３遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ１００を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号１１は、ダイズＣｅｒ３遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ６７に挿入してプラスミドｐＫＳ１００を作製するためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号１２は、プラスミドｐＫＳ１０６およびｐＫＳ１２４に見られるＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳという名前の１×相補的リピートを示す。
配列番号１３は、プラスミドｐＫＳ１３３に見られるＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳという名前の２×相補的リピートを示す。
配列番号１４は、ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳ相補的な領域のＰＣＲ増幅に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号１５は、ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳ相補的な領域のＰＣＲ増幅に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号１６は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ１１１を作製するためにプラスミドｐＫＳ１０６に挿入される５９９ヌクレオチド断片を作製するオリゴヌクレオチドプライマーの配列である、
配列番号１７は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、プラスミドｐＫＳ１０６に挿入してプラスミドｐＫＳ１１１を作製する５９９ヌクレオチド断片を得るためのオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号１８は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、標的配列のサイズの要件を試験する際に用いられる共通の５’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号１９は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、２５ｂｐの断片を作製するための３’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２０は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、７５ｂｐの断片を作製するための３’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２１は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、１５０ｂｐの断片を作製するための３’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２２は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、３００ｂｐの断片

を作製するための３’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２３は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、６００ｂｐの断片を作製するための３’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２４は、ｐＫＳ１１１から得られる５９９ヌクレオチドのＦａｄ２－１　ＮｏｔＩ断片とダイズΔ－９不飽和化酵素から得られる９６９ヌクレオチドの断片とを囲む２×ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳの相補的な領域を含むｐＢＳ６８から得られる２×ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳの相補的リピート領域を示す。
配列番号２５は、ＬｅａプロモーターのＰＣＲ増幅に使用される５’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２６は、ＬｅａプロモーターのＰＣＲ増幅に使用される３’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２７は、ファゼオリン３’末端のＰＣＲ増幅に使用される５’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２８は、ファゼオリン３’末端のＰＣＲ増幅に使用される３’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
配列番号２９は、２種類のダイズガラクチノール合成酵素遺伝子ＧＡＳ１およびＧＡＳ２（それぞれ４１１ヌクレオチドおよび４３５ヌクレオチド）から得られる断片を含むｐＫＳ１４９から得られる２×ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳの相補的リピート領域を示す。この領域は、ダイズ後期胚プロモーター（ＬＥＡ）およびファゼオリン３’ターミネーター領域と機能的に結合されている。この領域全体を、ダイズＫｔｉプロモーターおよびターミネーター領域に制御される２×ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳの相補的リピート領域を含むｐＫＳ１３６のＢａｍＨＩ部位にクローニングする。
配列番号３０は、ダイズガラクチノール合成酵素遺伝子ＧＡＳ１のＤＮＡ配列を示す。
配列番号３１は、配列番号３０すなわちダイズガラクチノール合成酵素遺伝子ＧＡＳ１の推定上の翻訳産物のＤＮＡ配列を示す。
配列番号３２は、ダイズガラクチノール合成酵素遺伝子ＧＡＳ２のＤＮＡ配列を示す。
配列番号３３は、配列番号３２すなわちダイズガラクチノール合成酵素遺伝子ＧＡＳ２の推定上の翻訳産物のＤＮＡ配列を示す。
配列番号３４は、フィトエン不飽和化酵素断片を含有するプラスミドＰＨＰ１７８９４を構築する際に用いられる、プラスミドＰＨＰ１７９６２から得られる相補的な領域ＳＨＨ３を示す。相補的な領域はそれぞれ８－２１２および３０５－５０９からである。ＥｃｏＲＶ、ＫｐｎＩ、ＫｓｐＩ、ＳｐｈＩおよびＮｃｏＩの制限エンドヌクレアーゼ部位を相補的な領域間のクローニング部位として用いることができる。
配列番号３５は、ダイズアセトラクテート合成酵素（ＡＬＳ）遺伝子のＤＮＡ配列を示す。
配列番号３６は、ダイズＦａｄ２－１遺伝子のＰＣＲ増幅に使用され、５０ｂｐの断片を作製するための３’オリゴヌクレオチドプライマーの配列である。
【００４６】
発明の詳細な説明
本件開示内容との関連で、多数の用語を使用しなければならない。
【００４７】
「宿主」という用語は、ヒトまたは非ヒトを問わず、遺伝子発現を減少させる目的で組換え構築物を安定してまたは一過的に導入可能な生物体またはその細胞を示す。
【００４８】
本願明細書において使用する場合、「単離された核酸断片」は、合成、非天然または改変したヌクレオチド塩基を任意に含有する一本鎖または二本鎖のＲＮＡまたはＤＮＡのポリマーである。ＤＮＡのポリマーの形での単離された核酸断片は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡまたは合成ＤＮＡの１つまたはそれ以上のセグメントで構成されるものであってもよい。ヌクレオチド（通常はその５’－一リン酸の形態で見られる）を一文字表記で以下のように示す。アデニル酸またはデオキシアデニル酸（それぞれＲＮＡまたはＤＮＡ）は「Ａ」

、シチジル酸またはデオキシシチジル酸は「Ｃ」、グアニル酸またはデオキシグアニル酸は「Ｇ」、ウリジン酸は「Ｕ」、デオキシチミジン酸は「Ｔ」、プリン（ＡまたはＧ）は「Ｒ」、ピリミジン（ＣまたはＴ）は「Ｙ」、ｇまたはＴは「Ｋ」、ＡまたはＣまたはＴは「Ｈ」、イノシンは「Ｉ」、ヌクレオチドは「Ｎ」である。

【００４９】

「機能的に等価である細断片」および「機能的に等価な細断片」という表現は、本願明細書では同義に用いられる。これらの表現は、断片または細断片が活性酵素をコードするか否かを問わず遺伝子発現を改変または特定の表現型を生む能力が保たれた単離された核酸断片の一部またはサブ配列を示す。たとえば、この断片または細断片をキメラ遺伝子の設計に用いて、形質転換した植物で所望の表現型を得ることができる。活性酵素をコードするか否かを問わず、核酸断片またはその細断片を植物プロモーター配列に対して適当な配向で結合させることで、キメラ遺伝子をコサプレッションまたはアンチセンスで使用するように設計することも可能である。

【００５０】

「相同性」、「相同的な」、「実質的に類似の」および「実質的に対応する」という表現は、本願明細書では同義に用いられる。これらの表現は、１つまたはそれ以上のヌクレオチド塩基の違いが遺伝子発現を媒介または特定の表現型を生む核酸断片の能力に影響しない核酸断片を示す。また、これらの表現は、得られる核酸断片の機能的特性が最初の未修飾の断片に対して実質的に変わることのない、ヌクレオチド１つまたはそれ以上の欠失または挿入などの本発明の核酸断片の修飾も含む。したがって、当業者であれば明らかなように、本発明は具体的に例示した配列以外の配列も包含することは理解できよう。

【００５１】

さらに、当業者であれば、本発明に包含される実質的に類似の核酸配列が、中程度にストリンジェントな条件（たとえば、０．５×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、６０℃）下で、本願明細書において例示する配列とハイブリダイズする機能または本発明のプロモーターと機能的に等価である本願明細書において報告するヌクレオチド配列のいずれかの部分にハイブリダイズされる機能によっても定義されることが分かるであろう。ストリンジェンシー条件については、近親の生物体から得られる、機能的酵素が重複する遺伝子などの極めて類似した断片に対して、関連の遠縁の生物体から得られる相同的な配列など中程度に類似した断片をスクリーニングするように調節することができる。ストリンジェンシー条件はハイブリダイゼーション後の洗浄によって決まる。一組の好ましい条件として、６×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳを室温にて１５分間から開始し、続いて２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳを４５℃にて３０分間を繰返し、さらに０．２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳを５０℃で３０分間を２回繰り返す一連の洗浄があげられる。一層好ましいストリンジェントな条件の組では温度を高めにする。この場合、０．２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳでの最後の３０分間の洗浄２回の温度を６０℃に上げること以外は上記と同じ洗浄である。極めてストリンジェントな条件の別の好ましい組として、最終洗浄２回を０．１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳで６５℃にて行うことがあげられる。

【００５２】

標的ｍＲＮＡに対して相同性のある構築物におけるＲＮＡ領域と標的（内在性）ｍＲＮＡとの実質的な類似度に鑑みると、このような配列は少なくとも２５ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも５０ヌクレオチド長、さらに好ましくは少なくとも１００ヌクレオチド長、一層好ましくは少なくとも２００ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも３００ヌクレオチド長であるものとし、少なくとも８０％同一、好ましくは少なくとも８５％同一、さらに好ましくは少なくとも９０％同一、最も好ましくは少なくとも９５％同一であるものとする。

【００５３】

相同的な配列を検出するように設計された多種多様な比較方法を用いて配列のアライメントと類似率の計算値を求めることができる。その一例として、ＬＡＳＡＲＧＥＮＥバイオインフォマティクスコンピューティングパッケージのＭｅｇａｌｉｇｎプログラム（ウィ

スコンシン州マディソンのＤＮＡＳＴＡＲ　Ｉｎｃ．）があげられるが、これに限定されるものではない。ここではＣｌｕｓｔａｌ法でのアライメント（ＨｉｇｇｉｎｓおよびＳｈａｒｐ（１９８９）ＣＡＢＩＯＳ．５：１５１～１５３）をデフォルトのパラメータ（ＧＡＰ　ＰＥＮＡＬＴＹ＝１０、ＧＡＰ　ＬＥＮＧＴＨ　ＰＥＮＡＬＴＹ＝１０）で用いて配列のマルチプルアライメントを実施する。Ｃｌｕｓｔａｌ法を用いる対アライメントについてのデフォルトのパラメータおよびタンパク質配列の同一率の計算は、ＫＴＵＰＬＥ＝１、ＧＡＰ　ＰＥＮＡＬＴＹ＝３、ＷＩＮＤＯＷ＝５およびＤＩＡＧＯＮＡＬＳ　ＳＡＶＥＤ＝５である。核酸では、これらのパラメータをＫＴＵＰＬＥ＝２、ＧＡＰ　ＰＥＮＡＬＴＹ＝５、ＷＩＮＤＯＷ＝４およびＤＩＡＧＯＮＡＬＳ　ＳＡＶＥＤ＝４とする。

【００５４】

「遺伝子」とは、コード配列の前（５’非コード配列）および後（３’非コード配列）の制御配列を含む、特定のタンパク質を発現する核酸断片を示す。「未変性遺伝子」とは、それぞれの制御配列がある自然界に見られる遺伝子を示す。「キメラ遺伝子」とは、自然界では一緒に見られることのない制御配列とコード配列とを含む、未変性遺伝子ではない遺伝子を示す。したがって、キメラ遺伝子は、異なる起源由来の制御配列およびコード配列または同一起源由来の制御配列およびコード配列を含むが、自然界で見られるものとは異なる形で配列されたものであってもよい。「外来」遺伝子とは、宿主生物では通常見られないが、遺伝子移入によって宿主生物に導入された遺伝子を示す。外来遺伝子は自然界の生物体に挿入した未変性遺伝子またはキメラ遺伝子を持つ場合がある。「トランスジーン」とは、形質転換法によってゲノムに導入された遺伝子である。

【００５５】

「必須植物遺伝子」という用語は、本願明細書において使用する場合、植物の正常な成長、発達および／または生存に必要な産物をコードする遺伝子を示す。ＡＬＳに加えて、必須植物遺伝子の一例として、アミノ酸、核酸または脂質の生合成における律速酵素があげられるが、これに限定されるものではない。また、機能が明らかになっていない多くの遺伝子が必須であり得ると思われる。化学的または遺伝的な手段によって必須植物遺伝子を抑制すると、成長および／または発達の状態が変化することになる。必須遺伝子が植物のゲノムにおいて特有のものであると、抑制を行うことで植物が枯れる場合がある。これは植物用の多くの除草剤の基礎となっていることである。

【００５６】

「コード配列」とは、特定のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を示す。「制御配列」とは、コード配列の上流（５’非コード配列）、コード配列内またはコード配列の下流（３’非コード配列）に位置し、転写、ＲＮＡのプロセシングまたは安定性あるいは関連のコード配列の翻訳に影響するヌクレオチド配列を示す。制御配列は、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロンおよびポリアデニル化の認識配列を含み得るが、これに限定されるものではない。

【００５７】

「プロモーター」とは、コード配列または機能的ＲＮＡの発現を制御できるＤＮＡ配列を示す。プロモーター配列は、近位と一層遠位の上流要素からなり、後者の要素はエンハンサーと呼ばれることが多い。したがって、「エンハンサー」とはプロモーター活性を刺激することができるＤＮＡ配列であり、プロモーターの生得的な要素、あるいは、プロモーターのレベルまたは組織特異性を高めるために挿入された異種要素であってもよい。プロモーターは、全体が未変性遺伝子由来であってもよいし、自然界に見られる異なるプロモーター由来の異なる要素からなるものであってもよいし、合成ＤＮＡセグメントを含むものでもよい。プロモーターが変われば、異なる組織または細胞型で、あるいは異なる発達段階にて、あるいは異なる環境条件に応答して遺伝子の発現を指示できることは、当業者であれば理解できよう。ほとんどの細胞型でほとんどの時期に遺伝子を発現させるプロモーターのことを一般に「構成的プロモーター」と呼ぶ。植物細胞において有用なさまざまなタイプの新たなプロモーターが絶え間なく発見されている。これについては、Ｏｋａｍ

ｕｒｏおよびＧｏｌｄｂｅｒｇ、（１９８９） Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｐｌａｎｔｓ １５：１～８２の編纂書籍に多数の例が見られる。また、ほとんどの場合、制御配列の正確な境界が完全に定義されていることはないため、いくつかのバリエーションのＤＮＡ断片が同一のプロモーター活性を持つことがある点も理解されたい。

【００５８】

「イントロン」とは、タンパク質配列の一部をコードしない遺伝子における介在配列である。つまり、このような配列はＲＮＡに転写はされるが、転写後に切除されて翻訳はなされない。また、この用語は切除後のＲＮＡ配列にも用いられる。「エキソン」とは、転写され、遺伝子由来の成熟したメッセンジャーＲＮＡで見出されるが、最終的な遺伝子産物をコードする配列の一部であるとは限らない遺伝子の配列の一部である。

【００５９】

「翻訳リーダー配列」とは、遺伝子のプロモーター配列とコード配列との間に位置するＤＮＡ配列を示す。翻訳リーダー配列は、翻訳開始配列上流の完全にプロセシングされたｍＲＮＡに存在する。翻訳リーダー配列は、ｍＲＮＡへの一次転写物のプロセシング、ｍＲＮＡの安定性または翻訳効率に影響する場合がある。翻訳リーダー配列の一例については説明がなされている（Ｔｕｒｎｅｒ，Ｒ．およびＦｏｓｔｅｒ，Ｇ．Ｄ．（１９９５） Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３：２２５）。

【００６０】

「３’非コード配列」とは、コード配列の下流に位置するＤＮＡ配列を示し、ポリアデニル化の認識配列や、ｍＲＮＡのプロセシングまたは遺伝子発現に影響することができる制御シグナルをコードする他の配列を含む。ポリアデニル化シグナルは、通常はｍＲＮＡ前駆体の３’末端へのポリアデニル酸トラクト（ｔｒａｃｔ）の付加に影響することが特徴である。異なる３’非コード配列の使用例が、Ｉｎｇｅｌｂｒｅｃｈｔら、（１９８９） Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １：６７１～６８０に記載されている。

【００６１】

「ＲＮＡ転写物」とは、ＤＮＡ配列のＲＮＡポリメラーゼ触媒転写によって得られる産物を示す。ＲＮＡ転写物がＤＮＡ配列の完全相補コピーである場合、これは一次転写物と呼ばれる。また、一次転写物の転写後プロセシングによって誘導されるＲＮＡ配列の場合もあるが、これは成熟ＲＮＡと呼ばれる。「メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）」とは、イントロンを持たず、細胞によってタンパク質に翻訳可能なＲＮＡを示す。「ｃＤＮＡ」とは、ｍＲＮＡ鋳型と相補的であり、この鋳型から酵素逆転写酵素を用いて合成されたＤＮＡを示す。ｃＤＮＡは、一本鎖であってもよいし、あるいはＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片を用いて二本鎖形態に変換したものであってもよい。「センス」ＲＮＡとは、ｍＲＮＡを含み、細胞内またはｉｎ ｖｉｔｒｏにてタンパク質に翻訳可能なＲＮＡ転写物を示す。「アンチセンスＲＮＡ」とは、標的となる一次転写物またはｍＲＮＡの全体または一部に対して相補的であり、標的遺伝子の発現をブロックするＲＮＡ転写物を示す（米国特許第５，１０７，０６５号）。アンチセンスＲＮＡの相補性は、特定の遺伝子転写物すなわち、５’非コード配列、３’非コード配列、イントロンまたはコード配列のどの部分でのものであってもよい。「機能的ＲＮＡ」とは、場合によっては翻訳されないが、それでも細胞プロセスに対する影響力を持つ、アンチセンスＲＮＡ、リボザイムＲＮＡまたは他のＲＮＡを示す。「相補体」および「逆相補体」という用語は、本願明細書ではｍＲＮＡ転写物に関して同義に用いられ、メッセージのアンチセンスＲＮＡを定義することを想定している。

【００６２】

「標的ｍＲＮＡ」という用語は、宿主における発現を減少させる対象となるｍＲＮＡを示す。

【００６３】

「内在性ＲＮＡ」という用語は、天然型であるか非天然型であるか、すなわち、組換え手段、突然変異誘発などによって導入したものであるか否かを問わず、本発明の組換え構築物を用いての形質転換前に宿主のゲノムに含まれる核酸配列によってコードされるＲＮＡ

を示す。
【００６４】
「非天然型の」という表現は、自然界で普通に見られるものとは一致しない人工の状態を意味する。
【００６５】
「作動的に結合された」という表現は、単一の核酸断片で核酸配列が一方の機能が他方によって調節されるような形で関連していることを示す。たとえば、プロモーターはコード配列の発現を調節できる場合にそのコード配列と作動的に結合されている（すなわち、コード配列がプロモーターの転写制御下にある）。コード配列については、センス方向またはアンチセンス方向で制御配列に作動的に結合させることができる。もうひとつの例として、本発明の相補的なＲＮＡ領域を、直接または間接的に、標的ｍＲＮＡの５’または標的ｍＲＮＡの３’に対して、あるいは標的ｍＲＮＡ内で作動的に結合させることができる。あるいは、第１の相補的な領域が標的ｍＲＮＡの５’でその相補体が３’である。
【００６６】
「発現」という用語は、本願明細書において使用する場合、機能的最終産物を生成することを示す。遺伝子の発現には、遺伝子の転写とｍＲＮＡの前駆体または成熟タンパク質への翻訳を伴う。「アンチセンス阻害」とは、標的タンパク質の発現を抑制できるアンチセンスＲＮＡ転写物を生成することを示す。「コサプレッション」とは、同一または実質的に類似の外来または内在性遺伝子の発現を抑制できるセンスＲＮＡ転写物を生成することを示す（米国特許第５，２３１，０２０号）。
【００６７】
「成熟」タンパク質とは、翻訳後処理されたポリペプチドすなわち、一次翻訳産物に存在するプレペプチドまたはプロペプチドが除去されたポリペプチドを示す。「前駆体」タンパク質とは、ｍＲＮＡの翻訳の一次産物すなわち、プレペプチドおよびプロペプチドが残っている一次産物を示す。プレペプチドおよびプロペプチドは細胞内局在シグナルであってもよいが、これに限定されるものではない。
【００６８】
「安定した形質転換」とは、核ゲノムと細胞小器官のゲノムの両方を含む宿主生物ゲノムに核酸断片を移行させ、遺伝的に安定した遺伝を行うことを示す。これとは対照的に、「一過的な形質転換」とは、宿主生物の核またはＤＮＡ含有細胞小器官に核酸断片を移行させ、統合または安定した遺伝のない遺伝子発現を行うことを示す。形質転換された核酸断片を含む宿主生物を「トランスジェニック」生物体と呼ぶ。コメ、トウモロコシおよび他の単子葉植物の細胞を形質転換するための好ましい方法は、粒子加速または「遺伝子銃」形質転換技術（Ｋｌｅｉｎら、（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄｏｎ）３２７：７０～７３；米国特許第４，９４５，０５０号）またはトランスジーンを含む適切なＴｉプラスミドを用いるアグロバクテリウムによる方法（Ｉｓｈｉｄａ Ｙ．ら、１９９６、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１４：７４５～７５０）を用いるものである。
【００６９】
本願明細書において使用する標準的な組換えＤＮＡおよび分子クローニング手法は従来技術において周知であり、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．、Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．およびＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、１９８９（以下、「Ｓａｍｂｒｏｏｋ」）に十分な説明がなされている。
【００７０】
「組換え」という用語は、組換えを行わなければ分離されている２つの配列セグメントを、たとえば化学合成や遺伝子エンジニアリング手法での単離した核酸セグメントの操作などによって人工的に組み合わせることを示す。
【００７１】
「ＰＣＲ」または「ポリメラーゼ連鎖反応」とは、特定のＤＮＡセグメントを大量に合成

するための手法であり、一連のサイクルの繰返しからなるものである（コネチカット州ノーウォークのＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｃｅｔｕｓ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）。一般に二本鎖ＤＮＡは熱で変性されるため、標的セグメントの３’境界と相補的な２つのプライマーを低温でアニーリングし、続いて中間の温度で伸長させる。この３つの連続した工程をまとめてサイクルと呼ぶ。

【００７２】

「組換え構築物」、「発現構築物」、「組換え発現構築物」という用語は、本願明細書では同義に用いられる。このような構築物は、それ自体がベクターであってもよいし、ベクターと併用されるものであってもよい。ベクターを用いる場合、どのベクターを選択するかは、当業者間で周知のように宿主植物を形質転換する際に用いる方法に左右される。たとえば、プラスミドベクターを用いることができる。当業者であれば、本発明の単離された核酸断片を含む宿主細胞をうまく形質転換し、選択し、増殖させるためにベクターに不可欠な遺伝的要素が分かるであろう。また、当業者であれば、独立した異なる形質転換イベントでは得られる発現のレベルやパターンが異なる（Ｊｏｎｅｓら、（１９８５）ＥＭＢＯ　Ｊ．４：２４１１～２４１８；Ｄｅ　Ａｌｍｅｉｄａら、（１９８９）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　２１８：７８～８６）ため、所望の発現レベルおよびパターンを示す系を得るには複数のイベントをスクリーニングしなければならないことも理解できよう。このようなスクリーニングは、ＤＮＡのサザン分析、ｍＲＮＡ発現のノーザン分析、タンパク質発現のウェスタン分析または表現型解析によって行うことができる。

【００７３】

植物におけるコサプレッション構築物については、センス方向で内在性ｍＲＮＡとの相同性を持つ核酸配列の過発現に注目して設計されたものがあるが、この構築物では過発現した配列との相同性があるＲＮＡがすべて減少する（Ｖａｕｃｈｅｒｅｔら（１９９８）Ｐｌａｎｔ Ｊ １６：６５１～６５９；Ｇｕｒａ（２０００）Ｎａｔｕｒｅ ４０４：８０４～８０８）。この現象の全体としての効率は低く、ＲＮＡ減少の度合いには大きなムラがある。最近の研究で、ｍＲＮＡコード配列全体またはその一部を相補的な配向で取り込む「ヘアピン」構造を用いて、発現されたＲＮＡの潜在的な「ステムーループ」構造を得ることについて説明がなされている（１９９９年１０月２１日公開の国際特許出願公開第ＷＯ９９／５３０５０号）。この方法では、回収されたトランスジェニック植物におけるコサプレッションの頻度が高くなる。もうひとつのバリエーションでは、植物のウイルス配列を用いて近位ｍＲＮＡコード配列の抑制または「サイレンシング」を指示することについて説明されている（１９９８年８月２０日公開の国際特許出願公開第ＷＯ９８／３６０８３号）。このような同時抑制現象はいずれも機械論的には解明されていないが、最近の遺伝的証拠からこの複雑な状況の謎が解かれつつある（Ｅｌｍａｙａｎら（１９９８）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １０：１７４７～１７５７）。

【００７４】

驚くべきことに、かつ予想外にも、好適な核酸配列およびその逆相補体を用いて、好適な核酸配列およびその逆相補体に近接した相同的な内在性ＲＮＡ（すなわち標的ＲＮＡ）の発現を改変できることが明らかになった。後述するように、好適な核酸配列およびその逆相補体は、宿主におけるどの内在性ＲＮＡとも無縁のものであってもよいし、宿主のゲノムの核酸配列によってコードされるものであってもよい。ただし、核酸配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないことを条件とする。

【００７５】

このように、本発明は、１回のプラスミド形質転換で単一または複数の遺伝子コサプレッションを達成するための極めて効率的かつ確固とした方法を提供するものである。詳細については後述するが、この構築物は、抑制の標的となるｍＲＮＡ（単数または複数）コード領域またはその断片と結合したプロモーターと、標的とは無縁の短い相補的な配列とで構成される。相補的な配列は、標的配列の両５’、両３’またはいずれかの側に配向させることができるものである。この相補的な配列は、約４０～５０ヌクレオチド長であると

好ましく、５０～１００ヌクレオチド長であるとさらに好ましく、１００～３００ヌクレオチド以上であると最も好ましい。相補的な配列は標的とは無縁であるが、他のどのような起源に由来するものであってもよい。これらの配列の好ましい実施形態としては、植物の配列、バクテリアの配列、動物の配列、ウイルスまたはファージの配列、あるいはどの生物体でも発生しないとされる完全に人工的すなわち非天然型の配列（下記の「ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳ」を参照のこと）があげられるが、これに限定されるものではない。いずれの配列も、実施例４で後述するような多数ある配列アライメントプログラムのうちのひとつを用いて他の既知の配列と比較または相互に比較することが可能である。

【００７６】

「高い頻度」という表現は、本願明細書において抑制効率に関して使用する場合、標的抑制表現型を呈する形質転換系の割合を示す。高い頻度の割合は少なくとも１５～９５％の範囲ならびにこの範囲に含まれる整数値での割合が想定される。好ましい実施形態として、少なくとも１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％があげられる。

【００７７】

本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、

（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、

（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）に近接した２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有し、

発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。

【００７８】

別の態様において、本発明は、宿主で発現させるとＲＮＡを生成するＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む組換え構築物であって、

（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、

（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、前記領域が（ａ）に近接していることを条件とする）と、を有し、

発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである、組換え構築物に関する。

【００７９】

本発明を実施するにあたっては、どのようなプロモーターでも使用することが可能である。たとえば、β－コングリシニンプロモーター、Ｋｕｎｉｔｚ型ダイズトリプシンインヒビター（ＫＳＴＩまたはＫｔｉ）プロモーター、Ｇｌｙ　ｍ　Ｂｄ２８Ｋプロモーター、Ｔ７プロモーター、３５Ｓプロモーターおよびβ－ファゼオリンプロモーターがあげられる。好ましいプロモーターはβ－コングリシニンのα’－サブユニットのプロモーターである（本願明細書ではβ－コングリシニンプロモーターと呼ぶ）。β－コングリシニンのα’－サブユニットのプロモーターでの組換え発現構築物を含む同時抑制された植物では、β－コングリシニンのαサブユニットとα’サブユニットの両方を抑制されることが多い（１９９７年１２月１８日公開の国際特許出願公開第ＷＯ９７／４７７３１号に記載されており、その開示内容全体を本願明細書に援用する）。特に好ましいプロモーターは種子特異的な発現が可能なプロモーターである。種子は一次ソース消費型タンパク質および油であり、種子特異的発現では非種子組織における潜在的な有害作用を一切排除できるため、これは特に有用な場合がある。

【００８０】

種子特異的プロモーターの一例としては、種子貯蔵タンパク質（多くの植物で種子タンパク質全体の最大９０％まで占めることがある）のプロモーターがあげられるが、これに限定されるものではない。種子貯蔵タンパク質は、厳密に制御され、種子において極めて組織特異的かつ段階特異的な形でほぼ独占的に発現される（Ｈｉｇｇｉｎｓら、（１９８４

）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．３５：１９１～２２１；Ｇｏｌｄｂｅｒｇら、（１９８９）Ｃｅｌｌ ５６：１４９～１６０）。さらに、種子の発達における段階が変わると異なる種子貯蔵タンパク質を発現させることができる。

【００８１】

種子特異的遺伝子の発現については、すでに詳細な検討がなされている（Ｇｏｌｄｂｅｒｇら、（１９８９）Ｃｅｌｌ ５６：１４９～１６０およびＨｉｇｇｉｎｓら、（１９８４）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．３５：１９１～２２１における概説を参照のこと）。現在、トランスジェニック双子葉植物における種子貯蔵タンパク質遺伝子の種子特異的発現には膨大な数の例がある。こうした例には、マメのβ－ファゼオリン（Ｓｅｎｇｕｐｔａ－Ｇｏｐａｌａｎら、（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：３３２０～３３２４；Ｈｏｆｆｍａｎら、（１９８８）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１１：７１７～７２９）、マメのレクチン（Ｖｏｅｌｋｅｒら、（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ． ６：３５７１～３５７７）、ダイズのレクチン（Ｏｋａｍｕｒｏら、（１９８６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：８２４０～８２４４）、ダイズのＫｕｎｉｔｚ型トリプシンインヒビター（Ｐｅｒｅｚ－Ｇｒａｕら、（１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １：０９５～１１０９）、ダイズのｂ－コングリシニン（Ｂｅａｃｈｙら、（１９８５）ＥＭＢＯ Ｊ． ４：３０４７～３０５３；マメのビシリン（Ｈｉｇｇｉｎｓら、（１９８８）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１１：６８３～６９５）、マメのコンビシリン（Ｎｅｗｂｉｇｉｎら、（１９９０）Ｐｌａｎｔａ １８０：４６１～４７０）、マメのレグミン（Ｓｈｉｒｓａｔら、（１９８９）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ２１５：３２６～３３１）；ナタネ種子のナピン（Ｒａｄｋｅら、（１９８８）Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．７５：６８５～６９４）など、双子葉植物から得られる遺伝子ならびに、トウモロコシの１５ｋＤのゼイン（Ｈｏｆｆｍａｎら、（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ． ６：３２１３～３２２１）、トウモロコシの１８ｋＤのオレオシン（Ｌｅｅら、（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：６１８１～６１８５）、オオムギのβ－ホルデイン（Ｍａｒｒｉｓら、（１９８８）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０：３５９～３６６）およびコムギのグルテニン（Ｃｏｌｏｔら、（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：３５５９～３５６４）などの単子葉植物から得られる遺伝子が含まれる。さらに、キメラ遺伝子構築物において異種コード配列に作動的に結合された種子特異的遺伝子のプロモーターもトランスジェニック植物でその時間的および空間的な発現パターンを維持する。このような例としては、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ ２Ｓの種子貯蔵タンパク質遺伝子プロモーターを用いてＡｒａｂｉｄｏｐｓｉｓおよびＢｒａｓｓｉｃａ ｎａｐｕｓの種子でエンケファリンペプチドを発現させること（Ｖａｎｄｅｋｅｒｃｋｈｏｖｅら、（１９８９）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７：９２９～９３２）、マメのレクチンおよびマメのβ－ファゼオリンプロモーターを用いてルシフェラーゼを発現させること（Ｒｉｇｇｓら、（１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉ． ６３：４７～５７）、さらにはコムギのグルテニンプロモーターを用いてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを発現させること（Ｃｏｌｏｔら、（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：３５５９～３５６４）などがあげられる。

【００８２】

上述したように、本発明を実施するにあたっては、構成的、組織特異的または誘導型プロモーターなど、どのようなタイプのプロモーターであっても使用することができる。構成的プロモーターの一例としては、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）３５Ｓ転写開始領域、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓのＴ－ＤＮＡ由来の１’－プロモーターまたは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脱水素酵素プロモーター（米国特許第５，６８３，４３９号）、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、さらには当業者間で周知のさまざまな植物遺伝子から得られる他の転写開始領域があげられる。

【００８３】
誘導型プロモーターの一例には、低酸素状態または低温ストレスによって誘導可能なＡｄｈ１プロモーター、熱ストレスによって誘導可能なＨｓｐ７０プロモーター、光によって誘導可能なＰＰＤＫプロモーターがある。また、他に有用なのが化学的に誘導可能なプロモーターである。
【００８４】
発達制御下にあるプロモーターの例としては、葉、根、果実、種子または花などの特定の組織で優先的に転写を開始するプロモーターがあげられる。一例としてのプロモーターに葯特異的プロモーター５１２６がある（米国特許第５，６８９，０４９号および同第５，６８９，０５１号）。上述したものに加えて、種子特異的プロモーターの他の例として、２７ｋＤのγゼインプロモーターおよびｗａｘｙプロモーター、Ｂｏｒｏｎａｔ，Ａ．、Ｍａｒｔｉｎｅｚ，Ｍ．Ｃ．、Ｒｅｉｎａ，Ｍ．、Ｐｕｉｇｄｏｍｅｎｅｃｈ，Ｐ．およびＰａｌａｕ，Ｊ．；Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ａｎｄ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｏｆ ａ ２８ ｋＤ ｇｌｕｔｅｌｉｎ－２ ｇｅｎｅ ｆｒｏｍ ｍａｉｚｅ： Ｃｏｍｍｏｎ ｅｌｅｍｅｎｔｓ ｉｎ ｔｈｅ ５’ ｆｌａｎｋｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎｓ ａｍｏｎｇ ｚｅｉｎ ａｎｄ ｇｌｕｔｅｌｉｎ ｇｅｎｅｓ；Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉ．４７、９５～１０２（１９８６）およびＲｅｉｎａ，Ｍ．、Ｐｏｎｔｅ，Ｉ．、Ｇｕｉｌｌｅｎ，Ｐ．、Ｂｏｒｏｎａｔ，Ａ．およびＰａｌａｕ，Ｊ．、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ａ ｇｅｎｏｍｉｃ ｃｌｏｎｅ ｅｎｃｏｄｉｎｇ ａ Ｚｃ２ ｐｒｏｔｅｉｎ ｆｒｏｍ Ｚｅａ ｍａｙｓ Ｗ６４ Ａ、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（２１）、６４２６（１９９０）があげられるが、これに限定されるものではない。ｗａｘｙプロモーターに関する以下のサイトを参照のこと。Ｋｌｏｅｓｇｅｎ，Ｒ．Ｂ．、Ｇｉｅｒｌ，Ａ．、Ｓｃｈｗａｒｚ－Ｓｏｍｍｅｒ，Ｚ．Ｓ．およびＳａｅｄｌｅｒ，Ｈ．、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ ｗａｘｙ ｌｏｃｕｓ ｏｆ Ｚｅａ ｍａｙｓ、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２０３、２３７～２４４（１９８６）。胚、果皮および胚乳で発現するプロモーターが、２０００年３月２日公開の国際出願第ＷＯ００／１１１７７号および２０００年３月９日公開の国際出願第ＷＯ００／１２７３３号に開示されている。それぞれの公報の開示内容全体を本願明細書に援用する。
【００８５】
本発明を実施するにあたっては、異種または非異種（すなわち内在性）のプロモーターのどちらを使用することもできる。
【００８６】
次に、当業者間で周知の従来の手段を用いて、宿主で発現させると特定の基準を満たすＲＮＡを生成するＤＮＡ配列にプロモーターを作動的に結合させる
【００８７】
宿主は、遺伝子発現を変える目的で本発明の組換え構築物を安定してまたは一過的に導入可能なものであれば、どのような生物体またはその細胞であってもよい。好適な宿主の一例として、植物、動物、原虫、バクテリア、ウイルスまたは真菌があげられるが、これに限定されるものではない。植物は、単子葉植物、双子葉植物または裸子植物であってもよい。動物は、脊椎動物であっても無脊椎動物であってもよい。好ましい微生物は農業または工業的に用いられている微生物である。真菌としては、カビと酵母の両方の形態の生物体を含む。
【００８８】
植物としては、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ；多栽培作物（アルファルファ、オオムギ、マメ、トウモロコシ、ワタ、アマ、エンドウマメ、ナタネ、コメ、ライムギ、ベニバナ、ソルガム、ダイズ、ヒマワリ、タバコ、コムギなど）；蔬菜類（アスパラガス、ビーツ、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、キュウリ、ナス、レタス、タマネギ、コショウ、ジャガイモ、ペポカボチャ、ダイコン、ホウレンソウ、カボチャ、タロイモ、トマト、ズッキーニなど）；果実および堅果（アーモンド、リンゴ、アンズ、バナ

ナ、クロイチゴ、ブルーベリー、カカオ、サクランボ、ココナツ、ツルコケモモ、ナツメヤシ、ｆａｊｏａ、ハシバミ、ブドウ、グレープフルーツ、グァバ、キウイ、レモン、ライム、マンゴー、メロン、ネクタリン、オレンジ、パパイヤ、パッションフルーツ、モモ、ラッカセイ、ナシ、パイナップル、ピスタチオ、プラム、ラズベリー、イチゴ、タンジェリン、ウォールナッツ、スイカなど）があげられる。

【００８９】

ヒトまたは非ヒト脊椎動物の例としては、哺乳動物、魚類、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、齧歯類、ハムスター、マウス、ラット、テンジクネズミ、ウサギ、霊長類があげられる。無脊椎動物としては、線虫、他の蠕虫、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ、他の昆虫があげられる。代表的な昆虫目としては、Ｃｏｌｅｏｐｔｅｒａ、Ｄｉｐｔｅｒａ、Ｌｅｐｉｄｏｐｔｅｒａ、Ｈｏｍｏｐｔｅｒａがあげられる。

【００９０】

宿主で発現されるＤＮＡ配列は、

（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、

（ｂ１）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、標的ｍＲＮＡに近接した２つの相補的なＲＮＡ領域であって、発現されると標的ＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるＲＮＡ、あるいは、

（ｂ２）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、前記領域が（ａ）に近接していることを条件とする）であって、発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものであるＲＮＡを生成する。

【００９１】

相補的なＲＮＡ領域は、以下のいずれかを含むものであってもよい。

（ａ）宿主のゲノムに通常は存在しないすなわち、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係な核酸配列または

（ｂ）相補的な領域をコードする宿主のゲノムの核酸配列（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないことを条件とする）。

【００９２】

（ａ）の宿主のゲノムに通常は存在しない核酸配列に鑑みると、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は、非天然型の合成ＲＮＡ配列を含むものであってもよい。さらに他の態様において、これらのＲＮＡ領域（単数または複数）は、任意に、植物ウイルスのＲＮＡを含むものであっても含まないものであってもよい。

【００９３】

（ｂ）の相補的な領域をコードする宿主のゲノムの核酸配列（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないことを条件とする）に鑑みると、この配列は、宿主のゲノムに存在してもよい転写核酸配列または非転写核酸配列を含む。すなわち、この配列は宿主で発現されるものであっても発現されないものであってもよい。

【００９４】

本願明細書において述べる相補的なＲＮＡ領域は、標的ｍＲＮＡに近接している。「近接して」という表現は、相補的な領域が標的ｍＲＮＡの５’または標的ｍＲＮＡの３’に作動的に結合されているか、標的ｍＲＮＡ内あるいは標的ｍＲＮＡの５’および３’内にある、すなわち、相補的な領域または配列を標的ｍＲＮＡのいずれかの端で見いだせることを意味する。

【００９５】

相補的なＲＮＡ領域は、標的ｍＲＮＡの発現を変化させるのに適していればどのようなサイズのものであってもよい。相補的な配列は、約４０～５０ヌクレオチド長であると好ましく、一層好ましくは５０～１００ヌクレオチド長であり、最も好ましくは１００～３０

０ヌクレオチドを上回る。これらの相補的な配列は、当業者間で周知の従来の方法を用いて合成することが可能なものである。

【００９６】

本発明を実施するにあたって利用できる適した相補的なＲＮＡ領域の一例としては、配列番号１２および１３、バクテリアの配列、刺胞動物の配列または人工配列または天然型の配列があげられるが、これに限定されるものではない。

【００９７】

もうひとつの実施形態において、本発明は、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法であって、

（ａ）本願明細書で述べる組換え構築物のうちいずれかを宿主に導入し、

（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含む方法に関する。

【００９８】

形質転換の方法については上述してあり、当業者間で周知である。

【００９９】

所望の表現型を持つ宿主に何を選択するかは、発現を変更しようとしている標的ｍＲＮＡ次第である。上述したように、標的ｍＲＮＡは、宿主における発現を変更したいｍＲＮＡであればどのようなものであってもよい。一般に、本発明の組換え構築物で形質転換した宿主から得られるＲＮＡとの間で相同性があるものとする。２つ以上の標的ｍＲＮＡが本発明の組換え構築物で形質転換した宿主から得られるＲＮＡとの間で相同性のあるものであれば、これらの標的ｍＲＮＡの発現を減少させることができる。

【０１００】

さらに他の実施形態において、本発明は、ＤＮＡ配列の代わりにＲＮＡを含む組換え構築物に関する。したがって、このＲＮＡは、

（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、

（ｂ）この宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であり、（ａ）に近接した２つの相補的なＲＮＡ領域と、を有するＲＮＡであって、

宿主に導入されると標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるものである。

【０１０１】

別の態様において、本発明は、ＤＮＡ配列の代わりにＲＮＡを含む組換え構築物であって、ＲＮＡが、

（ａ）宿主で発現される少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに対する相同性と、

（ｂ）この宿主のゲノムの核酸配列によってコードされる２つの相補的なＲＮＡ領域（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないものであり、前記領域が（ａ）に近接していることを条件とする）と、を有し、

発現されるＲＮＡが、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させる組換え構築物に関する。

【０１０２】

上述したように、相補的なＲＮＡ領域は、以下のいずれかを含むものであってもよい。

（ａ）宿主のゲノムに通常は存在しないすなわち、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係な核酸配列または

（ｂ）相補的な領域をコードする宿主のゲノムの核酸配列（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないことを条件とする）。

【０１０３】

（ａ）の宿主のゲノムに通常は存在しない核酸配列に鑑みると、宿主のいずれの内在性ＲＮＡとも無関係であるＲＮＡ領域（単数または複数）は、非天然型の合成ＲＮＡ配列を含むものであってもよい。さらに他の態様において、これらのＲＮＡ領域（単数または複数）は、任意に、植物ウイルスのＲＮＡを含むものであっても含まないものであってもよい。

【０１０４】
（ｂ）の相補的な領域をコードする宿主のゲノムの核酸配列（ただし、前記配列が標的ｍＲＮＡまたは標的ｍＲＮＡと実質的に類似の配列をコードしないことを条件とする）に鑑みると、この配列は、宿主のゲノムに存在してもよい転写核酸配列または非転写核酸配列を含む。
【０１０５】
本願明細書において述べる相補的なＲＮＡ領域は、標的ｍＲＮＡに近接している。「近接して」という表現は、相補的な領域が標的ｍＲＮＡの５’または標的ｍＲＮＡの３’に作動的に結合されているか、標的ｍＲＮＡ内あるいは標的ｍＲＮＡの５’および３’内にある、すなわち、相補的な領域または配列を標的ｍＲＮＡのいずれかの端で見いだせることを意味する。
【０１０６】
また、
（ａ）本願明細書で述べるＲＮＡのうちいずれかを宿主に導入し、
（ｂ）標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現が減少した宿主を選択することを含む、標的ｍＲＮＡまたは実質的に類似の内在性ｍＲＮＡの発現を減少させるための方法において、上記のＲＮＡを使用することができる。
【０１０７】
さらに他の態様では、本発明は、必須植物遺伝子を同定またはスクリーニングするための方法であって、
（ａ）構成的プロモーターを含み、必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる組換え構築物を用いて、植物細胞を形質転換し、
（ｂ）工程（ａ）で得られた形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｃ）必須植物遺伝子の発現を減少させない対照物から得られる形質転換後の植物細胞をすべて定量化し、
（ｄ）工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化と、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化とを比較することを含み、工程（ｃ）から選択される形質転換後の植物の細胞の定量化が工程（ｂ）から選択される形質転換後の植物細胞の定量化を実質的に超えるものである方法に関する。
【０１０８】
本発明の方法を使用して、どのような必須植物遺伝子でも同定またはスクリーニングすることが可能である。この方法の重要な態様のひとつに、構成的プロモーターと、必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる組換え構築物とを用いる点がある。
【０１０９】
必須植物遺伝子については上記にて定義したとおりである。
【０１１０】
構成的プロモーターは上記にて定義したとおりである。好ましくは、構成的プロモーターは、このプロモーターの制御下での遺伝子の発現によって高いレベルでｍＲＮＡが得られる、高レベルの構成的プロモーターまたは強い構成的プロモーターである。
【０１１１】
本発明を実施するにあたっては、必須植物遺伝子の発現を高い頻度で減少させることができる構成的プロモーターを含むどのような組換え構築物であっても使用することができる。好ましい実施形態では、組換え構築物は、プロモーターが構成的プロモーターであることを条件に、ＤＮＡ配列に作動的に結合されたプロモーターを含む本発明のいずれの組換え構築物であってもよい。高い頻度という表現については上記にて定義してある。
【０１１２】
上述したような標準的な形質転換方法を利用して、どのような植物細胞でも形質転換することができる。
【０１１３】
構成的プロモーターを含み、かつ、必須植物遺伝子の発現を減少させるように設計された

組換え構築物を用いて形質転換した植物細胞の数を定量化し、必須植物遺伝子の発現が減少しない対照物から得られる形質転換後の植物細胞の数と比較する。対照物で形質転換した植物細胞の数が、必須植物遺伝子の発現を減少させるように設計した組換え構築物で形質転換した植物細胞の数を実質的に上回る場合、必須植物遺伝子が同定／スクリーニングされたことになる。「実質的に上回る」とは、少なくとも５倍の差があり、好ましくは１０倍の差があることを意味する。また、４倍、６倍、７倍、８倍、９倍または１０倍よりもさらに差があると好ましい。このように、対照物で形質転換した植物細胞の数の方が、必須植物遺伝子の発現を減少させるように設計した組換え構築物で形質転換した植物細胞の数よりも少なくとも５倍多いものとする。

【０１１４】

実施例

以下の実施例において本発明についてさらに定義する。これらの実施例では、特に明記しない限り部およびパーセントはいずれも重量基準であり、度は摂氏である。これらの実施例は本発明の好ましい実施形態について示すものではあるが、例示目的にすぎない点に注意されたい。当業者であれば、上記の説明および以下の実施例から本発明の本質的な特徴を確認することができ、その趣旨および範囲を逸脱することなく、本発明にさまざまな変更および改変を施してさまざまな用途および条件に適合させることができる。なお、本願明細書において用いる参考文献に記載の開示内容を本願明細書に援用する。

【０１１５】

実施例１

ダイズ不定胚培養物の形質転換

ダイズ形質転換の安定した汎用プロトコール：

液体培地（ＳＢ５５またはＳＢＰ６）３５ｍｌ中、ロータリーシェーカーにて、１５０ｒｐｍ、２８℃で、蛍光と白熱光を昼１６時間／夜８時間のスケジュールで照射して、ダイズ胚形成懸濁培養液を維持する。組織約３５ｍｇを液体培地３５ｍｌに播種することによって、培養物を４週間ごとに継代培養する。

【０１１６】

【表１】

表１

ストック溶液(g/L)：

MS 硫酸塩 100×ストック

$MgSO_47H_2O$	37.0
$MnSO_4H_2O$	1.69
$ZnSO_47H_2O$	0.86
$CuSO_45H_2O$	0.0025

MS ハロゲン化物 100×ストック

$CaCl_22H_2O$	44.0
KI	0.083
$CoCl_26H_20$	0.00125
KH_2PO_4	17.0
H_3BO_3	0.62
$Na_2MoO_42H_2O$	0.025

MS FeEDTA100×ストック

Na_2EDTA	3.724
$FeSO_47H_2O$	2.784

B5 ビタミンストック

10g m-イノシトール
100mgニコチン酸
100mgピリドキシン HCl
1g チアミン

SB55（1 リットルあたり、pH5.7）

MS ストック各 10ml
B5 ビタミンストック 1ml
NH_4NO_3 0.8g
KNO_3 3.033ｇ
2,4-D(10mg/mL ストック）1ml
ショ糖 60g
0.667g アスパラギン

SBP6

2,4-D 0.5ml 以外は SB55 と同一

SB103（1 リットルあたり、pH5.7）

1×MS 塩
マルトース 6%
$MgCl_2$ 750mg
Gelrite 0.2%

SB71-1（1 リットルあたり、pH5.7）

1×B5 塩
B5 ビタミンストック 1ml
ショ糖 3%
$MgCl_2$ 750mg
Gelrite 0.2%

【０１１７】
粒子銃による方法（Ｋｌｅｉｎら （１９８７） Ｎａｔｕｒｅ ３２７：７０）を用いて、ダイズの胚形成懸濁培養物をｐＴＣ３で形質転換する。この形質転換には、デュポンのＢｉｏｌｉｓｔｉｃ ＰＤＳ１０００／ＨＥ機器（ヘリウム改造）を使用する。

【０１１８】
１μｍの金粒子の６０ｍｇ／ｍｌ懸濁液５０ｍｌに、ＤＮＡ５μｌ（１μｇ／μｌ）と、スペルミジン２０μｌ（０．１Ｍ）と、$CaCl_2$（２．５Ｍ）５０μｌとを（この順で）加える。この粒子調製物を３分間攪拌し、微量遠心管にて１０秒間スピンし、上清を取り除く。ＤＮＡがコーティングされた粒子を７０％エタノール４００μｌ中で１回洗浄し、無水エタノール４０μｌに再懸濁させる。このＤＮＡ／粒子懸濁液を１秒ずつ３回超音波処理する。次に、ＤＮＡをコーティングした金粒子５μｌを各マクロキャリアーディスクにのせる。選択の目的で、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（ＨＰＴ）に対する耐性を与えるプラスミドを、該当するサイレンシング構築物と一緒にボンバードしてもよい。

【０１１９】
４週間経過した懸濁培養物約３００～４００ｍｇを６０×１５ｍｍの空のペトリ皿に入れ、残っている液体をピペットで組織から取り除く。各形質転換実験について、約５～１０プレートの組織にボンバードを行うのが普通である。膜破壊圧を１０００ｐｓｉに設定し、チャンバを水銀２８インチの真空まで脱気する。保持用スクリーンから約３．５インチ離して組織を配置し、３回ボンバードする。このボンバードに続いて、組織を液体中に戻し、上述したようにして培養する。

【０１２０】
ボンバードの１１日後、ハイグロマイシン５０ｍｇ／ｍｌを含有する新鮮なＳＢ５５と液体培地を交換する。選択培地を毎週新しくする。ボンバードの７週間後、形質転換していない壊死胚形成培養物から緑色の形質転換組織が成長しているのが観察される。単離した緑色組織を取り出し、個々のフラスコに播種して、クローン的に増殖させた新たな形質転

換胚形成懸濁培養物を生成する。このように、新たな系をそれぞれ独立した形質転換イベントとして処理する。これらの懸濁液を未成熟の発達段階に保たれた胚の懸濁液として維持したり、あるいは個々の不定胚を成熟および発芽させることで植物全体に再生させることができる。

【０１２１】

形質転換胚形成培養物の独立した系を液体培養物から取り出し、ホルモンまたは抗生物質を含まない固体の寒天培地（ＳＢ１０３）にのせる。蛍光と白熱光を昼１６時間／夜８時間のスケジュールで照射して、胚を２６℃で４週間培養する。この期間中、個々の胚をクラスターから取り出し、脂肪酸組成の変化についてスクリーニングする（実施例３）。Ｆａｄ２のコサプレッションによって、多価不飽和脂肪酸が減少し、オレイン酸含量が増加する。

【０１２２】

標的遺伝子のコサプレッションによって生じる検出可能な表現型はどのようなものであってもこの段階でスクリーニング可能である点に注意されたい。この表現型には、タンパク質含量、炭水化物含量、生育速度、生存度または正常に発達してダイズ植物になる機能などの変化を含むがこれに限定されるものではない。

【０１２３】

実施例２

トウモロコシの形質転換

トウモロコシ形質転換の安定した汎用プロトコール

トウモロコシのＨｉ－ＩＩ株におけるプラスミドＤＮＡの形質転換を、標準的なＨｉ－ＩＩボンバードメント形質転換プロトコール（Ｓｏｎｇｓｔａｄ Ｄ．Ｄ．ら、（１９９６）Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．Ｐｌａｎｔ ３２：１７９～１８３）に従って行う。トウモロコシ未成熟胚（約１～１．５ｍｍ長）を培養することによって、Ｎ６塩と、Ｅｒｉｋｋｓｏｎビタミンと、プロリン０．６９ｇ／ｌと、２，４－Ｄ２ｍｇ／ｌと、ショ糖３％とを含有する５６０Ｐ培地で細胞を形質転換する。暗所にて２８℃で４～５日間インキュベーションした後、５６０Ｐ培地から胚を取り出し、ショ糖１２％を含有すること以外は５６０Ｐと同じである５６０Ｙ培地にて、胚盤を上にして培養する。この培地で胚を３時間順化させた後、形質転換を行う。ＵＢＩ：ｍｏＰＡＴ：ｐｉｎＩＩ＋ＵＢＩ：ＧＵＳ：ｐｉｎＩＩプラスミドを含有する混合物あるいは、この２種類のプラスミドに本発明のいずれかの構築物を組み合わせたものと粒子銃とを併用して、未成熟胚の胚盤表面を標的する（ＵＢＩは、ユビキチン－１プロモーターである。Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎら（１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏ １２：６１９～６３２。ｍｏＰＡＴは、１９９８年７月１６日公開の国際出願第ＷＯ９８／３０７０１号に引用されている除草剤グルホシネートアンモニウムに耐性を与える「単子葉植物最適化フォスフィノスリシンアシルトランスフェラーゼ」遺伝子を示す。ｐｉｎＩＩ（プロテイナーゼインヒビター）ターミネーターは、Ａｎら （１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １：１１５～１２２に記載されている。ＧＵＳ遺伝子（β－グルクロニダーゼ）については、Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎら （１９８６）ＰＮＡＳ ８３：８４４７～８４５１に記載されている）。Ｂｉｏ－Ｒａｄから入手可能なＰＤＳ－１０００ヘリウム銃を用いて、６５０ＰＳＩ破壊ディスクを使用して１試料あたり１ショットで胚を形質転換する。１ショットあたりのＤＮＡ量は平均で約０．１６６７ｕｇである。対照ＤＮＡ（ＰＡＴ／ＧＵＳ）または対照と本発明のいずれかの構築物との混合物のどちらかを用いて、１穂あたり同じ数の胚にボンバードを行う。ボンバード後、すべての胚を培養し、５６０Ｌ培地（Ｎ６塩、Ｅｒｉｋｓｓｏｎビタミン、チアミン０．５ｍｇ／ｌ、ショ糖２０ｇ／ｌ、２，４－Ｄ１ｍｇ／ｌ、プロリン２．８８ｇ／ｌ、ｇｅｌｒｉｔｅ２．０ｇ／ｌ、硝酸銀８．５ｍｇ／ｌ）で保持する。ボンバードの２～７日後、両方の処理試料の胚をすべて、プロリンを含有せず、ビアラホスを含有する３ｍｇ／ｌ）、上述したビアラホスＰｉｏｎｅｅｒ ５６０Ｐ培地３ｍｇ／ｌを含むＮ６ベースの培地に移す。プレートを暗所にて２８℃に維持し、２週間ごとに新鮮な培地を加えながらコロニーの回復具合を観察する。

【０１２４】
トウモロコシの一過的アッセイ：
２週間ごとに新鮮な５６０Ｐ培地に継代培養することによって、高ＩＩ型カルスの状態を維持する。健康なカルスを０．７７ｍｍ^{2}のナイロンメッシュに通し、２，４－Ｄ２ｍｇ／ｌを含むＭＳ培養液に培地４０ｍｌあたり組織３グラムの密度で再懸濁させる。この細胞懸濁液を、ピペットを用いて４ｍｌのアリコート（各々細胞約３００ｍｇを含む）をガラス濾紙に移し、真空装置でのボンバードを行うことができるようにする。次に、各濾紙を５６０Ｐ培地にのせ、暗所にて２６℃で培養する。２～４日後、濾紙を培養液から取り出し、真空装置を用いて余分な液体を除去する。次に、細胞の付着した濾紙を、すでに確立されている方法（上記の例を参照のこと）で、１μｍの金粒子と６５０ｐｓｉの破壊ディスクとを用いてショット（デュポンのＢｉｏｌｉｓｔｉｃｓ　ＰＤＳ１０００／Ｈｅ銃を使用）する。ボンバード直後、濾紙を５６０Ｐ培養液に戻し、暗所にて２６℃で培養する。すべてのＤＮＡを調節し、最終濃度を１μｇ／全ＤＮＡ／粒子調製チューブ（６ショット）とする。代表的な実験は以下のようなショットである。
【０１２５】
ＧＵＳ　ＤＮＡ＋対照ＤＮＡ＋ルシフェラーゼＤＮＡ
ＧＵＳ　ＤＮＡ＋サイレンシング構築物ＤＮＡ＋ルシフェラーゼＤＮＡ
【０１２６】
ボンバードの２日後、細胞をフィルタから掻き取り、タンパク質を抽出し、デュアルールシフェラーゼレポーターアッセイプロトコール（ウィスコンシン州マディソンのプロメガ社）に概説されているようなルシフェラーゼアッセイを用いて酵素活性を求める。同じ抽出物を用いて、ＲａｏおよびＦｌｙｎｎ　（１９９０）　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　８：３８～４０のプロトコールで蛍光定量的なＧＵＳアッセイを行う。以下の実施例８に示すデータをＧＵＳ／ルシフェラーゼ単位の比としてプロットする。
【０１２７】
実施例３
トランスジェニックダイズの不定胚の表現型では、得られる再生植物から種子表現型が推定される
ダイズの成熟不定胚は接合胚の良好なモデルである。液体培養物で球状胚の状態にある間、ダイズ不定胚には、成熟しているダイズ接合胚では典型的に認められるトリアシルグリセロールまたは貯蔵タンパク質が極めて少量しか含まれない。この発達段階では、全極性脂質（リン脂質および糖脂質）に対する全トリアシルグリセリドの比は、不定胚培養を開始した発達段階のダイズ接合胚では一般的なように約１：４である。球状の段階でも顕著な種子タンパク質であるβ－コングリシニンのα’サブユニット、ｋｕｎｉｔｚ型トリプシンインヒビター３および種子レクチンのｍＲＮＡは本質的に欠如している。成熟不定胚状態への分化を可能にするためにホルモンを含まない培地に移行する際、トリアシルグリセロールが最も豊富な脂質クラスになる。同様に、β－コングリシニンのα’－サブユニット、ｋｕｎｉｔｚ型トリプシンインヒビター３および種子レクチンのｍＲＮＡが、全ｍＲＮＡ個体群の中で極めて豊富なメッセージになる。この点では、ダイズ不定胚系はｉｎ　ｖｉｖｏにて成熟しているダイズ接合胚と極めて類似した挙動を示すため、脂肪酸生合成経路において遺伝子の発現を変える表現型の作用を分析するための良好かつ迅速なモデル系なのである。
【０１２８】
最も重要なのは、このモデル系がトランスジェニック胚由来の植物から種子の脂肪酸組成を予想できるものであるという点である。これについては、国際特許出願公開第ＷＯ９３／１１２４５号および同第ＷＯ９４／１１５１６号に記載のプロトコールに従って構築した２通りの実験における２種類のアンチセンス構築物を用いて実証する。すなわち、１９９３年６月１０日公開の国際特許出願公開第ＷＯ９３／１１２４５号（同公報の開示内容を本願明細書に援用する）に記載されているようなダイズミクロソームΔ^{15}不飽和化酵素を含むキメラ遺伝子（実験１）または１９９４年５月２６日公開の国際特許出願公開第

ＷＯ９４／１１５１６号（同公報の開示内容を本願明細書に援用する）に記載されているようなダイズミクロソームΔ^{12}不飽和化酵素（実験２）を用いて、液体培養物の球状胚を形質転換した。種子特異的プロモーター（β－コングリシニンプロモーター）の制御下で遺伝子構築物をアンチセンス方向にて導入し、成熟胚を発生させた。ベクターのみ（対照）を用いて形質転換した系と、アンチセンスキメラ遺伝子を持つベクターを用いて形質転換した系から得られる成熟不定胚の脂肪酸含量ならびに、この成熟不定胚から再生した植物の種子の脂肪酸含量を求めた。

【０１２９】

各系から得られる一組の胚の脂肪酸含量を分析し、この同じ系から得られる別の胚の組を植物に再生させた。メタノールH_2SO_4（２．５％）０．５ｍＬ中での個々の種子の直接的なエステル交換またはバルク（ｂｕｌｋ）種子試料をヘキサン抽出した後にナトリウムメトキシドの１％メタノール溶液０．８ｍＬのアリコートをエステル交換する方法によって、単一胚の脂肪酸の分析を行った。等量の水を加えた後、メタノール溶液からヘキサンに脂肪酸メチルエステルを抽出した。いずれの場合も、形質転換していない対照と比較してトランスジェニック胚系の１８：３量が減少した場合は、この形質転換株に由来する植物の分離している種子で１８：３量の対応する減少の様子も観察した（表２）。

【０１３０】

【表２】

表２

対照とΔ^{15}アンチセンス構築物

トランスジェニックダイズ系の胚および種子の 18:3 含有率

形質転換系	胚での平均 (SD、n=10)	種子での平均 (SD、n=10)
対照	12.1(2.6)	8.9(0.8)
Δ^{15}アンチセンス、系１	5.6(1.2)	4.3(1.6)
Δ^{15}アンチセンス、系２	8.9(2.2)	2.5(1.8)
Δ^{15}アンチセンス、系３	7.3(1.1)	4.9(1.9)
Δ^{15}アンチセンス、系４	7.0(1.9)	2.4(1.7)
Δ^{15}アンチセンス、系５	8.5(1.9)	4.5(2.2)
Δ^{15}アンチセンス、系６	7.6(1.6)	4.6(1.6)

*［野生型の表現型で分離し、トランスジーンのコピーを含まない分離している種子はこの平均には含まれない］

【０１３１】

また、同じアンチセンス構築物を含む異なる系を、不定胚での脂肪酸の分析と植物への再生に使用した。対照系と比較した場合に、形質転換胚系の約５５％で１８：１含量の増加が認められた（表３）。同一のアンチセンス構築物を含む異なる不定胚系から再生させた植物のダイズ種子は、不定胚としてオレイン酸塩の含量が多い形質転換体と同様の頻度（５３％）であった（表３）。時折、胚系がキメラになることがある。すなわち、ある系の胚の１０～７０％にトランスジーンが含まれない場合がある。トランスジーンを含む残りの胚は、いずれの場合もクローンとして認められている。このような場合、この系から分析した胚の大半がトランスジェニック表現型を持つものであったとしても、野生型とトランスジェニック表現型の両方を持つ植物を単一のトランスジェニック系から再生することができる。この一例を表４に示す。表中、単一胚系から再生させた５つの植物のうち、３つで高オレイン酸の表現型が得られ、２つは野生型であった。ほとんどの場合、単一のトランスジェニック系から再生させた植物はいずれも、トランスジーンを含む種子を持つことになる。したがって、トランスジェニックの成熟不定胚系で観察された脂肪酸表現型の変化で、この系に由来する植物の種子の脂肪酸組成の変化が推測できるという結論が得られた。

【０１３２】
【表３】

表３

Δ^{12}不飽和化酵素アンチセンス構築物を用いて形質転換した再生ダイズまたは
これを使用せずに形質転換した再生ダイズ種子と不定胚におけるオレイン酸塩レベル

	ベクター系の数	18:1 の高い系の数	平均 18:1(%)*
不定胚：			
対照	19	0	12.0
Δ^{12}アンチセンス	20	11	35.3
再生植物の種子：			
対照	6	0	18.2
Δ^{12}アンチセンス	17	9	44.4

*トランスジェニックの平均 18:1 は、この系から得られる少なくとも１つの胚または種子の 18:1 含量が対照値（胚で１2.0、種子で 18.2）の２標準偏差を上回るΔ^{12}アンチセンス構築物を用いて形質転換したすべての種子または胚の平均である。対照の平均は、トランスジェニック DNA を含まないがトランスジェニックと同じ方法で処理した胚または種子の平均である。

【０１３３】
【表４】

表４

植物系４から分離している５つの独立した植物から得られる種子の分析

植物番号	平均種子 18:1 (%)	最大種子 18:1 (%)
1	18.0	26.3
2	33.6	72.1
7	13.6	21.2
9	32.9	57.3
11	24.5	41.7

【０１３４】
単一胚系から再生させた５種類の植物から得た１５～２０の種子の平均。植物番号２、９および１１のみ１８：１表現型の高い種子がある。
【０１３５】
実施例４
核酸配列の分析
ＢＬＡＳＴ「ｎｒ」データベース（ＧｅｎＢａｎｋ ＣＤＳ翻訳物、３次元構造Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎタンパク質データバンクから得られる配列、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴタンパク質配列データベースの最新のメジャーリリース、ＥＭＢＬ、ＤＤＢＪデータベースのデータを冗長性を排除して含む）にある配列との類似性についてＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ；Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９３） Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０；ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／を参照）サーチを実施して、標的領域または相補的な領域を含む核酸配列を分析する。Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）が提供しているＢＬＡＳＴＮのアルゴリズムを用いて、「ｎｒ」データベースに含まれる一般利用可能なすべてのＤＮＡ配列との類似性について核の配列を分析する。また、すべての読み枠でＤＮＡ配列を翻訳し、ＮＣＢＩが提供しているＢＬＡＳＴＸアルゴリズム（ＧｉｓｈおよびＳｔａｔｅｓ（１９９３） Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．３：２６６～２７２）を用いて「ｎｒ」データベースに含まれる一般利用可能なすべてのタンパク質配列と類似性の比較を行うことも可能である。便宜上、ＢＬＡＳＴで計算した際にサーチしたデータベースに含まれる配列と単なる偶然でマッチしたＤＮＡ配列のマッチのＰ値（確率）を本願明細書では「ｐＬｏｇ」値とする。この値は、得られたＰ値の対数を負にしたものを表す。したがって、ｐＬｏｇ値が

大きくなればなるほど、ｃＤＮＡ配列とＢＬＡＳＴの「ヒット」が相同的なタンパク質を表す尤度が高くなる。

【０１３６】

実施例５

アンチセンスｖｓ．「伝統的な」コサプレッションｖｓ．「相補的な領域」のコサプレッションを用いた、Ｆａｄ２発現減少量の比較

以下、ダイズ脂肪酸不飽和化酵素（Ｆａｄ）を用いる同様の実験において、アンチセンス、「伝統的な」コサプレッションおよび「相補的な領域」のコサプレッション（ＣＲＣ）をいくつか比較する。Ｆａｄ２－１は、オレイン酸側鎖に二重結合を導入して多価不飽和脂肪酸を形成する、ダイズから得られるΔ－１２不飽和化酵素をコードする遺伝子座である。Ｆａｄ２－１発現量が減少することでオレイン酸が蓄積（１８：１または単一の二重結合がある１８炭素脂肪酸テイル）され、これに対応して多価不飽和脂肪酸の含量が減少する。

【０１３７】

アンチセンス構築物には、強力なプロモーターの後ろに逆方向でＦａｄ２－１コード領域全体またはその一部が含まれる。「アンチセンス」ＲＮＡの発現はハイブリダイゼーションイベントによる相同的な内在性遺伝子の正常な翻訳を妨げるものであると思われる。「伝統的な」コサプレッション構築物は、強力なプロモーターの後ろに通常のセンス方向でＦａｄ２－１全体またはその一部を含む。「同時抑制されている」ＲＮＡが発現されることで、導入したＲＮＡならびに実質的に類似の配列を有するすべてのＲＮＡの一部または全部の排除につながる、特徴化がなされていない機序が活性化されるものと思われる。使用したＣＲＣ構築物は、逆相補体方向で複製されたＦａｄ２－１コード領域の一部（３００ｂｐ）を含むものであり、Ｆａｄ２－１に特異な相補的な領域が形成されている。

【０１３８】

これらの実験で用いたプラスミドは、当業者間で周知の標準的なクローニング方法（Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、ＣＳＨＬ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）で作製したものである。開始プラスミドのｐＫＳ１８ＨＨ（米国特許第５，８４６，７８４号、その内容を本願明細書に援用する）には、Ｔ７プロモーターおよび３５Ｓカリフラワーモザイクウイルスプロモーターの制御下でＥ．ｃｏｌｉ株Ｗ６７７から得られたハイグロマイシンＢホスホトランスフェラーゼ（ＨＰＴ）が含まれる。したがって、プラスミドｐＫＳ１８ＨＨは、λ ＤＥ３（ｌａｃＶ５制御下でＴ７ ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子を持つ）に対して溶原性であるＮｏｖａＢｌｕｅ（ＤＥ３）［ノバジェンより］などのＥ． ｃｏｌｉの特定の株でＨＰＴ酵素を発現させるＴ７プロモーター／ＨＰＴ／Ｔ７ターミネーターカセットを含むことになる。また、プラスミドｐＫＳ１８ＨＨは、ダイズなどの植物でＨＰＴ酵素を構成的に発現させる３５Ｓ／ＨＰＴ／ＮＯＳカセットも含む。これらの２つの発現系を用いることで、バクテリアと植物の両方の系でプラスミドを含む細胞を同定する手段として用いられるハイグロマイシンの存在下で成長を選択することが可能になる。また、ｐＫＳ１８ＨＨは、他のキメラ遺伝子をこのベクターにクローニングするのに適した３つの独特な制限エンドヌクレアーゼ部位を含む。プラスミドＺＢＬ１００（２０００年３月２日公開の国際出願第ＷＯ００／１１１７６号）は、ＮＯＳ ３’ターミネーターが減少したｐＫＳ１８ＨＨの誘導体のひとつである。プラスミドｐＫＳ６７は、ＮｏｔＩクローニング部位の前にβ－コングリシニンプロモーターが挿入され、これにファゼオリン３’ターミネーターが続いたＺＢＬ１００誘導体である（１９９４年５月２６日公開の国際出願第ＷＯ９４／１１５１６号に記載されている）。ＰＫＳ９１は、Ｎｏｔ Ｉ部位に挿入されたダイズＦａｄ２遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）ヘアピン断片を持つｐＫＳ６７の誘導体である。ダイズＦａｄ２－１ＤＮＡを用いてのＰＣＲ反応に以下のようなプライマーを使用した（配列はいずれも５’から３’である）。

【０１３９】

【表５】

PCR(A)

GAATTCGCGGCCGCATGGGAGGTAGAGGTC　配列番号１

GGAAAACCATGCAACCCATTGGTACTTGCT　配列番号２

PCR(B)

AGCAAGTACCAATGGGTTGCATGGTTTTCC　配列番号３

AGCAAGTACCAATGGATACTTGTTCCTGTA　配列番号４

PCR(A/AS)

TACAGGAACAAGTATCCATTGGTACTTGCT　配列番号５

GAATTCGCGGCCGCATGGGAGGTAGAGGTC　配列番号６

【０１４０】

３通りの反応の産物（Ａ）＋（Ｂ）＋（Ａ／ＡＳ）を一緒にライゲートし、制限酵素Ｎｏｔ　Ｉで消化し、ＫＳ６７のＮｏｔ　Ｉ部位に１．３ｋｂの断片をクローニングする。このセクションに示す実験ではプラスミドｐＫＳ９１を使用した。２．５ｋｂのプラスミドｐＫＳ１７には、ｐＳＰ７２（プロメガバイオシステムズから入手）およびＴ７プロモーター／ＨＰＴ／Ｔ７　３’ターミネーター領域が含まれており、３５Ｓ／ＨＰＴ／ＮＯＳカセットを含む３．２ｋｂのＢａｍＨＩ－ＳａｌＩ断片をｐＫＳ１８ＨＨからクローニングしたオリジナルのベクターである。プラスミドｐＫＳ１０２は、ＸｈｏＩおよびＳａｌＩで消化し、リョクトウヌクレアーゼで処理して平滑末端を生成し、以下のリンカーにライゲートするために挿入したｐＫＳ１７誘導体である。

【０１４１】

【表６】

GGCGCGCCAAGCTTGGATCCGTCGACGGCGCGCC　配列番号７

【０１４２】

プラスミドｐＫＳ８３は、ｐＫＳ１７のＢａｍＨＩ部位にライゲートしたＫｔｉ３プロモーター／ＮｏｔＩ／Ｋｔｉ３　３’ターミネーター領域を含むＭＬ７０の２．３ｋｂのＢａｍＨＩ断片である（１９９４年５月２６日公開の国際出願第ＷＯ９４／１１５１６号に記載されている）。プラスミドｐＫＳ１０３は、ＮｏｔＩ部位にライゲートした（Ｆａｄ２相補的な配列を含む）ｐＫＳ９１の１．３ｋｂのＮｏｔＩ断片を持つｐＫＳ８３の誘導体である。

【０１４３】

さらに多数のコサプレッション構築物を比較するために、これに見合うだけの数のアンチセンス系を持つには、Ｆａｄ　６をＦａｄ　２－１と同時ボンバードするアンチセンス実験を含めることが必要であった。Ｆａｄ６は、（Ｆａｄ２がミクロソーム分画に見られるのに対して）色素体に見られるΔ－１２不飽和化酵素をコードする遺伝子である。Ｆａｄ２とＦａｄ６とを同時に抑制すると、Ｆａｄ２の抑制だけの場合よりも強力であったり、あるいは異なる表現型が得られると考えられていた。しかしながら、その後Ｆａｄ６は表現型を生じないことが明らかになったため、Ｆａｄ２およびＦａｄ６の両方を用いてのアンチセンス実験で得られる表現型はＦａｄ２－１含量の変化を反映するのみである。

【０１４４】

対照胚（個体数２８６）の平均１８：１含量は標準偏差（ＳＤ）６．２％で９％（実範囲４～２２％）であった。このため、１８：１が平均から２ＳＤを上回り、観察された最大対照値よりも高い値まで増加するＦａｄ２－１の減少陽性を表すのにオレイン酸含量２５％を選択した。１８：１含量が２５％以上の胚が系に少なくとも１つある場合、これをア

ンチセンスまたはコサプレッションイベントとして計数する。２回の実験を組み合わせ、約３０の系を生成した。

【０１４５】

【表７】

表５

Fad2-1発現が減少した陽性形質転換系

	アンチセンス	コサプレッション	CRC
18:1含量が>25%のFad2-1系	31のうち9	28のうち9	33のうち31
合計(%)	29%	32%	94%

【０１４６】

アンチセンスまたはコサプレッションによって発現が減少したトランスジェニック植物を分析する際に考慮すべきもうひとつの点にキメラ化がある。上記のアンチセンスおよびコサプレッションの実験では、検出された陽性のイベント系にはオレイン酸含量が増加した１０のうち１つの胚しか含まれないことがあった。これらの実験ではいずれも分析１リットルあたり１０胚を用いているため、オレイン酸含量（Δ－１２発現が減少した形質転換体を示す目安となり得る２５％を上回るまたはこれ未満）に対して実際の胚数をプロットすることで、キメラ化データをグラフで表すことが可能である。したがって、系のキメラ化がほとんどないか全くない場合、その胚ではいずれも野生型とは対照的に表現型が抑制されることになる。ＣＲＣ（灰色の四角）形質転換体ではキメライベントが少なめでも一貫してオレイン酸含量が高いというデータは、極めて説得力があるように思われる。

【０１４７】

もうひとつの問題に、系の発現表現型を減少させる効率がある。ここに開示の実験および実施例６の結果から、胚で極めて高い１８：１含量を得るには、アンチセンスまたは「伝統的な」コサプレッションのいずれか（すなわちコサプレッション、ＣＲＣを含む相補的な領域との対比）の場合よりも、標的配列に近接して相補的な領域を含む構築物の方が効果的であった。実験で得られた抑制レベルは、これに対応して植物に含まれるオレイン酸含量が増加する形に反映される。平均１８：１含量が高くなればなるほど、抑制の度合いが大きくなる。この構築物を含む相補的な領域ではオレイン酸含量が５０％であったが、これは対照平均を５ＳＤより上回っている。

【０１４８】

【表８】

表６

Fad2-1発現の減少効率が高い陽性の形質転換系

	アンチセンス	コサプレッション	CRC
18:1含量が>50%のFad2-1系	31のうち1	28のうち3	33のうち29
合計(%)	3%	11%	88%

【０１４９】

Ｆａｄ２－１含量を減らして胚で１８：１含量を高くするにはＣＲＣが最も効率がよく効果的な方法であるように思われる。実施例３から明らかなように、トランスジェニック植物での胚のオレイン酸含量と種子のオレイン酸含量との間には表現型相関がある。このため、５１％を超える胚系を得る実験が最も望ましい。このような実験ではオレイン酸が８０％を超える種子を確実に得られるように思われるためである。

【０１５０】

検出した中で最も陽性の種子系はオレイン酸８０％に近い（またはこれよりも多い）ことに注意されたい。そうではなかった少数のものは、オレイン酸の最大含量が３０％から５０％の範囲の胚系由来であるように思われる。現在まで、胚の最大オレイン酸含量が３０

％で表現型が陽性の系から最良の種子表現型が得られたことはなく、常にオレイン酸含量が５１％以上の産生系で最良の種子表現型が得られる。また、生成した中で上位５つの胚系（いずれもオレイン酸５０％を上回る）では種子において最良の表現型が得られ（８０％を超える）、最下位４つの胚系（いずれも胚のオレイン酸５０％未満）ではいずれも種子のオレイン酸含量が８０％未満であった。

【０１５１】

実施例６

標的配列および相補的な配列はいずれもその内在性相同体を同時抑制することが可能である

相補的な領域をコサプレッション構築物の標的領域に含めると、得られる形質転換体の効率および均一性が改善される（実施例５）。次のステップは、この方法で２つ以上の遺伝子を抑制することができた場合に試験を行うことである。ダイズのチオエステラーゼ遺伝子から得られる６００ヌクレオチドの標的を囲む、Ｆａｄ２－１から得られる３００ヌクレオチドの相補的な領域を用いた予備段階での結果では両方の遺伝子が抑制される。この結果は、ふたつの理由から興味深いものであった。まず第１に、実施例５の構築物とは異なり、Ｆａｄ２から得られる相補的な領域がチオエステラーゼ配列で中断された。第２に、発現のＦａｄ２減少が起こった系ではいずれも非相補的な標的配列（チオエステラーゼ）が阻害されたことから、標的と相補的な領域での発現の減少効率は等しかったのではないかと思われる。

【０１５２】

いずれかの相補的な領域を用いていずれかの標的配列の発現を効率よく抑えることができるか否かをさらに試験するために、ダイズのロウ質変異３（ｃｅｒ３）座から得られる相補的な領域と併用してＦａｄ２－１を標的として用いて構築物を作製した。ｃｅｒ３は、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａでのロウの生合成に関与することが知られている２１の遺伝子産物のうちひとつをコードする（Ｈａｎｎｏｕｆａら　（１９９６）Ｐｌａｎｔ　Ｊ　１０：４５９～６７）。ｃｅｒ３遺伝子が１つ阻害されてもダイズで目に見える表現型は起こらない。また、Ｆａｄ２活性を含む脂肪酸代謝経路との間での相互作用が知られていない生合成経路にｃｅｒ３は関与している。プラスミドｐＫＳ１００は、ｐＫＳ６７の誘導体である。以下のプライマー（５’から３’方向）およびｃｅｒ３ＤＮＡを用いてＰＣＲ反応を実施する。

【０１５３】

【表９】

PCR(A+B)

GAATTCGCGGCCGCGGCACGAGATTTGAGG	配列番号 8
TTGCCCAATGTTTATGCATATGTAGAACTG	配列番号 9

PCR(A/AS)

CAGTTCTACATATGCATAAACATTGGGCAA	配列番号 10
GAATTCGCGGCCGCGGCACGAGATTTGAGG	配列番号 11

【０１５４】

２つの反応の産物を一緒にライゲートし、ＮｏｔＩで消化し、ｐＫＳ６７のＮｏｔＩ部位にクローニングする。次に、ダイズＦａｄ２－１から得た５１６ｂｐのＳｃａＩ断片を、（Ｃｅｒ３　ＤＮＡ内で、相補的な配列からほんの一部を取り除いて）ＦｓｐＩで消化したｐＫＳ１００にライゲートし、ｐＢＳ５８を形成する。制限酵素での消化を利用して、センスまたはアンチセンス方向にＦａｄ２断片を含むプラスミドを選択した。ダイズで試験した全ての構築物においてＦａｄ２の発現が効率的に減少すると思われる。

【０１５５】

実施例７
ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳに相補的な領域によるＦａｄ２のダイズにおける抑制
「合成の相補的な領域」（ＳＣＲ）を持つ構築物を作製した。Ｆａｄ　２　ＣＲ／ＴＥ２標的は検討した系ひとつに含まれる両方の内在性遺伝子を抑制し、Ｃｅｒ３／Ｆａｄ２構築物はＦａｄ２を抑制するため、どの相補的な配列を使っても標的の発現を減少させることができるのではないかと推定された。この例では、生物学的に誘導した遺伝子またはゲノムの一部であることが分かっていない相補的な配列（すなわち、本願発明者の心から「合成」または呼び起こした配列）の間に標的配列を配置する。したがって、標的ＤＮＡはセンスまたはアンチセンス方向であり、相補的なＲＮＡは既知の核酸配列のいずれとも無関係であろう。抑制用の標的遺伝子の切片を放り込むことが可能な標準的な「抑制ベクター」を設計することが可能である。プラスミドｐＫＳ１０６、ｐＫＳ１２４およびｐＫＳ１３３がこの一例である。プラスミドベクターはいずれも、Ｔ７誘導型プロモーターなどのプロモーターを持つハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼなどの抗生物質選択遺伝子を持つことは、当業者であれば理解できよう。

【０１５６】
ｐＫＳ１０６はβ－コングリシニンプロモーターを利用し、かたやｐＫＳ１２４および１３３プラスミドはＫｔｉプロモーターを利用する。これらのプロモーターはいずれも、ダイズの種子で強い組織特異的発現を示す。ｐＫＳ１０６はファゼオリン遺伝子からの３’終結領域を利用し、ｐＫＳ１２４および１３３はＫｔｉ　３’終結領域を利用する。ｐＫＳ１０６および１２４は、ＮｏｔＩ部位を囲む３６ヌクレオチドのＥａｇＩ－ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳ配列のシングルコピーを含む（カッコで示すアミノ酸は相補鎖から逆翻訳される）：配列番号１２。

【０１５７】
【表１０】

EagI E L V I S L I V E S NotI

CGGCCG GAG CTG GTC ATC TCG CTC ATC GTC GAG TCG

GCGGCCGC

(S) (E) (V) (I) (L) (S) (I) (V) (L) (E) EagI

CGA CTC GAC GAT GAG CGA GAT GAC CAG CTC CGGCCG

【０１５８】
ｐＫＳ１３３はＮｏｔＩ部位を囲むＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳの２×コピーを含む：配列番号１３。

【０１５９】
【表１１】

EagI E L V I S L I V E S NotI

CGGCCG GAG CTG GTC ATC TCG CTC ATC GTC GAG TCG GCGGCCGC

(S) (E) (V) (I) (L) (S) (I) (V) (L) (E) EagI

CGA CTC GAC GAT GAG CGA GAT GAC CAG CTC CGGCCG

EagI E L V I S L I V E S EagI E L V I S

cggccggagctggtcatctcgctcatcgtcgagtcg gcggccg gagctggtcatctcg

L I V E S NotI (S)(E (V)(I)(L)(S)(I)(V)(L)(E) EagI

ctcatcgtcgagtcg gcggccgc cgactcgacgatgagcgagatgaccagctc cggccgc

(S)(E)(V)(I)(L)(S)(I)(V)(L)(E) EagI

cgactcgacgatgagcgagatgaccagctc cggccg

【０１６０】

シングルＥＬリンカー（ＳＣＲ）を複製して約４０ヌクレオチドずつステムを長くすることが可能であるということである。一連のベクターでＳＣＲ長４０ｂｐから３００ｂｐまでがカバーされる。また、さまざまな標的遺伝子長が評価段階にある。標的の長さと相補的な領域の長さとを特定の組み合わせにすると、標的の抑制が最適化されると思われるが、予備段階での結果では、抑制現象はさまざまな範囲のサイズおよび配列で十分に機能することが明らかになっている。また、最適な状態で抑制するための長さと比によっては、いくらか定められた異なる標的配列および／または相補的な領域が変わることがあると思われる。

【０１６１】

プラスミドｐＫＳ１０６は、ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳのＥａｇＩ断片（配列番号１２）をｐＫＳ６７のＮｏｔＩ部位に置くことで作製される。ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳ断片は、２つのプライマーを使用し、他にはＤＮＡを用いることなく、ＰＣＲによって作製される。

【０１６２】

【表１２】

5'-GAATTCCGGCCGGAGCTGGTCATCTCGCTCATCGTCGAGTCGGCGG

CCGCCGACTCGACGATGAGCGAGATGACCAGCTCCGGCCGGAATTC-3' 配列番号 14

5'-GAATTCCGGCCGGAG-3' 配列番号 15

【０１６３】

【表１３】

GAATTCGCGGCCGCTGAGTGATTGCTCACGAGT 配列番号 16

GAATTCGCGGCCGCTTAATCTCTGTCCATAGTT 配列番号 17

ＰＣＲ反応の産物をＥａｇＩで消化（５’－ＣＧＧＣＣＧ－３’）した後、ＮｏｔＩ消化ｐＫＳ６７にライゲートする。Δ－１２不飽和化酵素遺伝子（Ｆａｄ２、ヌクレオチド３９９～９９７）から得られる５９９ヌクレオチドの断片を、アンチセンス方向でｐＫＳ１０６のＮｏｔＩ部位に挿入することによって、ｐＫＳ１１１を作製する。Ｆａｄ２断片は、以下のプライマーおよびＦａｄ２　ＤＮＡを鋳型として用いてＰＣＲで作製される。

【０１６４】

GAATTCGCGGCCGCTGAGTGATTGCTCACGAGT　配列番号１６
GAATTCGCGGCCGCTTAATCTCTGTCCATAGTT　配列番号１７

【０１６５】
このＰＣＲ産物をＮｏｔＩで消化（５’－ＧＣＧＧＣＣＧＣ－３’）した後、ＮｏｔＩ消化ｐＫＳ１０６にライゲートする。相補的な配列の全長は４７ヌクレオチド（８ヌクレオチドがＮｏｔＩ部位から、フランキング塩基がさらに３つ）である。Ｆａｄ２を同時抑制すると、多価不飽和脂肪酸の産生量が低下し、これに伴ってオレイン酸（１８：１）のダイズへの蓄積量が増える。（上記実施例３を参照のこと）。ｐＫＳ１１１で形質転換した２２の系のうち１８の系でのオレイン酸濃度は、ベクターのみの対照と比して２～５倍であったことから、回復したトランスジェニック植物の８２％でコサプレッションが生じていることが分かる。Ｆａｄ２の短いセグメント（６００ｂｐ）を囲むシングルＳＣＲ（ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳまたはＥＬ）を配置するだけで、実施例５のＣＲＣ構築物を用いて得られる効率と等しい効率でコサプレッションを与えるには十分であるようにみえる。「ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳ」および「ＥＬ」という用語は、本願明細書では同義に用いられる。

【０１６６】
さらに別のプラスミドを用いて、この例を試験することが可能である。たとえば、ｐＫＳ１２１は、ＢａｍＨＩ－ＳａｌＩ消化ｐＫＳ１０２に挿入されたｐＫＳ８３に類似のＫｔｉ３プロモーター／ＮｏｔＩ／Ｋｔｉ３の３’ターミネーター断片類似物を含有する。配列番号１４および１５から得られるＥａｇＩ消化ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳクローニング部位をｐＫＳ１２１のＮｏｔＩ部位に挿入し、ｐＫＳ１２４を作製する。ｐＫＳ１１１から得られるＦａｄ２断片をＮｏｔＩ消化ｐＫＳ１２４にライゲートし、ｐＫＳ１３２を作製する。ＥａｇＩ消化ＥＬ　ＰＣＲ産物をＮｏｔＩ消化ｐＫＳ１２４にライゲートし、２×ＥＬ　ｐＫＳ１３３を作製することができる。さらに別の２×ＥＬベクターであるｐＫＳ１５１は、３５Ｓ－ＣａＭＶプロモーターのある第２のハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子が付加されていること以外はｐＫＳ１３３と類似している。同様の方法で、どのような合成配列または天然型配列を使用してもよい。ｐＫＳ１１１から得られる５９９ｂｐのダイズＦａｄ２断片をＮｏｔＩ消化ｐＫＳ１３３に付加すると、ｐＫＳ１３６が得られる。

【０１６７】
１×ＥＬ（ｐＫＳ１３２）を用いてのＦａｄ２抑制の効率を、２×ＥＬ（ｐＫＳ１３６）構築物を用いてのＦａｄ２抑制と比較した。ｐＫＳ１３２およびｐＫＳ１３６を用いて個々の形質転換実験からダイズ胚のハイグロマイシン耐性系を単離した。ｐＫＳ１３２を含有する９８の系のうち、６９％で高オレイン酸の表現型が見られた。ｐＫＳ１３６を含有する５４の系のうち、７０％で高オレイン酸の表現型が見られた。このように、１×および２×ＥＬ構築物はいずれもＦａｄ２標的遺伝子を効率よく抑制していた。

【０１６８】
実施例８
Ｆａｄ２標的配列の長さが抑制効率に影響する
標的の長さを試験し、ＥＬ構築物における抑制効率への影響を求めた。表７に示すプライマーを用いてＰＣＲ反応を行い、２５、５０、７５、１５０、３００および６００断片のＦａｄ２を作製して、２×ＥＬに相補的な領域間に置いた。ＰＣＲ産物をＮｏｔ　Ｉで切断し、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔにライゲートし、この断片の配列を確認した。さらに、Ｎｏｔ　Ｉ消化断片をｐＫＳ１５１のＮｏｔＩにライゲートした。

【０１６９】
【表１４】

表７
ダイズFad2のPCR用のプライマー

プライマー配列	長さ	配列番号
5'-GAATTCGCGGCCGCCCAATCTATTGGGTTCTC-3' Fad2配列の363位における共通の5'末端プライマー	－	18
5'-GAATTCGCGGCCGCAACCTTGGAGAACCCAAT-3 Fad2の363～387から得られる25bpの断片用の3'末端プライマー	25	19
5'-GAATTCGCGGCCGCATCACCCACACACCAGTG-3' Fad2の363～412から得られる50bpの断片用の3'末端プライマー	50	36
5'-GAATTCGCGGCCGCGGCATGGTGACCACACTC-3' Fad2の363～437から得られる75bpの断片用の3'末端プライマー	75	20
5'-GAATTCGCGGCCGCTGAGAAATAAGGGACTAA-3' Fad2の363～512から得られる150bpの断片用の3'末端プライマー	150	21
5'-GAATTCGCGGCCGCGAGTGTGACGAGAAGAGA-3' Fad2の363～662から得られる300bpの断片用の3'末端プライマー	300	22
5'-GAATTCGCGGCCGCTTCTGATGAATCGTAATG-3' Fad2の363～962から得られる600bpの断片用の3'末端プライマー	600	23

【０１７０】
【表１５】

表８
標的の長さが2xELによる抑制に対しておよぼす影響

Fad2標的長	被検系数	高オレイン酸
25	8	0%
50	8	0%
75	8	13%
150	8	13%
300	29	34%
600	20	60%

【０１７１】
表８に示す結果から、標的の長さと抑制効率との間には明らかな相関があることが分かる。Ｆａｄ２の最も長い（６００ｂｐ）断片は、３００ｂｐの断片に比べてＥＬ構築物で抑制される可能性がほぼ２倍であり、５０ｂｐおよびそれ未満の断片は有効ではない。
【０１７２】
実施例９
２×ＥＬによって複数の標的配列を抑制することが可能である
構築物をアセンブルし、ＥＬの相補的な配列間に複数の標的配列を用いて同時に抑制を行うことができるか否かを試験した。ダイズΔ－９不飽和化酵素から得られる９６９ｂｐの断片を５９９ｂｐのＦａｄ２断片の隣りにあるｐＫＳ１３６に挿入し、ｐＢＳ６８を作製した。両方の不飽和化酵素断片を２×ＥＬに相補的な領域でフランキングした（２×ＥＬ－Ｆａｄ２－Δ９－２×ＥＬ、この配列を配列番号２４に示す）。
【０１７３】
Δ－９不飽和化酵素は、１８－炭素脂肪酸の９位で二重結合を触媒し、ステアリン酸（１８：０）からオレイン酸（１８：１）を形成する。これは、オレイン酸をリノレイン酸（１８：２）に変換する１２位の二重結合を触媒するΔ－１２　Ｆａｄ２の場合と同様である。独特なＦａｄ２遺伝子を抑制すると、多価不飽和脂肪酸を犠牲にしてオレイン酸が蓄積される。Δ－９不飽和化酵素を抑制すると、不飽和脂肪酸をすべて犠牲にしてステアリン酸が蓄積される。しかしながら、ダイズにはいくつかのΔ－９不飽和化酵素がある（少なくとも３）ため、ひとつのメンバの抑制がどのように油の組成に影響するのかは不明である。実施例１および３で概説したようにして形質転換プロトコールと油の組成分析を実施した。
【０１７４】

ｐＢＳ６８を用いてダイズを形質転換すると、１１３のハイグロマイシン耐性系が得られた。このうち、７２で油の表現型が若干（６４％）認められた。抑制された７２の系の表現型は、１８が高ステアリン酸塩、２３が高オレイン酸塩、３１が高オレイン酸塩および高ステアリン酸塩であった。したがって、単一のＥＬ構築物で複数の標的を効率よく抑制することができる。

【０１７５】

実施例１０

ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳ構築物におけるダイズガラクチノール合成酵素遺伝子の抑制

ラフィノース糖は植物に広く見られるショ糖のＤ－ガラクトース含有オリゴ糖誘導体の一グループである。ラフィノース糖は以下の式で表されることが特徴である。［Ｏ－β－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→６）$_n$－α－グルコピラノシル－（１→２）－β－Ｄ－フルクトフラノシド（式中、ｎ＝０からｎ＝４がそれぞれ、ショ糖、ラフィノース、スタキオース、ベルバスコース、ａｊｕｇｏｓｅとして知られている）。

【０１７６】

多くの種で豊富であるとはいえ、ラフィノース糖は経済的に重要ないくつかの作物種を効率的に利用する上での障壁になっているのである。腸粘膜にα－ガラクトシダーゼが存在しないことが主な理由で、動物はラフィノース糖を直接消化することができない［Ｇｉｔｚｅｌｍａｎｎら（１９６５）Ｐｅｄｉａｔｒｉｃｓ ３６：２３１～２３６；Ｒｕｔｌｏｆｆら（１９６７）Ｎａｈｒｕｎｇ １１：３９～４６］。しかしながら、下部腸のミクロフローラはラフィノース糖を容易に発酵させることができ、腸の酸性化と、二酸化炭素、メタンおよび水素ガスの生成につながる［Ｍｕｒｐｈｙら（１９７２）Ｊ．Ａｇｒ．Ｆｏｏｄ．Ｃｈｅｍ．２０：８１３～８１７；Ｃｒｉｓｔｏｆａｒｏら（１９７４）ｉｎ Ｓｕｇａｒｓ ｉｎ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ、Ｈ．Ｌ．ＳｉｐｐｌｅおよびＫ．Ｗ．ＭｃＮｕｔｔ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、第２０章、３１３～３３５；Ｒｅｄｄｙら（１９８０）Ｊ．Ｆｏｏｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ ４５：１１６１～１１６４］。これによって生じる膨満は、動物、特にヒトの食餌におけるマメ科の植物の用途を著しく制限してしまう場合がある。ラフィノース糖が存在することでヒトの食餌におけるマメ科植物の用途が制約を受けるのは残念なことである。これらの種の多くは、この点以外は優良なタンパク質源および可溶性繊維源であるためである。ラフィノース糖を含有しないさまざまな食用マメの方が、ヒトや動物の食餌には価値が高く、栄養価が望ましい食用のマメ科の植物を手広く利用しやすくなるであろう。

【０１７７】

ラフィノース糖の生合成は十分に特徴化されている［Ｄｅｙ（１９８５）ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｓｔｏｒａｇｅ Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅｓ ｉｎ Ｇｒｅｅｎ Ｐｌａｎｔｓ、Ｐ．Ｍ．ＤｅｙおよびＲ．Ａ．Ｄｉｘｏｎ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｌｏｎｄｏｎ、ｐｐ．５３～１２９を参照のこと］。ラフィノース糖生合成のコミットされた（ｃｏｍｍｉｔｔｅｄ）反応には、ＵＤＰ－ガラクトースおよびｍｙｏ－イノシトールからのガラクチノールの合成が関与する。この反応を触媒する酵素がガラクチノール合成酵素（イノシトール１－α－ガラクトシルトランスフェラーゼ；ＥＣ２．４．１．１２３）である。ラフィノースおよびラフィノース糖ファミリにおける上位の相同物のショ糖からの合成は、明確なガラクトシルトランスフェラーゼ（たとえば、ラフィノース合成酵素およびスタキオース合成酵素）によって触媒されると考えられている。多くの種での研究から、還元炭素のフラックスをラフィノース糖の生合成にする制御の鍵となる酵素はガラクチノール合成酵素なのではないかと思われる［Ｈａｎｄｌｅｙら（１９８３）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｓｏｃ．Ｈｏｒｔ．Ｓｃｉ．１０８：６００～６０５；Ｓａｒａｖｉｔｚら（１９８７）Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．８３：１８５～１８９］。過発現の結果としてまたはアンチセンス阻害によってガラクチノール合成酵素の活性を変えると、特定の組織で生成されるラフィノース糖の量が変わるであろう。

【０１７８】

従来技術においてすでに知られている関連のガラクチノール合成酵素遺伝子には、米国特

許第５，７７３，６９９号および同第５，６４８，２１０号、Ｋｅｒｒら、「Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｇａｌａｃｔｉｎｏｌ Ｓｙｎｔｈａｓｅ ｆｒｏｍ Ｚｕｃｃｈｉｎｉ ａｎｄ Ｓｏｙｂｅａｎ（ズッキーニおよびダイズから得られるガラクチノール合成酵素のヌクレオチド配列）」、ＳｐｒｅｎｇｅｒおよびＫｅｌｌｅｒ（２０００） Ｐｌａｎｔ Ｊ ２１：２４９～２５８に開示されている配列がある。おそらく関連している配列も国際特許出願公開第ＷＯ９８／５０５５３号、Ｌｉｇｈｔｎｅｒ、「Ｃｏｒｎ Ｇｌｙｃｏｇｅｎｉｎ（トウモロコシグリコゲニン）」に開示されている。ダイズガラクチノール合成酵素をコードする２つの遺伝子がすでに同定されている（配列番号３０および３２、予測翻訳産物を配列番号３１および３３に示す、２０００年４月１１日出願の米国特許仮特許出願第６０／１９６５５０号に提示されている）。独特なダイズＦａｄ２遺伝子とは異なり、ダイズには複数のガラクチノール合成酵素遺伝子があることが知られている。ガラクチノール合成酵素をコードする遺伝子は複数あるため、ラフィノース糖レベルへの影響を検出するには、２以上の遺伝子を抑制する必要がある場合があると思われる。

【０１７９】

２×ＥＬカセットのＮｏｔＩ部位においてクローニングした２つのガラクチノール合成酵素ダイズ遺伝子であるＧａｓ１（３９０ｂｐ、配列番号３０の１３～４０２から得られる）およびＧａｓ２（３９９ｂｐ、配列番号３２の１２９～５２７から得られる）の断片を含むプラスミド構築物をアセンブルした。プロモーター領域はダイズの後期胚プロモーター（Ｌｅａ）であった。

配列番号２５ ５’－ＡＴＴ ＡＡＣ ＣＴＣ ＡＡＴ ＴＣＴ ＴＣＴ ＡＡＧ（Ｍ９７２８５の２５位～４５位）

配列番号２６ ５’－ＴＴＣ ＡＡＡ ＧＡＴ ＣＡＡ ＴＴＡ ＴＴＴ ＣＣ（Ｍ９７２８５の９９５位～１１１２位）というプライマーを用いて、ゲノムＡ２８７２ダイズＤＮＡからＬｅａプロモーター（Ｌｅｅら （１９９２） Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １００：２１２１～２１２２；ジーンバンク寄託番号Ｍ９７２８５）を増幅し、ファゼオリン３’末端（配列番号２７および２８に示すプライマーを用いて増幅）を加えた。次に、Ｌｅａプロモーター－２×ＥＬ－Ｇａｓ１－Ｇａｓ２－２×ＥＬ－ファゼオリン３’－末端カセット全体をｐＫＳ１３６のＢａｍＨＩ部位にクローニングし、ｐＫＳ１４９ベクターを作製した（ｐＫＳ１４９の完全なＥＬ領域の配列を配列番号２９に示す）。植物に導入すると、ｐＫＳ１３６は、Ｆａｄ２（Ｋｔｉプロモーターで制御）およびＧａｓ遺伝子（Ｌｅａプロモーターで制御）の両方を阻害する。Ｋｔｉプロモーターは胚で活性であるため、上記の例で説明したように、高オレイン酸の表現型について胚をスクリーニングすることが可能である。ハイグロマイシン耐性として単離した１１９の系のうち、６５％で高オレイン酸の表現型が認められた。

【０１８０】

これらの抑制された系はＧａｓ抑制カセットを含んでいるはずであり、実生でラフィノース糖のアッセイを行うことができる（初期胚段階の間はＬｅａは活性ではない）。ラフィノース糖（ガラクチノール、ラフィノース、スタキオースなど）については、薄層クロマトグラフィを用いて検出することが可能である。植物試料をヘキサンで抽出した後、乾燥させる。次に、乾燥させた材料を８０％メタノールに再懸濁させ、室温にて１～２時間インキュベートし、遠心し、上清１～２マイクロリットルをＴＬＣプレート（ニュージャージー州ＧｉｂｂｓｔｏｗｎのＥＭ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから入手したＫｉｅｓｅｌｇｅｌ ６０ ＣＦ；カタログ番号１３７４９－６）に滴下する。エチルアセテート：イソプロパノール：２０％酢酸（３：４：４）中にて１～１．５時間ＴＬＣを実施する。空気乾燥させたプレートに２％硫酸を噴霧し、炭になった糖が検出されるまで加熱する。図２に示されるように、ラフィノース糖が極めて少ないことが知られている対照（Ｌｏｗ ４）と比較して、ＧＡＳ－ＥＬを付した２つの系でラフィノース糖のレベルが減少している（一番下のバンド）のが分かる。これらの系では、野生型のダイズと比較してラフィノース糖が６０％減少しているのではないかと推測される。

【０１８１】
実施例１１
ＥＬＶＩＳＬＩＶＥＳ構築物を用いて必須植物遺伝子をスクリーニングすることができる分枝鎖アミノ酸であるイソロイシン、ロイシンおよびバリンの生合成における最初の共通ステップは、アセトヒドロキシ酸合成酵素（ＡＨＡＳ）としても知られるアセトラクテート合成酵素（ＡＬＳ）によって触媒される（Ｋｅｅｌｅｒら、Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １９９３ １０２：１００９～１８）。スルホニル尿素、イミダゾリノン、トリアゾロピリミジンを含むいくつかのクラスの構造的に無関係な除草剤による、自然界の植物ＡＬＳに対する阻害は致死的である（Ｃｈｏｎｇ ＣＫ、Ｃｈｏｉ ＪＤ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２０００ ２７９：４６２～７）。ダイズでＡＬＳをコードする遺伝子の抑制も致死的なものとなるはずである。このため、ＡＬＳなどの十分な確証が得られている除草剤標的をＥＬベクターに挿入し、形質転換スクリーニングプロセスを用いて必須植物遺伝子を同定できるか否かを試験することができる。仮にできる場合、高スループットの方法で他の必須植物遺伝子をスクリーニングし、潜在性のある新規な除草剤標的を同定することができる。「必須植物遺伝子」という用語は、本願明細書において使用する場合、植物の正常な成長、発達および／または生存に必要な産物をコードする遺伝子を示す。ＡＬＳに加えて、必須植物遺伝子の例として、アミノ酸、核酸または脂質の生合成における律速酵素があげられるが、これに限定されるものではない。また、機能が明らかになっていない多くの遺伝子が必須であり得ると思われる。
【０１８２】
ハイグロマイシンの選択時にダイズのＥＬ－ＡＬＳ－ＥＬ構築物が発現されると、ＨＰＴ遺伝子が存在する場合ですら回復されるイベントは極めてわずかしかないはずである。後期胚形成までＥＬ－ＡＬＳ－ＥＬ転写単位が発現されないと、形質転換イベントの回復は、ＨＰＴ遺伝子しか含まないベクターの対照物で得られるイベントに近い数になるはずである。３５Ｓプロモーター（ｐＫＳ１６１）を用いてＥＬ－ＡＬＳ－ＥＬの構成的発現を達成することが可能である。上述したＬＥＡプロモーター（ｐＫＳ１６３）を用いて、後期胚形成／発芽まで制限されたＥＬ－ＡＬＳ－ＥＬの発現を達成することが可能である。
【０１８３】
ＫＳ１６１を作製するには、ＥＬリンカー（配列番号１２）をｐＫＳ５０のＮｏｔＩ部位にクローニングし、ｐＫＳ１３７（ＨＰＴ遺伝子が２つあるプラスミドに１ｋｂの３５ＳＣａＭＶプロモーターと７００ｂｐのｎｏｓ３’末端とを有するＥＬに相補的な領域１つであり、２つの遺伝子のうち一方はＴ７プロモーターを持ち、他方は３５Ｓプロモーターを持つ）を作製した。次に、ダイズＡＬＳ遺伝子から得られる２０８ｂｐのＨｉｎｄ ＩＩＩ／ＥｃｏＲ Ｉ断片（配列番号３５、断片は８９１～１１１４位から得たものである）をｐＫＳ１３７のＨｉｎｄ ＩＩＩ／ＥｃｏＲ Ｉ部位にクローニングし、ｐＫＳ１６１を作製した。ｐＫＳ１６３を作製するには、ＥＬリンカー（配列番号１２）をｐＫＳ１２７のＮｏｔＩ部位にクローニングし、ＫＳ１３９（ＨＰＴ遺伝子が２つあるプラスミドに実施例１０で得られるＬｅａプロモーターおよびファゼオリン３’末端のあるＥＬに相補的な領域１つであり、２つの遺伝子のうち一方はＴ７プロモーターを持ち、他方は３５Ｓプロモーターを持つ）を作製した。次に、ダイズＡＬＳ遺伝子から得られる２０８ｂｐのＨｉｎｄ ＩＩＩ／ＥｃｏＲ Ｉ断片（配列番号３５、ＨｉｎｄＩＩＩ／ＥｃｏＲＩ断片は８９６～１１０３位から得たものである）をＫＳ１３９のＨｉｎｄ ＩＩＩ／ＥｃｏＲ Ｉ部位にクローニングし、ＫＳ１６３を作製した。
【０１８４】
ＫＳ１６１およびＫＳ１６３を８２１の組織に形質転換した（実施例１）。この組織の形質転換効率は、通常では組織１グラムあたりクローン２００～５００個の範囲である。ボンバードおよびハイグロマイシン含有培地への移行の４週間後にＫＳ１６１およびＫＳ１６３を用いた２つの別々の形質転換実験で得られた結果は以下のとおりである。
【０１８５】
実験１

ＫＳ１６１（３５Ｓ　ＡＬＳ　ＥＬ）１６個のクローン／組織１グラム
ＫＳ１６３（ＬＥＡ　ＡＬＳ　ＥＬ）２４７個のクローン／組織１グラム
実験２
ＫＳ１６１（３５Ｓ　ＡＬＳ　ＥＬ）４３個のクローン／組織１グラム
ＫＳ１６３（ＬＥＡ　ＡＬＳ　ＥＬ）４６７個のクローン／組織１グラム
【０１８６】
どちらの実験でも、おそらく胚形成段階全体にわたって内在性ＡＬＳ遺伝子が抑制されたことが原因で３５Ｓ　ＥＬ－ＡＬＳベクターではクローン数が＞９０％減少した。したがって、３５Ｓ－ＥＬ構築物（ＫＳ１３７）およびＬＥＡ－ＥＬ構築物（ＫＳ１３９）に挿入した新規な遺伝子断片について得られたクローン数の違いを、対応する内在性遺伝子が必須であるか否かを判定し、よってこれが潜在的な除草剤の標的であるか否かを判定する上での目安として利用することができる。粒子ボンバードから数週間以内で未知の遺伝子断片が形質転換効率におよぼす影響を測定することができるため、これは新たな除草剤の標的候補を同定するための手軽な手段である。一般的なスクリーニングでは、ＫＳ１３７およびＫＳ１３９を空ベクター対照物、ＫＳ１６１を陽性（ＡＬＳ）対照物として使用し、さまざまな遺伝子断片も用いて組織にボンバードを行い、ＰＣＲによって増幅してＨｉｎｄ　ＩＩＩおよびＥｃｏＲ　Ｉ部位を含むようにし、ＫＳ１３７およびＫＳ１３９のＨｉｎｄＩＩＩ／ＥｃｏＲＩ部位にクローニングする。
【０１８７】
ＥＬ構築物を用いて抑制頻度が改善されることで、信頼できるスクリーニング方法を得られる可能性が出てくる。２つの実験で統計的に決定的な差になるようにするには、ｐＫＳ１３７またはｐＫＳ１３９に含まれる標的配列によって、有意な率でハイグロマイシン回復形質転換イベントを抑制しなければならない。「高い頻度」という表現は、本願明細書において抑制効率に関して使用する場合、標的抑制表現型を呈する形質転換系の割合を示す。高い頻度の割合は少なくとも１５～９５％の範囲ならびにこの範囲に含まれる整数値での割合が想定される。好ましい実施形態として、少なくとも１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％があげられる。
【０１８８】
実施例１２
ＥＬ構築物を用いてトウモロコシでセルロース合成酵素を抑制
セルロース合成酵素遺伝子は、植物におけるセルロース形成に関与するタンパク質ファミリをコードする（Ｐｅａｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９３、１２６３７～１２６４２；Ｓａｘｅｎａら、（１９９０）、Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１５、６７３～６８４）。セルロース合成酵素（ｃｅｓＡ）をコードするいくつかのトウモロコシ遺伝子が最近になってクローニングされ、特徴付けられた（２０００年２月２４日公開の国際特許出願公開第ＷＯ００／０９７０６号）。これらの遺伝子のうち４つすなわち、ｃｅｓＡ１、ｃｅｓＡ４、ｃｅｓＡ５、ｃｅｓＡ８から得られる断片を用いて、１×ＥＬがトウモロコシにおいてこれらの遺伝子の抑制を指示できるか否かを試験した。
【０１８９】
ｃｅｓＡ１、ｃｅｓＡ４、ｃｅｓＡ５、ｃｅｓＡ８について、ｃＤＮＡクローンの５’末端から得られる１ｋｂの断片（５’－ＵＴＲおよびＯＲＦ配列を含む）をそれぞれ別々に１×ＥＬ（配列番号１２）構築物の内部ＮｏｔＩ部位にクローニングした。これらの「ＥＬ－ｃｅｓＡ－ＥＬ」カセット各々を、ｆ３．７プロモーター（柄特異的発現を若干優先する弱い構成的プロモーター）と、プロテイナーゼインヒビター３’末端（ジャガイモから得られるｐｉｎＩＩ、Ａｎら　（１９８９）　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　１：１１５～１２２）と、３５Ｓ：ＢＡＲ：ｐｉｎＩＩ選択マーカーとを含むプラスミドに挿入した。ｐｉｎＩＩ　３’末端のあるＧＵＳ遺伝子をドライブするＩＮ２プロモーターを含む対照プラスミドも作製した。

【０１９０】
構築物各々を用いてのトウモロコシの形質転換実験で得られる結果を表９に示す。４つのｃｅｓＡ遺伝子構築物各々について２５の系を単離し、対照については１８の系を単離した。植物の高さと柄の直径は、平均すると、抑制構築物を含む系の方が対照物よりも小さかった。穂の高さはｃｅｓＡ１およびｃｅｓＡ５含有系の方が短かった。乾物全体に対するセルロースの平均割合は通常、対照植物で４６％である。ｃｅｓＡ１＞ｃｅｓＡ５＞ｃｅｓＡ８＞ｃｅｓＡ４の順で、すべてのｃｅｓＡ構築物にセルロースが４６％未満の系があった。ＤＮＡサザンブロット分析によってセルロースの割合が低かった系を試験し、単一コピートランスジーン挿入物が含まれるのはどれかを求めた。いずれにおいてもセルロースの割合が低く単一のトランスジーンを持つ系が少なくとも１つあった。

【０１９１】
【表１６】

表9
EL 構築物による CesA 抑制の概要

構築物	高さ (cm)	穂 (cm)	柄 (mm)	セルロース <46%	単一 トランスジーン
対照	171	44	16		
CesA1	150	40	14	9	3
CesA4	164	46	13	3	2
CesA5	148	41	13	7	2
CesA8	166	46	15	5	1

【０１９２】
これらの結果から、１×ＥＬ構築物内に含まれるｃｅｓＡ遺伝子断片を持つ植物でセルロースレベルが変化することが分かる。これは、トウモロコシでのｃｅｓＡの抑制が検出可能な表現型であり、トウモロコシではＥＬ制御抑制が活性であるという意味と解釈される。ｆ３．７プロモーターは本件特許出願に記載の他のプロモーター（３５Ｓ－ＣａＭＶ、Ｋｔｉなど）と比べると弱いプロモーターであり、ｃｅｓＡは大きな多遺伝子ファミリである点に注意されたい。このような要因が抑制の頻度および／または程度に影響しているかもしれないのである。

【０１９３】
実施例１３
ＧＵＳに相補的な領域を用いてのトウモロコシにおけるＧＦＰの一過的な抑制
この実施例で用いた発現カセットはいずれも、トウモロコシのユビキチンプロモーター（ｎｔ１～８９９）と、トウモロコシのユビキチン５’未翻訳リーダー配列（ｎｔ９００～９８２）と、トウモロコシのユビキチンイントロン１（ｎｔ９８３～１９９２）とを含むものである。プラスミドＰＨＰ７９２１では、コード配列（ｎｔ２０１５～２７３１）はトウモロコシでの発現用にコドンが最適化されたＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）である。プラスミドＰＨＰ３９５３では、コード配列（ｎｔ２０１３～３８２１）はＧＵＳである。両方のカセットにはＳ．ｔｕｂｅｒｏｓｕｍのプロテイナーゼインヒビターＩＩ遺伝子から得られるポリアデニル化シグナル配列が含まれる（ＰＩＮＩＩ　ＴＥＲＭ、ＰＨＰ７９２１のｎｔ２７３７～３０４７およびＰＨＰ３９５３のｎｔ３８８３～４１９２）。

【０１９４】
この研究での発現カセットの構築ではいずれも当業者間で周知の標準的な組換えＤＮＡ法を使用した。断片挿入の向きとプラスミド構築物の最終構造については、標準的なアガロースゲル分析および／またはプラスミドのシーケンシングを用いて決定した。

【０１９５】
プラスミドＰＨＰ７９２１を用いて、以下のようにしてＧＦＰコード配列のほんの一部の相補的な領域（ＣＲ）を作製した。プラスミドＤＮＡをＸｈｏＩで消化し、ＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片で処理して、ＧＦＰコード配列の３’末端付近のｎｔ２４３６～

２６７５を表す２４４ｂｐの平滑末端断片を放出させた。次に、この断片をＧＦＰの停止コドンのすぐ下流のＨｐａＩ部位（ｎｔ２７３５）でＰＨＰ７９２１に戻した。もとの配列とは逆方向に挿入断片を持つ組換えプラスミドを同定した。このプラスミドをＰＨＰ１６３９１と呼ぶ。

【０１９６】

異種ＧＦＰ－ＣＲを含むＧＵＳの発現カセットを以下のようにして構築した。ＰＨＰ１６３９１のＧＦＰ－ＣＲ全体をＢｓｒＧＩ断片（ｎｔ２４６４～２９４７、４８３ｂｐ）として単離した。この断片は、ステムが２１４ｂｐでループが５５ｎｔのＣＲを形成できる配列を含む。この断片を上述したようにしてクレノウで末端平滑化し、３ヶ所の異なる部位でＰＨＰ３９５３のＧＵＳ発現カセットに挿入した。プラスミドＰＨＰ１６５６１は、開始コドンのすぐ５’側のＰＨＰ３９５３のＢａｍＨＩ部位（占有）（ｎｔ２００６）に挿入したＧＦＰ－ＣＲを持つ。プラスミドＰＨＰ１６５６２は、停止コドンのすぐ３’側のＰＨＰ３９５３のｎｔ３９１９でＰａｃＩ部位（平滑化するためにＴ４ポリメラーゼで処理）に挿入したＧＦＰ－ＣＲを持つ。同様に、プラスミドＰＨＰ１６５６３はＧＵＳコード配列内にてＰＨＰ３９５３のｎｔ２３９８でＳｎａＢＩ部位に挿入したＧＦＰ－ＣＲを持つ。

【０１９７】

２週間ごとに新鮮な５６０Ｐ（Ｎ６塩、Ｅｒｉｋｋｓｏｎビタミン、プロリン０，６９ｇ／ｌ、２，４－Ｄ２ｍｇ／ｌ、ショ糖３％）培地に継代培養することによって、高ＩＩ型カルスの状態を維持した。健康なカルスを０．７７mm^2のナイロンメッシュに通して押し出し、秤量し、２，４－Ｄ２ｍｇ／ｌを含むＭＳ培養液に培地４０ｍｌあたり組織３グラムの密度で再懸濁させた。孔の大きなピペットを用いて溶液を上下にピペットで動かし、細胞を均一に懸濁させ、真空装置を用いて４ｍｌのアリコート（３００ｍｇ）をガラス濾紙の上に集めた。この濾紙には各々細胞約３００ｍｇが含まれていたが、これを５６０Ｐ培地にのせ、暗所にて２６℃で培養した。２～４日後、濾紙を培養液から取り出し、真空装置を用いて余分な液体を除去した。次に、デュポンのＢｉｏｌｉｓｔｉｃｓ粒子銃を用いて、１ｕｍの金粒子を使うように手を加えた標準的なＨｉ－ＩＩボンバードメント形質転換プロトコール（Ｓｏｎｇｓｔａｄ Ｄ．Ｄ．ら、Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．Ｐｌａｎｔ ３２：１７９～１８３、１９９６）で細胞にＤＮＡを入れた。濾紙を５６０Ｐ培養液に戻し、暗所にて２６℃で培養した。すべてのＤＮＡを同じ比率で調節し、最終濃度を全ＤＮＡ／粒子調製物１ｕｇ（各調製管で混合した各ＤＮＡ０．３３ｕｇを６ショットで用いた）とした。この実験は以下のとおりとした。各処理で１０プレート（２通りのＤＮＡ調製物それぞれについて５つずつ）をボンバードした。

【０１９８】

【表１７】

処理	DNA
No.1	対照 PHP3953(GUS)+PHP10256(rLuciferase)+PHP7921(GFP)
No.2	GUS w/5'CRCPHP3953(GUS)+PHP10256(rLuciferase)+PHP16561(CR-GUS)
No.3	GUS w 3'CRCPHP3953(GUS)+PHP10256(rLuciferase)+PHP16562(GUS-CR)
No.4	cds の GUS w/CRC PHP3953(GUS)+ PHP10256(rLuciferase)+PHP16563(GU-CR-S)

【０１９９】

分析を行うために、処理内のプレートを５対にグループ分けした（各対には、同じプラスミド処理について異なるＤＮＡ調製物でショットを行ったプレートを含む）。ボンバードの２日後、２つの対になったプレートから得られる組織をすべて合わせ、培養液５ｍｌに再懸濁させた。孔の大きなピペットで混合した後、１ｍｌのアリコートを１．５ｍｌのエッペンドルフ管に移した。微量遠心管にて１０００ＲＰＭで２分間細胞を遠心し、上清（培養液）をデカントした。それぞれの管に、「プロメガ社のルシフェラーゼＰａｓｓｉｖｅ Ｌｙｓｉｓ Ｂｕｆｆｅｒ」１５０ｕｌを加え、氷上にて温度を平衡にし、ハンドドリル式Ｋｏｎｔｅｓチューブプラスチックｐｅｓｔｉｌ（抽出とこれに続くルシフェラー

ゼアッセイではプロメガ社のデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイプロトコール（技術告示第ＴＭ０４０号）を用いて細胞を分離した。微量遠心管にて３０００ＲＰＭで３分間遠心して細胞片をペレット化し、上清をピペットで移した。この抽出物のアリコートをＧＵＳおよびルシフェラーゼの両方の蛍光定量に使用した（それぞれ５０および２０ｕｌ）。基質を加えた後１０から４０分の間のレート測定値としてＧＵＳ酵素活性を求め、データをｐｍｏｌ　ＭＵ／分／ｍｌ／抽出物（勾配）単位で表した。ＲａｏおよびＦｌｙｎｎのプロトコール（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１９９０　８：３８～４０に従って、ＬａｂＳｙｓｔｅｍｓ　ＦＬＵＯＲＯＳＫＡＮ　ＡｓｃｅｎｔＦＬにて蛍光定量ＧＵＳアッセイを実施した。Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍｏｎｏｌｉｇｈｔ　２０１０を製造業者の指示に従って用いて、プロメガ社のプロトコールも併用してルシフェラーゼ活性の蛍光定量分析値を得た。各複製について両方のマーカーを評価したところ、内部対照（ルシフェラーゼ）が得られ、これを基準に相対的なＧＵＳ活性を評定することが可能であった。したがって、ＧＵＳ／ルシフェラーゼ単位の比としてデータをプロットした（Ｒｅｎｉｌｌａルシフェラーゼの絶対蛍光定量単位は極めて高いため、ＧＵＳ活性の正規化に用いる前にルシフェラーゼ活性の生の値をいずれも１０で割ってある）。

【０２００】

【表１８】

表１０

GFP の相補的な領域が 3'（No. 3）および
内部方向（No. 4）で標的 GUS 活性を減少させる

処理	Pmol. MU／分／ml 抽出物勾配／rLuci 平均	標準偏差
No. 1	74.14	27.66
No. 2	82.05	20.99
No. 3	20.22	17.87
No. 4	9.67	3.02

【０２０１】

【表１９】

再実験

処理	Pmol. MU／分／ml 抽出物勾配／rLuci 平均	標準偏差
No. 1	86.93	6.94
No. 2	77.3	22.62
No. 3	20.03	7.32
No. 4	11.2	2.32

【０２０２】

このような一過的な発現の実験における上記の結果（表１０参照）から、標的の５’側に相補的な領域をおいても標的遺伝子の発現は減少しないようにみえる。しかしながら、最適な条件下または安定した形質転換実験では、相補的な領域を標的の５’におくだけで標的の発現が十分に減少すると考えられる。

【０２０３】

実施例１４

修飾ダイズの相補的な領域によるトウモロコシＰＤＳの抑制

多クローニング部位を囲む相補的な領域としてダイズＫｔｉプロモーターから得られる２０５ｂｐのＨｉｎｄＩＩＩ－ＢｓｔＥＩＩ断片を用いてさらに別の抑制構築物を作製した。Ｋｔｉ断片のコピー２つを逆の繰返しの形でライゲートし、続いてＰＣＲで修飾して都合の悪い制限部位を除去するとともに、両端と２つの相補的な配列の間の領域とにクローニング部位を加え、ＳＨＨ３カセットを形成した（配列番号３４を参照のこと）。このようにして得られるプラスミド（ＰＨＰ１７９６２）をＳＨＨ３配列のソースとして用いた

。Ｋｔｉ配列は通常トウモロコシゲノムには見られないものであるため、ＳＨＨ３領域だけでは内在性トウモロコシ遺伝子の抑制が起こるとは思えない。しかしながら、内在性標的配列の一部を相補的なＫｔｉ配列間のクローニング部位に挿入すると、相同的な内在性遺伝子転写物は影響を受けるはずである。

【０２０４】

内在性遺伝子をサイレンシングする際のＳＨＨ３の有用性を試験するために、Ｚｅａ属トウモロコシのフィトエン不飽和化酵素遺伝子（ＰＤＳ－１）のコード配列の約８０％に相当する１３８５ｂｐのＮｈｅＩ断片（Ｐｉｏｎｅｅｒ ＥＳＴ ｃｎｌｃｚ９１Ｒ、ジーンバンク寄託番号第Ｌ３９２６６）を上述したようにしてクレノウ酵素で処理して末端を平滑化し、続いてＳＨＨ３のＥｃｏＲＶ部位にライゲートしてＰＨＰ１７８９４を生成した。次に、このＳＨＨ３－ＰＤＳ断片を１８６５ｂｐのＨｐａＩ断片として中間ベクター構築物に移し、ｐｉｎＩＩターミネーターによって得られるポリアデニル化シグナルを用いてユビキチンプロモーター：ユビキチンイントロン１（米国特許第５，５１０，４７４号および同第５，６１４，３９９号）の制御下においた（Ａｎら （１９８９） Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １：１１５～１２２）。このようにして得られる植物転写単位を、ＣａＭＶ３５Ｓ－ビアラホス選択マーカー要素を含むバイナリーベクター（ＰＨＰ１５５７８）に移し、ＰＨＰ１７９１４を生成した。この構築物を、スーパーバイナリープラスミドｐＳＢ１を持つＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ系統ＬＢＡ４４０４のコンピテント細胞（（Ｉｓｈｉｄａら （１９９６） Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ １４：７４５～７５０）に電気穿孔した。このプロセスによって、ＰＨＰ１７９１４とｐＳＢ１の複合配列を含む融合体プラスミドが得られる。この融合体プラスミドをＰＨＰ１７９３９と名付け、以下のようにしてＺｅａ属トウモロコシの未成熟胚の形質転換に利用した。

【０２０５】

Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍによるトウモロコシの形質転換

受粉約１０日後（ＤＡＰ）のトウモロコシの新たに単離した未成熟胚を、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍと一緒にインキュベートした。形質転換に好ましい遺伝子型は高度に形質転換可能な遺伝子型Ｈｉ－ＩＩ（Ａｒｍｓｔｒｏｎｇ（１９９１）Ｍａｉｚｅ Ｇｅｎ Ｃｏｏｐ Ｎｅｗｓｌｅｔｔｅｒ ６５：９２～９３）である。Ｈｉ－ＩＩで選り抜きの近交配系と交雑させることで作製したF_1ハイブリッドを用いてもよい。未成熟胚のＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ処理後、有毒レベルの除草剤を含む培地にて胚を培養した。除草剤耐性遺伝子を与えた細胞と、結合された遺伝子（単数または複数）だけが、選択培地で成長した。このようにして選択したトランスジェニックイベントを伝播して植物全体に再生し、種子を生成し、トランスジーンを子孫に伝えた。

【０２０６】

Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍの調製

米国特許第５，５９１，６１６号に従って遺伝子操作したＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓＬＢＡ４４０４を構築し、配列番号３４に示す相補的な領域によって抑制されるＰＤＳ遺伝子と選択マーカー遺伝子とを持たせた。一般に、選択マーカーにはＢＡＲ（Ｄ’Ｈａｌｌｕｉｎら （１９９２） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ． ２１６：４１５～４２６）またはＰＡＴ（Ｗｏｈｌｌｅｂｅｎら （１９８８） Ｇｅｎｅ ７０：２５～３７）を使用すればよい。

【０２０７】

遺伝子操作した構築物を植物の形質転換に使用するために、まず、最小ＡＢ培地［最小ＡＢ培地には以下の成分を含む。脱イオン水８５０．０００ｍｌ；ストック溶液８００Ａ５０．０００ｍｌ；Ｐｈｙｔａｇａｒ９ｇ、これについては適量にした（Ｑ．Ｓ．ｔｏ ｖｏｌｕｍｅ）後に加える；ストック溶液８００Ｂ＃５０．０００ｍｌ；グルコース＃５．０００ｇ；スペクチノマイシン５０／ｍｇ／ｍｌストック＃２．０００ｍｌ。使用法は以下のとおりである。洗練した（ｐｏｌｉｓｈｅｄ）脱イオン水に成分を順次溶解させる；１リットルあたり１００ｍｌ未満で洗練した脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６

０℃まで冷却する。＃を付した成分は、滅菌および温度まで冷却した後に加える。ストック溶液８００Ａは、以下の成分を含む。脱イオン水９５０．０００ｍｌ；第二リン酸カリウムＫ２ＨＰＯ４　６０．０００ｇ；水和第一リン酸ナトリウム２０．０００ｇ。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；水酸化カリウムを用いてｐＨを７．０に調整する；ｐＨを調整した後、洗練した脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６０℃まで冷却する。ストック溶液８００Ｂは以下の成分を含む：脱イオン水９５０．０００ｍｌ；塩化アンモニウム２０．０００ｇ；硫酸マグネシウム７－Ｈ２Ｏ　６．０００ｇ、ＭｇＳＯ４、７Ｈ２Ｏ；塩化カリウム３．０００ｇ；塩化カルシウム（無水物）０．２００ｇ；硫酸第一鉄七水和物０．０５０ｇ。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；洗練した脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６０℃まで冷却する］にバクテリアを播種してシングルバクテリアコロニーのマスタープレートを作製した。次に、２８℃で暗所にて３日間、ひっくり返したバクテリアプレートをインキュベートする。次に、最小Ａ培地［最小Ａ培地は以下の成分を含む：脱イオン水９５０．０００ｍｌ；第二リン酸カリウムＫ２ＨＰＯ４　１０．５００ｇ；第一リン酸カリウムＫＨ２ＰＯ４　４．５００ｇ；硫酸アンモニウム１．０００ｇ；クエン酸ナトリウム二水和物０．５００ｇ；２０％ショ糖溶液＃１０．０００ｍｌ；１Ｍ硫酸マグネシウム＃１．０００ｍｌ。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６０℃まで冷却する。＃を付した成分は、滅菌および温度まで冷却した後に加える］のプレートからシングルコロニーを選択して、作業用プレートを作製し、ＹＰ培地［最小ＹＰ培地は以下の成分を含む：脱イオン水９５０．０００ｍｌ；酵母エキス（Ｄｉｆｃｏ）５．０００ｇ；ペプトン（Ｄｉｆｃｏ）１０．０００ｇ；塩化ナトリウム５．０００ｇ；バクトアガー１５．０００ｇ、これについては適量にした後に加える；スペクチノマイシン５０ｍｇ／ｍｌストック＃１．０００ｍｌ。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；水酸化カリウムを用いてｐＨを６．８に調整する；ｐＨを調整した後に洗練した脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６０℃まで冷却する。＃を付した成分は、滅菌および温度まで冷却した後に加える］のプレートに画線した。次に、ＹＰ培地のバクテリアプレートをひっくり返して２８℃で暗所にて１～２日間インキュベートした。

【０２０８】

形質転換の１日前に植物の同時形質移入共存培養用のＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍを調製した。フラスコに入れた最小Ａ培地３０ｍｌに、スペクチノマイシン５０μｇ／ｍｌと、アセトシリンゴン１００μＭと、１から２日経過した作業用プレートから得た約１／８ループのＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍとを入れた。次に、２８℃で２００ｒｐｍ、暗所にて一晩（約１４時間）かけてＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍを成長させた。対数期中期にＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍを収集し、標準的な微生物的手法および標準的な曲線を用いて、５６１Ｑ培地＋アセトシリンゴン１００μＭ中に３から５×10^{8} ＣＦＵ／ｍｌで再懸濁させた。

【０２０９】

未成熟胚の調製

トウモロコシ植物の制御受粉の９から１０日後、発達中の未成熟胚は不透明で長さ１～１．５ｍｍであり、Ａｇｒｏ感染にちょうどよいサイズである。市販の５０％漂白剤およびＴｗｅｅｎ１滴の中で３０分間、穀皮のある穂（ｈｕｓｋｅｄ　ｅａｒ）を滅菌し、続いて滅菌水で２回洗浄した。無菌状態で穀果から未成熟胚を取り出し、培地５６１Ｑ＋アセトシリンゴン１００μＭで構成される滅菌保持液２ｍｌに入れた［培地５６１Ｑは以下の成分を含む：濾過したＤ－Ｉ水９５０．０００ｍｌ；Ｃｈｕ（Ｎ６）塩基性塩（シグマＣ－１４１６）４．０００ｇ；Ｅｒｉｋｓｓｏｎビタミン混合物（１０００×シグマ－１５１１）１．０００ｍｌ；チアミン．ＨＣＬ．４ｍｇ／ｍｌ　１．２５０ｍｌ；２，４－Ｄ０．５ｍｇ／ｍｌ（Ｎｏ．２Ａ）３．０００ｍｌ；Ｌ－プロリン０．６９０ｇ；ショ糖６８．５００ｇ；グルコース３６．０００ｇ。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；ＫＯＨでｐＨを５．２に調整する；ｐＨを調整した後

、洗練した脱イオン水を用いて適量にする；濾過滅菌する（オートクレーブなし）］。

【０２１０】

胚のＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ感染と共存培養

切除した未成熟胚から保持液をデカントし、調製済みのＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍと交換した。約５分間ゆっくり混合してインキュベーションした後、未成熟胚からＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍをデカントした。次に、未成熟胚を５６２Ｐ培地［培地５６２Ｐは以下の成分を含む：濾過したＤ－Ｉ水９５０．０００ｍｌ；Ｃｈｕ（Ｎ６）塩基性塩（シグマＣ－１４１６）４．０００ｇ；Ｅｒｉｋｓｓｏｎビタミン混合物（１０００×シグマ－１５１１）１．０００ｍｌ；チアミン．ＨＣＬ．４ｍｇ／ｍｌ　１．２５０ｍｌ；２，４－Ｄ０．５ｍｇ／ｍｌ　４．０００ｍｌ；Ｌ－プロリン０．６９０ｇ；ショ糖３０．０００ｇ；Ｇｅｌｒｉｔｅ３．０００ｇ、これについては適量にした後に加える；硝酸銀２ｍｇ／ｍｌ＃０．４２５ｍｌ；アセトシリンゴン１００ｍＭ＃１．０００ｍｌ。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；ＫＯＨでｐＨを５．８に調整する；ｐＨを調整した後、洗練した脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６０℃まで冷却する。＃を付した成分は、滅菌および温度まで冷却した後に加える］のプレートに移し、胚盤表面を上に向け、２０℃で３日間暗所にてインキュベートした後、２８℃で３日間、培地５６２Ｐ＋１００ｍｇ／ｍｌ　ｃａｒｂｅｎｅｃｉｌｌｉｎで暗所にてインキュベートした（米国特許第５，９８１，８４０号を参照のこと）。

【０２１１】

トランスジェニックイベントの選択

インキュベーションに続いて、未成熟胚を５６３Ｏ培地［培地５６３Ｏは以下の成分を含む：濾過したＤ－Ｉ水９５０．０００ｍｌ；Ｃｈｕ（Ｎ６）塩基性塩（シグマＣ－１４１６）４．０００ｇ；Ｅｒｉｋｓｓｏｎビタミン混合物（１０００×シグマ－１５１１）１．０００ｍｌ；チアミン．ＨＣＬ．４ｍｇ／ｍｌ　１．２５０ｍｌ；ショ糖３０．０００ｇ；２，４－Ｄ　０．５ｍｇ／ｍｌ（Ｎｏ．２Ａ）　３．０００ｍｌ；Ｌ－プロリン０．６９０ｇ；Ｍｅｓ緩衝液０．５００ｇ；寒天（シグマＡ－７０４９、精製）８．０００ｇ、これについては適量にした後に加える；硝酸銀２ｍｇ／ｍｌ＃０．４２５ｍｌ；ビアラホス１ｍｇ／ｍｌ＃３．０００ｍｌ；Ａｇｒｉｂｉｏ　Ｃａｒｂｅｎｉｃｉｌｌｉｎ５０ｍｇ／ｍｌ＃２．０００ｍｌ。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；ｋｏｈを用いてｐＨを５．８に調整する；ｐＨを調整した後、洗練した脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６０℃まで冷却する。＃を付した成分は、滅菌および温度まで冷却した後に加える］に移し、イベントを選択できるようにした。形質転換ＤＮＡは、この例ではＢＡＲ遺伝子である除草剤耐性遺伝子を持ち、これがビアラホスに耐性を与える。１０から１４日の間隔で、胚を５６３Ｏ培地に移した。活発に成長している推定上のトランスジェニック胚形成組織は６～８週間で目に見えるようになった。

【０２１２】

実施例１５

修飾ダイズの相補的な領域によるトウモロコシＰＤＳの抑制

T_0 植物の再生

トランスジェニック胚形成組織を２８８Ｗ培地［培地２８８Ｗは以下の成分を含む：Ｄ－ＩＨ$_2$Ｏ　９５０．０００ｍｌ；ＭＳ塩４．３００ｇ；Ｍｙｏ－イノシトール０．１００ｇ；ＭＳビタミンストック溶液（Ｎｏ．３６Ｊ）５．０００ｍｌ；Ｚｅａｔｉｎ．５ｍｇ／ｍｌ１．０００ｍｌ；ショ糖６０．０００ｇ；寒天（シグマＡ－７０４９、精製）８．０００ｇ、これについては適量にした後に加える；ＩＡＡ０．５ｍｇ／ｍｌ＃２．０００ｍｌ；０．１ＭｍＡＢＡ＃１．０００ｍｌ；ビアラホス１ｍｇ／ｍｌ＃３．０００ｍｌ；Ａｇｒｉｂｉｏ　Ｃａｒｂｅｎｉｃｉｌｌｉｎ５０ｍｇ／ｍｌ＃２．０００ｍｌ。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；ｐＨ５．６に調整する；ｐＨを調整した後、洗練した脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６０℃まで冷却する。細胞生物学用のＧｅｌｒｉｔｅ３．５ｇ／Ｌを加える。＃を付した成分は、

滅菌および温度まで冷却した後に加える］に移し、不定胚が成熟するまでか、あるいは約１０から１８日間、２８℃で暗所にてインキュベートする。胚盤および子葉鞘が十分に画定された個々の成熟不定胚を２７２胚発芽培地［培地２７２は以下の成分を含む：脱イオン水９５０．０００ｍｌ；ＭＳ塩４．３００ｇ；Ｍｙｏ－イノシトール０．１００ｇ；ＭＳビタミンストック溶液５．０００；ショ糖４０．０００ｇ；Ｇｅｌｒｉｔｅ１．５００ｇ、これについては適量にした後に加える。使用方法は以下のとおりである：洗練した脱イオン水に成分を順次溶解させる；ｐＨ５．６に調整する；ｐＨを調整した後、洗練した脱イオン水を用いて適量にする；滅菌し、６０℃まで冷却する］に移し、光線下２８℃でインキュベートする。苗条と根が出た後、個々の植物を土の入った鉢に移し、一般的な園芸方法を用いて寒さに慣らす。次に、植物のＰＤＳ－サイレンス表現型について評価を行う。

【０２１３】

フィトエン不飽和化酵素は、植物でのカロチノイドの生合成における律速ステップを触媒する（Ｍｉｓａｗａら、Ｔｈｅ　Ｐｌａｎｔ　Ｊｏｕｒｎａｌ　（１９９３）　４（５）：８３３～８４０）。これは、ノルフラゾンなどのブリーチング除草剤のすでに知られている標的である。導入したＳＨＨ３－フランキングＰＤＳ１によって内在性フィトエン不飽和化酵素のコサプレッションを行うと、若い植物を光線下でインキュベートした場合に同様のブリーチング表現型が得られる（Ｔｈｏｍａｓら　（２００１）Ｔｈｅ　Ｐｌａｎｔ　Ｊｏｕｒｎａｌ　２５（４）：４１７～４２５；Ｋｕｍａｇｉら　（１９９５）　ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　９２：１６７９～１６８３；Ｒｕｉｚら　（１９９８）　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　１０：９３７～９４６）。

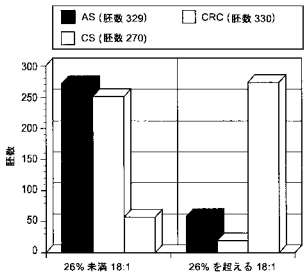
【図面の簡単な説明】

【図１】脂肪酸不飽和化酵素であるダイズ遺伝子Ｆａｄ２について、アンチセンス、「伝統的なコサプレッション」および相補的な領域の発現の減少に関する実験でのキメラ化の結果を示す。キメラ化は、所望の形質の表現型特性を示す個々の形質転換系において単離された個体の割合を示す目安となる。

【図２】ＴＬＣ分離後に可視化したダイズの全糖を示す。各レーンの最低バンドはラフィノース糖およびスタキオース糖である。「Ｌｏｗ　４」のレーンは、ラフィノース／スタキオース糖のレベルが極めて低いことが知られているダイズ系から単離したものである。２つの「ＧＡＳ－ＥＬ」系はいずれも周囲の系で見られるよりもラフィノース／スタキオースのレベルが低いことから、ＥＬ構築物に含まれるＧＡＳ１／ＧＡＳ２断片が、これらの系でガラクチノール合成酵素の活性を抑制していることが分かる。

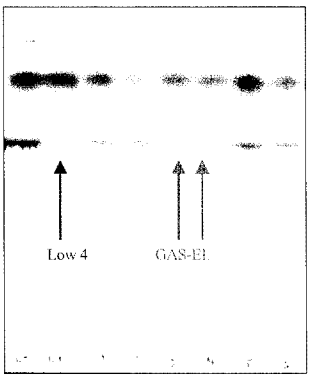
【図１】

図１
CRC系の方がアンチセンスまたは「伝統的な」コサプレッションよりもキメラ化を示す度合いが低い



【図２】

図２



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00904 A2

(51) International Patent Classification[7]: C12N 15/82

(21) International Application Number: PCT/US01/19962

(22) International Filing Date: 22 June 2001 (22.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/213,961 23 June 2000 (23.06.2000) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY** [US/US]; 1007 Market Street, Wilmington, DE 19898 (US). **PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.** [US/US]; 800 Capital Square, 400 Locust Street, Des Moines, IA 50309 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GLASSMAN, Kimberly, F.** [US/US]; 1202 NW Campos Drive, Ankeny, IA 50021 (US). **GORDON-KAMM, William, J.** [US/US]; 3916 67th Street, Urbandale, IA 50322 (US). **KINNEY, Anthony, J.** [GB/US]; 609 Lore Avenue, Wilmington, DE 19809 (US). **LOWE, Keith** [US/US]; 6407 Harbor Oaks Drive, Johnston, IA 50121 (US). **STECCA, Kevin, L.** [US/US]; 808 N. Gwynn Court, Bear, DE 19701 (US). **NICHOLS, Scott, E.** [US/US]; 6799 Ceres Circle, Johnston, IA 50131 (US).

(74) Agent: **CHRISTENBURY, Lynne, M.**; E.I. du Pont de Nemours and Company, Legal Patent Records Center, 1007 Market Street, Wilmington, DE 19898 (US).

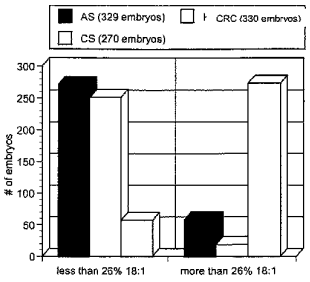
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European

[Continued on next page]

(54) **Title:** RECOMBINANT CONSTRUCTS AND THEIR USE IN REDUCING GENE EXPRESSION

CRC Lines Exhibit Less Chimerism Than Antisense or "Classical" Co-suppression



(57) **Abstract:** Recombinant constructs useful for reducing the expression of endogenous mRNA and any substantially similar endogenous mRNA are disclosed. In particular, a recombinant construct comprising, inter alia, a suitable nucleic acid sequence and its reverse complement can be used to alter the expression of any homologous, endogenous RNA (i.e., the target RNA) which is in proximity to this suitable nucleic acid sequence.

WO 02/00904 A2

WO 02/00904 A2

patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

TITLE

RECOMBINANT CONSTRUCTS AND THEIR USE IN REDUCING GENE EXPRESSION

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to reducing gene expression and, in particular, to recombinant constructs useful for reducing the expression of endogenous mRNA and any substantially similar endogenous mRNA.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Plant development is a complex physiological and biochemical process requiring the coordinated expression of many genes. The production of new plant varieties with improved nutritional or disease-resistant traits can be achieved by modifying this coordinated pattern of gene expression. Recombinant DNA techniques have made it possible to alter the expression patterns of individual, specific plant genes without directly affecting the expression of other plant genes. In this way, the expression pattern of an individual gene can be either enhanced or diminished in the whole plant, in specific tissues, or in developmental stages. Thus, it is now routine to construct transgenes with defined promoters and terminators and express them in a variety of organisms.

However, there are some reports in the literature that some introduced transgenes do not have the expected expression patterns. These unexpected expression patterns are seen in organisms as diverse as nematodes and plants. For example, some plants receiving transgenic copies of an endogenous gene under the control of a strong promoter, sometimes fail to accumulate mRNA for that gene. Furthermore, all mRNA from endogenous genes having sequence homology to the transgene also fail to accumulate mRNA, effectively eliminating the expression of the endogenous gene product. This was discovered originally when chalcone synthase transgenes in petunia caused suppression of the endogenous chalcone synthase genes (Napoli et al (1990) *Plant Cell 2:279-289*).

The phenomenon was referred to as "cosuppression" since expression of both the endogenous gene and the introduced transgene were suppressed (for reviews see Vaucheret et al (1998) *Plant J* 16:651-659; and Gura (2000) *Nature* 404:804-808). Cosuppression technology constitutes the subject matter of U.S. Patent No. 5,231,020 which issued to Jorgensen et al on July 27, 1999. Cosuppression is also referred to as "gene silencing" or post-transcriptional gene silencing (PTGS) by plant biologists, "RNA interference" by those studying worms and flies (Montgomery and Fire (1998) *TIG* 14:255-258; Fire et al (1998) *Nature* 391:806-811; Hammond et al (2000) *Nature* 404:293-296; and PCT Application No. WO 99/32619 published July 1, 1999), and "quelling" by researchers working with fungi (Romano and Macino (1992) *Mol Microbiol* 6:3343-3353).

The mechanisms by which the expression of a specific gene is inhibited by either antisense or sense RNA genes are not clearly understood and the frequencies of obtaining the

desired down regulation in a transgenic plant are generally low and vary with the gene, the strength of its promoter and specificity, the method of transformation, and the complexity of transgene insertion events. (Grant (1999) *Cell* 96:303-306; and Selker (1999) *Cell* 97:157-160.)

The speculation is that PTGS is an ancient self-defense mechanism evolved to combat infection by viruses and transposons. It appears that this pathogen-derived resistance is triggered by the presence in the host's cells of double-stranded RNA (dsRNA) or some other aberrant nucleic acid, which are indicative of a viral assault. Normally, the RNA moving freely around a cell should be single-stranded messenger RNA (mRNA) which is the intermediate between host genes and the proteins they encode. When the aberrant RNA invades then any mRNAs matching the invading nucleic acid's sequence are shut down. If the trigger is homologous to part of the host's genetic sequence, then both the host and viral genes are silenced (Baulcombe (1996) *Plant Cell* 8:1833-1844). WO 99/15682 which published on April 1, 1999 and WO 98/36083 which published on August 20, 1998 describe gene silencing materials and methods. These publications describe, *inter alia*, the silencing of plant genomic gene expression by introducing expression constructs containing plant viral nucleic acid sequences coupled to whole, or partial, gene sequences homologous to the target genes to be silenced.

WO 99/53050, which published on October 21, 1999, describes chimeric constructs encoding RNA molecules directed towards a target nucleic acid which are comprised of sense and antisense sequences, such that the expressed RNA is capable of forming an intramolecular double-stranded RNA structure. The expression of these RNA in transgenic organisms results in gene silencing of the all homologous target nucleic acid sequences within the cell.

U.S. Patent No. 5,942,657, issued to Bird et al on August 25, 1999, and WO 93/23551, which published on November 25, 1993, describe coordinated inhibition of plant gene expression in which two or more genes are inhibited by introducing a single control gene having distinct DNA regions homologous to each of the target genes and a promoter operable in plants adapted to transcribe from such distinct regions RNA that inhibits expression of each of the target genes.

The present invention describes the use of suitable DNA sequences or RNA sequences derived therefrom, as is discussed below, in ways which here-to-fore have not been previously described. These sequences, and their reverse complements, can be used to reduce the expression of any endogenous genomic sequence that shares substantial similarity to nucleic acid fragment which is in proximity to the DNA sequence or RNA sequence derived therefrom. The details of this phenomenon are described herein.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention concerns a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are in proximity to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a second embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,

(b) an RNA region unrelated to any endogenous RNA in the host and located 5' to (a), and

(c) the reverse complement of the RNA in (b) located 3' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a third embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located 5' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a fourth embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located 3' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a fifth embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located within (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In another aspect of any of the foregoing recombinant constructs, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host comprise a synthetic, non-naturally occurring RNA sequence.

In still another aspect of any of the foregoing recombinant constructs, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host do not comprise plant viral RNA.

In a sixth embodiment, this invention concerns a method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) transforming a host with any of the above -described recombinant constructs; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a seventh, embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are in proximity to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In an eighth embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) an RNA region unrelated to any endogenous RNA in the host and located 5' to (a), and

(c) the reverse complement of the RNA in (b) located 3' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a ninth embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located 5' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a tenth embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located 3' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In an eleventh embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located within (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In another aspect of any of the foregoing RNAs, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host comprise a synthetic, non-naturally occurring RNA sequence.

In still another aspect of any of the foregoing recombinant constructs, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host do not comprise plant viral RNA.

In a twelfth embodiment, this invention concerns a method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host any of the above-described RNAs; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a thirteenth embodiment this invention concerns, a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and said regions are in proximity to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a fourteenth embodiment this invention concerns, a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,

(b) an RNA region encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and located 5' to (a), and

(c) the reverse complement of the nucleic acid in (b) located 3' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a fifteenth embodiment this invention concerns, a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which regions are located 5' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a sixteenth embodiment this invention concerns, a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which regions are located 3' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a seventeenth embodiment this invention concerns, a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which regions are located within (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In another aspect of any of the foregoing recombinant constructs, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host comprise a synthetic, non-naturally occurring RNA sequence.

In still another aspect of any of the foregoing recombinant constructs, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host do not comprise plant viral RNA.

In an eighteenth embodiment this invention concerns, a method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) transforming a host with any of the above-described recombinant constructs; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a nineteenth embodiment this invention concerns an RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and which regions are in proximity to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a twentieth embodiment this invention concerns an RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) an RNA region encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and is located 5' to (a), and

(c) the reverse complement of the RNA in (b) located 3' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a twenty-first embodiment this invention concerns an RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and which regions are located 5' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a twenty-second embodiment this invention concerns an RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which regions are located 3' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a twenty-third embodiment this invention concerns an RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which are located within (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In another aspect of any of the foregoing RNAs, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host comprise a synthetic, non-naturally occurring RNA sequence.

In still another aspect of any of the foregoing recombinant constructs, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host do not comprise plant viral RNA.

In a twenty-fourth embodiment this invention concerns a method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host any of the above-described RNAs; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In a twenty-fifth embodiment, this invention concerns a method for identifying or screening an essential plant gene which comprises:

(a) transforming a plant cell with a recombinant construct comprising a constitutive promoter wherein said construct is capable of reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency;

(b) quantifying all transformed plant cells from step (a);

(c) quantifying all transformed plant cells from a control which does not reduce expression of an essential plant gene; and

(d) comparing the quantification of transformed plant cells selected from step (b) with the quantification of transformed plants cells selected from step (c) wherein the quantification of transformed plants cells selected from step (c) should substantially exceed the quantification of transformed plant cells selected from step (b).

In a twenty-sixth embodiment, this invention concerns a method for identifying or screening an essential plant gene which comprises:

(a) transforming a plant cell with any of the recombinant constructs of the invention comprising a promoter operably linked to a DNA sequence and which further comprises a constitutive promoter which is capable of reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency;

(b) quantifying all transformed plant cells from step (a);

(c) quantifying all transformed plant cells from a control which does not reduce expression of an essential plant gene; and

(d) comparing the quantification of transformed plant cells selected from step (b) with the quantification of transformed plants cells selected from step (c) wherein the quantification of transformed plants cells selected from step (c) should substantially exceed the quantification of transformed plant cells selected from step (b).

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING AND SEQUENCE LISTINGS

The invention can be more fully understood from the following detailed description and the accompanying drawings and Sequence Listing which form a part of this application.

Figure 1 depicts the results of chimerism in experiments on antisense, "classical co-suppression", and complementary region reduction of expression for the soybean gene Fad2, a fatty acid desaturase. Chimerism is a measure of the percentage of individuals isolated in individual transformed lines that exhibit the phenotype characteristic of the desired trait.

Figure 2 shows total soybean sugars visualized after TLC separation. The raffinose and stachyose sugars are the lowest band in each lane. The "Low 4" lane is isolated from a soybean line known to have very low levels of raffinose/stachyose sugars. The two "GAS-EL" lines both have lower levels of raffinose/stachyose than are found in the surrounding lines indicating that the GAS1/GAS2 fragments contained within the EL construct are suppressing galactinol synthase activity in these lines.

The attached Sequence Listing (SEQ ID NOs:1-35) describe oligonucleotide sequences used in the design of various plasmids described herein, or the sequence of the complementary regions found in some of the plasmids.

SEQ ID NO:1 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a polymerase chain reaction (PCR) amplification of the soybean Fad2-1 gene for insertion into plasmid pKS67 to produce plasmid pKS91.

SEQ ID NO:2 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for insertion into plasmid pKS67 to produce plasmid pKS91.

SEQ ID NO:3 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for insertion into plasmid pKS67 to produce plasmid pKS91.

SEQ ID NO:4 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for insertion into plasmid pKS67 to produce plasmid pKS91.

SEQ ID NO:5 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for insertion into plasmid pKS67 to produce plasmid pKS91.

SEQ ID NO:6 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for insertion into plasmid pKS67 to produce plasmid pKS91.

SEQ ID NO:7 is a linker oligonucleotide used to insert various restriction enzyme sites into the plasmid pKS17 to form the plasmid pKS102.

SEQ ID NO:8 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Cer3 gene for insertion into plasmid pKS67 to form plasmid pKS100.

SEQ ID NO:9 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Cer3 gene for insertion into plasmid pKS67 to form plasmid pKS100.

SEQ ID NO:10 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Cer3 gene for insertion into plasmid pKS67 to form plasmid pKS100.

SEQ ID NO:11 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Cer3 gene for insertion into plasmid pKS67 to form plasmid pKS100.

SEQ ID NO:12 represents the 1X complementary repeat designated ELVISLIVES found in plasmids pKS106 and pKS124.

SEQ ID NO:13 represents the 2X complementary repeat designated ELVISLIVES found in plasmids pKS133.

SEQ ID NO:14 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the ELVISLIVES complementary region.

SEQ ID NO:15 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the ELVISLIVES complementary region.

SEQ ID NO:16 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene to produce the 599 nucleotide fragment inserted into plasmid pKS106 to produce the plasmid pKS111.

SEQ ID NO:17 is the sequence of an oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene to produce the 599 nucleotide fragment inserted into plasmid pKS106 to produce the plasmid pKS111.

SEQ ID NO:18 is the sequence of the common 5' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for use in testing size requirements for target sequences.

SEQ ID NO:19 is the sequence of a 3' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for production of the 25 bp fragment.

SEQ ID NO:20 is the sequence of a 3' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for production of the 75 bp fragment.

SEQ ID NO:21 is the sequence of a 3' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for production of the 150 bp fragment.

SEQ ID NO:22 is the sequence of a 3' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for production of the 300 bp fragment.

SEQ ID NO:23 is the sequence of a 3' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for production of the 600 bp fragment.

SEQ ID NO:24 represents the 2X ELVISLIVES complementary repeat region from pBS68 which contains 2X ELVISLIVES complementary regions surrounding the 599 nucleotide Fad2-1 NotI fragment from pKS111 and a 969 nucleotide fragment from a soybean delta-9 desaturase.

SEQ ID NO:25 is the sequence of a 5' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the Lea promoter.

SEQ ID NO:26 is the sequence of a 3' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the Lea promoter.

SEQ ID NO:27 is the sequence of a 5' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the phaseolin 3'-end.

SEQ ID NO:28 is the sequence of a 3' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the phaseolin 3'-end.

SEQ ID NO:29 represents the 2X ELVISLIVES complementary repeat region from pKS149 that contains fragments from two soybean galactinol synthase genes GAS1 and GAS2 (411 and 435 nucleotides, respectively). The region is functionally attached to a late-soybean-embryo promoter (LEA) and a phaseolin 3' terminator region. This entire region is then cloned into the BamHI site of pKS136, which contains a 2X ELVISLIVES complementary repeat region controlled by a soybean Kti promoter and terminator region.

SEQ ID NO:30 represents the DNA sequence of the soybean galactinol synthase gene GAS1.

SEQ ID NO:31 represents the putative translation product DNA sequence of SEQ ID NO:30 the soybean galactinol synthase gene GAS1.

SEQ ID NO:32 represents the DNA sequence of the soybean galactinol synthase gene GAS2.

SEQ ID NO:33 represents the putative translation product DNA sequence of SEQ ID NO:32 the soybean galactinol synthase gene GAS2.

SEQ ID NO:34 represents the complementary region SHH3 from plasmid PHP17962, used in the construction of plasmid PHP17894 containing the phytoene desaturase fragment. The complementary regions are from 8-212 and 305-509, respectively. Restriction endonuclease sites for EcoRV, KpnI, KspI, SphI, and NcoI can be used as cloning sites between the complementary regions.

SEQ ID NO:35 represents the DNA sequence of the soybean acetolactate synthase (ALS) gene.

SEQ ID NO:36 is the sequence of a 3' oligonucleotide primer used in a PCR amplification of the soybean Fad2-1 gene for production of the 50 bp fragment.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In the context of this disclosure, a number of terms shall be utilized.

The term "host" refers to any organism, or cell thereof, whether human or non-human into which a recombinant construct can be stably or transiently introduced in order to reduce gene expression.

As used herein, an "isolated nucleic acid fragment" is a polymer of RNA or DNA that is single- or double-stranded, optionally containing synthetic, non-natural or altered nucleotide bases. An isolated nucleic acid fragment in the form of a polymer of DNA may be comprised of one or more segments of cDNA, genomic DNA or synthetic DNA. Nucleotides (usually found in their 5'-monophosphate form) are referred to by their single letter designation as follows: "A" for adenylate or deoxyadenylate (for RNA or DNA, respectively), "C" for cytidylate or deoxycytidylate, "G" for guanylate or deoxyguanylate, "U" for uridylate, "T" for deoxythymidylate, "R" for purines (A or G), "Y" for pyrimidines (C or T), "K" for g or T, "H" for A or C or T, "I" for inosine, and "N" for any nucleotide.

The terms "subfragment that is functionally equivalent" and "functionally equivalent subfragment" are used interchangeably herein. These terms refer to a portion or subsequence of an isolated nucleic acid fragment in which the ability to alter gene expression or produce a certain phenotype is retained whether or not the fragment or subfragment encodes an active enzyme. For example, the fragment or subfragment can be used in the design of chimeric genes to produce the desired phenotype in a transformed plant. Chimeric genes can be designed for use in co-suppression or antisense by linking a nucleic acid fragment or subfragment thereof, whether or not it encodes an active enzyme, in the appropriate orientation relative to a plant promoter sequence.

The terms "homology", "homologous", "substantially similar" and " corresponding substantially" are used interchangeably herein. They refer to nucleic acid fragments wherein

changes in one or more nucleotide bases does not affect the ability of the nucleic acid fragment to mediate gene expression or produce a certain phenotype. These terms also refer to modifications of the nucleic acid fragments of the instant invention such as deletion or insertion of one or more nucleotides that do not substantially alter the functional properties of the resulting nucleic acid fragment relative to the initial, unmodified fragment. It is therefore understood, as those skilled in the art will appreciate, that the invention encompasses more than the specific exemplary sequences.

Moreover, the skilled artisan recognizes that substantially similar nucleic acid sequences encompassed by this invention are also defined by their ability to hybridize, under moderately stringent conditions (for example, 0.5 X SSC, 0.1% SDS, 60°C) with the sequences exemplified herein, or to any portion of the nucleotide sequences reported herein and which are functionally equivalent to the promoter of the invention. Stringency conditions can be adjusted to screen for moderately similar fragments, such as homologous sequences from distantly related organisms, to highly similar fragments, such as genes that duplicate functional enzymes from closely related organisms. Post-hybridization washes determine stringency conditions. One set of preferred conditions involves a series of washes starting with 6X SSC, 0.5% SDS at room temperature for 15 min, then repeated with 2X SSC, 0.5% SDS at 45°C for 30 min, and then repeated twice with 0.2X SSC, 0.5% SDS at 50°C for 30 min. A more preferred set of stringent conditions involves the use of higher temperatures in which the washes are identical to those above except for the temperature of the final two 30 min washes in 0.2X SSC, 0.5% SDS was increased to 60°C. Another preferred set of highly stringent conditions involves the use of two final washes in 0.1X SSC, 0.1% SDS at 65°C.

With respect to the degree of substantial similarity between the target (endogenous) mRNA and the RNA region in the construct having homology to the target mRNA, such sequences should be at least 25 nucleotides in length, preferably at least 50 nucleotides in length, more preferably at least 100 nucleotides in length, again more preferably at least 200 nucleotides in length, and most preferably at least 300 nucleotides in length; and should be at least 80% identical, preferably at least 85% identical, more preferably at least 90% identical, and most preferably at least 95% identical.

Sequence alignments and percent similarity calculations may be determined using a variety of comparison methods designed to detect homologous sequences including, but not limited to, the Megalign program of the LASARGENE bioinformatics computing suite (DNASTAR Inc., Madison, WI). Multiple alignment of the sequences are performed using the Clustal method of alignment (Higgins and Sharp (1989) *CABIOS. 5*:151-153) with the default parameters (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10). Default parameters for pairwise alignments and calculation of percent identity of protein sequences using the Clustal method are KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 and

DIAGONALS SAVED=5. For nucleic acids these parameters are KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 and DIAGONALS SAVED=4.

"Gene" refers to a nucleic acid fragment that expresses a specific protein, including regulatory sequences preceding (5' non-coding sequences) and following (3' non-coding sequences) the coding sequence. "Native gene" refers to a gene as found in nature with its own regulatory sequences. "Chimeric gene" refers any gene that is not a native gene, comprising regulatory and coding sequences that are not found together in nature. Accordingly, a chimeric gene may comprise regulatory sequences and coding sequences that are derived from different sources, or regulatory sequences and coding sequences derived from the same source, but arranged in a manner different than that found in nature. A "foreign" gene refers to a gene not normally found in the host organism, but that is introduced into the host organism by gene transfer. Foreign genes can comprise native genes inserted into a non-native organism, or chimeric genes. A "transgene" is a gene that has been introduced into the genome by a transformation procedure.

The term "essential plant genes" as used herein refers to genes encoding a product that is required for normal plant growth, development, and/or viability. In addition to ALS, examples of essential plant genes would include, but not be limited to, rate-limiting enzymes in amino acid, nucleic acid, or lipid biosynthesis. It is also believed that many genes with unknown function may be essential. Suppression of essential plant genes by chemical or genetic means will result in altered growth and/or development. If an essential gene is unique in the genome of the plant, suppression may lead to plant death, which is the basis of many plant herbicides.

"Coding sequence" refers to a DNA sequence that codes for a specific amino acid sequence. "Regulatory sequences" refer to nucleotide sequences located upstream (5' non-coding sequences), within, or downstream (3' non-coding sequences) of a coding sequence, and which influence the transcription, RNA processing or stability, or translation of the associated coding sequence. Regulatory sequences may include, but are not limited to, promoters, translation leader sequences, introns, and polyadenylation recognition sequences.

"Promoter" refers to a DNA sequence capable of controlling the expression of a coding sequence or functional RNA. The promoter sequence consists of proximal and more distal upstream elements, the latter elements often referred to as enhancers. Accordingly, an "enhancer" is a DNA sequence which can stimulate promoter activity and may be an innate element of the promoter or a heterologous element inserted to enhance the level or tissue-specificity of a promoter. Promoters may be derived in their entirety from a native gene, or be composed of different elements derived from different promoters found in nature, or even comprise synthetic DNA segments. It is understood by those skilled in the art that different promoters may direct the expression of a gene in different tissues or cell types, or at different stages of development, or in response to different environmental conditions.

Promoters which cause a gene to be expressed in most cell types at most times are commonly referred to as "constitutive promoters". New promoters of various types useful in plant cells are constantly being discovered; numerous examples may be found in the compilation by Okamuro and Goldberg, (1989) *Biochemistry of Plants 15*:1-82. It is further recognized that since in most cases the exact boundaries of regulatory sequences have not been completely defined, DNA fragments of some variation may have identical promoter activity.

An "intron" is an intervening sequence in a gene that does not encode a portion of the protein sequence. Thus, such sequences are transcribed into RNA but are then excised and are not translated. The term is also used for the excised RNA sequences. An "exon" is a portion of the sequence of a gene that is transcribed and is found in the mature messenger RNA derived from the gene, but is not necessarily a part of the sequence that encodes the final gene product.

The "translation leader sequence" refers to a DNA sequence located between the promoter sequence of a gene and the coding sequence. The translation leader sequence is present in the fully processed mRNA upstream of the translation start sequence. The translation leader sequence may affect processing of the primary transcript to mRNA, mRNA stability or translation efficiency. Examples of translation leader sequences have been described (Turner, R. and Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology 3*:225).

The "3' non-coding sequences" refer to DNA sequences located downstream of a coding sequence and include polyadenylation recognition sequences and other sequences encoding regulatory signals capable of affecting mRNA processing or gene expression. The polyadenylation signal is usually characterized by affecting the addition of polyadenylic acid tracts to the 3' end of the mRNA precursor. The use of different 3' non-coding sequences is exemplified by Ingelbrecht et al, (1989) *Plant Cell 1*:671-680.

"RNA transcript" refers to the product resulting from RNA polymerase-catalyzed transcription of a DNA sequence. When the RNA transcript is a perfect complementary copy of the DNA sequence, it is referred to as the primary transcript or it may be a RNA sequence derived from post-transcriptional processing of the primary transcript and is referred to as the mature RNA. "Messenger RNA (mRNA)" refers to the RNA that is without introns and that can be translated into protein by the cell. "cDNA" refers to a DNA that is complementary to and synthesized from a mRNA template using the enzyme reverse transcriptase. The cDNA can be single-stranded or converted into the double-stranded form using the Klenow fragment of DNA polymerase I. "Sense" RNA refers to RNA transcript that includes the mRNA and can be translated into protein within a cell or *in vitro*. "Antisense RNA" refers to an RNA transcript that is complementary to all or part of a target primary transcript or mRNA and that blocks the expression of a target gene (U.S. Patent No. 5,107,065). The complementarity of an antisense RNA may be with any part of the

specific gene transcript, i.e., at the 5' non-coding sequence, 3' non-coding sequence, introns, or the coding sequence. "Functional RNA" refers to antisense RNA, ribozyme RNA, or other RNA that may not be translated but yet has an effect on cellular processes. The terms "complement" and "reverse complement" are used interchangeably herein with respect to mRNA transcripts, and are meant to define the antisense RNA of the message.

The term "target mRNA" refers to any mRNA whose expression in the host is to be reduced.

The term "endogenous RNA" refers to any RNA which is encoded by any nucleic acid sequence present in the genome of the host prior to transformation with the recombinant construct of the present invention, whether naturally-occurring or non-naturally occurring, i.e., introduced by recombinant means, mutagenesis, etc.

The term "non-naturally occurring" means artificial, not consistent with what is normally found in nature.

The term "operably linked" refers to the association of nucleic acid sequences on a single nucleic acid fragment so that the function of one is regulated by the other. For example, a promoter is operably linked with a coding sequence when it is capable of regulating the expression of that coding sequence (i.e., that the coding sequence is under the transcriptional control of the promoter). Coding sequences can be operably linked to regulatory sequences in a sense or antisense orientation. In another example, the complementary RNA regions of the invention can be operably linked, either directly or indirectly, 5' to the target mRNA, or 3' to the target mRNA, or within the target mRNA, or a first complementary region is 5' and its complement is 3' to the target mRNA.

The term "expression", as used herein, refers to the production of a functional end-product. Expression of a gene involves transcription of the gene and translation of the mRNA into a precursor or mature protein. "Antisense inhibition" refers to the production of antisense RNA transcripts capable of suppressing the expression of the target protein. "Co-suppression" refers to the production of sense RNA transcripts capable of suppressing the expression of identical or substantially similar foreign or endogenous genes (U.S. Patent No. 5,231,020).

"Mature" protein refers to a post-translationally processed polypeptide; i.e., one from which any pre- or propeptides present in the primary translation product have been removed. "Precursor" protein refers to the primary product of translation of mRNA; i.e., with pre- and propeptides still present. Pre- and propeptides may be but are not limited to intracellular localization signals.

"Stable transformation" refers to the transfer of a nucleic acid fragment into a genome of a host organism, including both nuclear and organellar genomes, resulting in genetically stable inheritance. In contrast, "transient transformation" refers to the transfer of a nucleic acid fragment into the nucleus, or DNA-containing organelle, of a host organism

resulting in gene expression without integration or stable inheritance. Host organisms containing the transformed nucleic acid fragments are referred to as "transgenic" organisms. The preferred method of cell transformation of rice, corn and other monocots is the use of particle-accelerated or "gene gun" transformation technology (Klein et al, (1987) *Nature (London) 327*:70-73; U.S. Patent No. 4,945,050), or an Agrobacterium-mediated method using an appropriate Ti plasmid containing the transgene (Ishida Y. et al, 1996, Nature Biotech. 14:745-750).

Standard recombinant DNA and molecular cloning techniques used herein are well known in the art and are described more fully in Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (hereinafter "Sambrook").

The term "recombinant" refers to an artificial combination of two otherwise separated segments of sequence, e.g., by chemical synthesis or by the manipulation of isolated segments of nucleic acids by genetic engineering techniques.

"PCR" or "Polymerase Chain Reaction" is a technique for the synthesis of large quantities of specific DNA segments, consists of a series of repetitive cycles (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Typically, the double stranded DNA is heat denatured, the two primers complementary to the 3' boundaries of the target segment are annealed at low temperature and then extended at an intermediate temperature. One set of these three consecutive steps is referred to as a cycle.

The terms "recombinant construct", "expression construct" and "recombinant expression construct" are used interchangeably herein. Such construct may be itself or may be used in conjunction with a vector. If a vector is used then the choice of vector is dependent upon the method that will be used to transform host plants as is well known to those skilled in the art. For example, a plasmid vector can be used. The skilled artisan is well aware of the genetic elements that must be present on the vector in order to successfully transform, select and propagate host cells comprising any of the isolated nucleic acid fragments of the invention. The skilled artisan will also recognize that different independent transformation events will result in different levels and patterns of expression (Jones et al, (1985) *EMBO J.* 4:2411-2418; De Almeida et al, (1989) *Mol. Gen. Genetics* 218:78-86), and thus that multiple events must be screened in order to obtain lines displaying the desired expression level and pattern. Such screening may be accomplished by Southern analysis of DNA, Northern analysis of mRNA expression, Western analysis of protein expression, or phenotypic analysis.

Co-suppression constructs in plants previously have been designed by focusing on overexpression of a nucleic acid sequence having homology to an endogenous mRNA, in the sense orientation, which results in the reduction of all RNA having homology to the overexpressed sequence (see Vaucheret et al (1998) *Plant J* 16:651-659; and Gura (2000)

Nature 404:804-808). The overall efficiency of this phenomenon is low, and the extent of the RNA reduction is widely variable. Recent work has described the use of "hairpin" structures that incorporate all, or part, of an mRNA encoding sequence in a complementary orientation that results in a potential "stem-loop" structure for the expressed RNA (PCT Publication WO 99/53050 published on October 21, 1999). This increases the frequency of co-suppression in the recovered transgenic plants. Another variation describes the use of plant viral sequences to direct the suppression, or "silencing", of proximal mRNA encoding sequences (PCT Publication WO 98/36083 published on August 20, 1998). Both of these co-suppressing phenomena have not been elucidated mechanistically, although recent genetic evidence has begun to unravel this complex situation (Elmayan et al (1998) *Plant Cell* 10:1747-1757).

Surprisingly and unexpectedly, it has been found that suitable nucleic acid sequences and their reverse complement can be used to alter the expression of any homologous, endogenous RNA (i.e., the target RNA) which is in proximity to the suitable nucleic acid sequence and its reverse complement. As is discussed below, the suitable nucleic acid sequence and its reverse complement can be either unrelated to any endogenous RNA in the host or can be encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that nucleic acid sequence does not encode any target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA.

Thus, the present invention presents a very efficient and robust approach to achieving single, or multiple, gene co-suppression using single plasmid transformation. As is discussed in greater detail below, the constructs are composed of promoters linked to mRNA(s) coding regions, or fragments thereof, that are targeted for suppression, and short complementary sequences that are unrelated to the targets. The complementary sequences can be oriented both 5', both 3', or on either side of the target sequence. The complementary sequences are preferred to be about 40-50 nucleotides in length, or more preferably 50-100 nucleotides in length, or most preferably at least or greater than 100-300 nucleotides. The complementary sequences are unrelated to the target, but can come from any other source. Preferred embodiments of these sequences include, but are not limited to, plant sequences, bacterial sequences, animal sequences, viral or phage sequences, or completely artificial, i.e. non-naturally occurring, sequences not known to occur in any organism (see "ELVISLIVES" below). All sequences can be compared to other known sequences, or each other, using any one of a number of sequence alignment programs as set forth below in Example 4.

The term "high degree of frequency" as used herein, with respect to the suppression efficiency, refers to the percentage of transformed lines that exhibit the target suppressed phenotype. High frequency percentages are expected to be in a range of at least 15-95% and any integer percentage found within the range. Preferred embodiments would include at least

15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, and 95%.

The present invention concerns a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are in proximity to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In another aspect the present invention concerns a recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and said regions are in proximity to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

Any promoter can be used to practice the invention. There can be mentioned a beta-conglycinin promoter, a Kunitz soybean Trypsin Inhibitor (KSTI or Kti) promoter, a Gly m Bd 28K promoter, T7 promoter, a 35S promoter and a beta-phaseolin promoter. The preferred promoter is that of the α'-subunit of beta-conglycinin (referred to herein as the beta-conglycinin promoter). Co-suppressed plants that contain recombinant expression constructs with the promoter of the α'-subunit of beta-conglycinin will often exhibit suppression of both the α and α' subunits of beta-congylcinin (as described in PCT Publication No. WO 97/47731, published on December 18, 1997, the disclosure of which is hereby incorporated by reference). Particularly preferred promoters are those that allow seed-specific expression. This may be especially useful since seeds are the primary source consumable protein and oil, and also since seed-specific expression will avoid any potential deleterious effect in non-seed tissues.

Examples of seed-specific promoters include, but are not limited to, the promoters of seed storage proteins, which can represent up to 90% of total seed protein in many plants. The seed storage proteins are strictly regulated, being expressed almost exclusively in seeds in a highly tissue-specific and stage-specific manner (Higgins et al, (1984) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:191-221; Goldberg et al, (1989) *Cell* 56:149-160). Moreover, different seed storage proteins may be expressed at different stages of seed development.

Expression of seed-specific genes has been studied in great detail (See reviews by Goldberg et al, (1989) *Cell* 56:149-160 and Higgins et al, (1984) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:191-221). There are currently numerous examples of seed-specific expression of seed storage protein genes in transgenic dicotyledonous plants. These include genes from dicotyledonous plants for bean β-phaseolin (Sengupta-Gopalan et al, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3320-3324; Hoffman et al, (1988) *Plant Mol. Biol.* 11: 717-729), bean lectin (Voelker et al, (1987) *EMBO J.* 6: 3571-3577), soybean lectin (Okamuro et al, (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8240-8244), soybean Kunitz trypsin inhibitor (Perez-Grau et al, (1989) *Plant Cell* 1: 095-1109), soybean b-conglycinin (Beachy et al, (1985) *EMBO J.* 4: 3047-3053; pea vicilin (Higgins et al, (1988) *Plant Mol. Biol.* 11:683-695), pea convicilin (Newbigin et al, (1990) *Planta* 180:461-470), pea legumin (Shirsat et al, (1989) *Mol. Gen. Genetics* 215:326-331); rapeseed napin (Radke et al, (1988) *Theor. Appl. Genet.* 75:685-694) as well as genes from monocotyledonous plants such as for maize 15 kD zein (Hoffman et al, (1987) *EMBO J.* 6:3213-3221), maize 18 kD oleosin (Lee at al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6181-6185), barley β-hordein (Marris et al, (1988) *Plant Mol. Biol.* 10:359-366) and wheat glutenin (Colot et al, (1987) *EMBO J.* 6:3559-3564). Moreover, promoters of seed-specific genes operably linked to heterologous coding sequences in chimeric gene constructs also maintain their temporal and spatial expression pattern in transgenic plants. Such examples include use of *Arabidopsis thaliana* 2S seed storage protein gene promoter to express enkephalin peptides in *Arabidopsis* and *Brassica napus* seeds (Vandekerckhove et al, (1989) *Bio/Technology* 7:929-932), bean lectin and bean β-phaseolin promoters to express luciferase (Riggs et al, (1989) *Plant Sci.* 63:47-57), and wheat glutenin promoters to express chloramphenicol acetyl transferase (Colot et al, (1987) *EMBO J.* 6:3559-3564).

As was noted above any type of promoter such as constitutive, tissue-preferred or inducible promoters can be used to practice the invention. Examples of constitutive promoters include the cauliflower mosaivirus (CaMV) 35S transcription initiation region, the 1'- or 2'- promoter derived from T-DNA of Agrobacterium tumefaciens, the ubiquitin 1 promoter, the Smas promoter, the cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter (U.S. Patent No. 5,683,439), the Nos promoter, the pEmu promoter, the rubisco promoter, the GRP1-8 promoter and other transcription initiation regions from various plant genes known to those of skill.

Examples of inducible promoters are the Adh1 promoter which is inducible by hypoxia or cold stress, the Hsp70 promoter which is inducible by heat stress, and the PPDK promoter which is inducible by light. Also useful are promoters that are chemically inducible.

Examples of promoters under developmental control include promoters that initiate transcription preferentially in certain tissues, such as leaves, roots, fruit, seeds, or flowers.

An exemplary promoter is the anther specific promoter 5126 (U.S. Patent Nos. 5,689,049 and 5,689,051). In addition to those mentioned above, other examples of seed-specific promoters include, but are not limited to, 27 kD gamma zein promoter and waxy promoter, Boronat, A., Martinez, M. C., Reina, M., Puigdomenech, P. and Palau, J.; Isolation and sequencing of a 28 kD glutelin-2 gene from maize: Common elements in the 5' flanking regions among zein and glutelin genes; *Plant Sci.* 47, 95-102 (1986) and Reina, M., Ponte, I., Guillen, P., Boronat, A. and Palau, J., Sequence analysis of a genomic clone encoding a Zc2 protein from Zea mays W64 A, *Nucleic Acids Res.* 18 (21), 6426 (1990). See the following site relating to the waxy promoter: Kloesgen, R. B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z. S. and Saedler, H., Molecular analysis of the waxy locus of Zea mays, *Mol. Gen. Genet.* 203, 237-244 (1986). Promoters that express in the embryo, pericarp, and endosperm are disclosed in PCT Application No. WO 00/11177 published March 2, 2000, and PCT Application No. WO 00/12733 published March 9, 2000. The disclosures each of these are incorporated herein by reference in their entirety.

Either heterologous or non-heterologous (i.e., endogenous) promoters can be used to practice the invention.

The promoter is then operably linked using conventional means well known to those skilled in the art to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA meeting certain criteria.

The host can be any organism, or cell thereof, into which the recombinant construct of this invention can be stably or transiently introduced in order to alter gene expression. Examples of suitable hosts include, but are not limited to, a plant, animal, protozoan, bacterium, virus or fungus. The plant may be a monocot, dicot or gymnosperm; the animal may be a vertebrate or invertebrate. Preferred microbes are those used in agriculture or by industry. Fungi include organisms in both the mold and yeast morphologies.

Plants include *Arabidopsis*; field crops (e.g., alfalfa, barley, bean, corn, cotton, flax, pea, rape, rice, rye, safflower, sorghum, soybean, sunflower, tobacco, and wheat); vegetable crops (e.g., asparagus, beet, broccoli, cabbage, carrot, cauliflower, celery, cucumber, eggplant, lettuce, onion, pepper, potato, pumpkin, radish, spinach, squash, taro, tomato, and zucchini); fruit and nut crops (e.g., almond, apple, apricot, banana, blackberry, blueberry, cacao, cherry, coconut, cranberry, date, fajoa, filbert, grape, grapefruit, guava, kiwi, lemon, lime, mango, melon, nectarine, orange, papaya, passion fruit, peach, peanut, pear, pineapple, pistachio, plum, raspberry, strawberry, tangerine, walnut, and watermelon); etc.

Examples of human or non-human vertebrate animals include mammals, fish, cattle, goat, pig, sheep, rodent, hamster, mouse, rat, guinea pigs, rabbits, and primate; invertebrate animals include nematodes, other worms, *Drosophila*, and other insects. Representative orders of insects include *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera*, and *Homoptera*.

The DNA sequence expressed by the host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host;

(b1) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are in proximity to the target mRNA, wherein the expressed RNA reduces the expression of the target RNA or any substantially similar endogenous mRNA, or

(b2) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and said regions are in proximity to (a).

The complementary RNA regions may comprise any of the following:

(a) any nucleic acid sequence not normally present in the genome of a host, i.e, are not related to any endogenous RNA in the host; or

(b) any nucleic acid sequence in the genome of the host which encodes the complementary regions provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA.

With respect to (a) any nucleic acid sequence not normally present in the genome of a host, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host may comprise a synthetic, non-naturally occurring RNA sequence. In still a further aspect, these RNA region or regions, optionally, may or may not comprise plant viral RNA.

With respect to (b) any nucleic acid sequence in the genome of the host which encodes the complementary regions provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, this sequence comprises transcribed or non-transcribed nucleic acid sequences which may be present in the genome of the host, i.e., this sequence may or may not be expressed by the host.

The complementary RNA regions described herein are in proximity to the target mRNA. The term "in proximity" means that the complementary regions are operably linked 5' to the target mRNA, or 3' to the target mRNA, or within the target mRNA, or 5' and 3' to the target mRNA, i.e., the complementary regions or sequences can be found on either end of the target mRNA.

The complementary RNA regions can be any size that is suitable for altering the expression of the target mRNA. The complementary sequences are preferred to be about 40-50 nucleotides in length, or more preferably 50-100 nucleotides in length, or most preferably greater than 100-300 nucleotides. These complementary sequences can be synthesized using conventional means well known to those skilled in the art.

Examples of suitable complementary RNA regions which can be used to practice the invention include, but are not limited to, SEQ ID NO:12 and 13, bacterial sequences, jellyfish sequences, or any artificial or naturally occurring sequences.

In another embodiment this invention concerns a method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host any of the recombinant constructs discussed herein, and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

Transformation methods are discussed above and are well known to those skilled in the art.

Selection of the host having the desired phenotype will depend upon the target mRNA whose expression is being altered. As was noted above, the target mRNA may be any mRNA whose expression in the host is to be altered. Typically, it should share homology with the RNA produced by the host transformed with a recombinant construct of the invention. The expression of more than one target mRNA may be reduced provided that these targets share homology with the RNA produced by the host transformed with a recombinant construct of the invention.

In still another embodiment, this invention concerns a recombinant construct comprising an RNA in lieu of a DNA sequence. Thus, this RNA comprises:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are in proximity to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In another aspect, this invention concerns a recombinant construct comprising an RNA in lieu of a DNA sequence in which the RNA comprises:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and which regions are in proximity to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

As was discussed above the complementary RNA regions may comprise any of the following:

(a) any nucleic acid sequence not normally present in the genome of a host, i.e, are not related to any endogenous RNA in the host; or

(b) any nucleic acid sequence in the genome of the host which encodes the complementary regions provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA.

With respect to (a) any nucleic acid sequence not normally present in the genome of a host, the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host

may comprise a synthetic, non-naturally occurring RNA sequence. In still a further aspect, these RNA region or regions, optionally, may or may not comprise plant viral RNA.

With respect to (b) any nucleic acid sequence in the genome of the host which encodes the complementary regions provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, this sequence comprises transcribed or non-transcribed nucleic acid sequences which may be present in the genome of the host.

The complementary RNA regions described herein are in proximity to the target mRNA. The term "in proximity" means that the complementary regions are operably linked 5' to the target mRNA, or 3' to the target mRNA, or within the target mRNAS, or 5' and 3' to the target mRNA, i.e., the complementary regions or sequences can be found on either end of the target mRNA.

In addition, these RNAs can be used in a method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host any of the RNAs described herein; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

In still a further aspect, the present invention concerns a method for identifying or screening an essential plant gene which comprises:

(a) transforming a plant cell with a recombinant construct comprising a constitutive promoter wherein said construct is capable of reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency;

(b) quantifying all transformed plant cells from step (a);

(c) quantifying all transformed plant cells from a control which does not reduce expression of an essential plant gene; and

(d) comparing the quantification of transformed plant cells selected from step (b) with the quantification of transformed plants cells selected from step (c) wherein the quantification of transformed plants cells selected from step (c) should substantially exceed the quantification of transformed plant cells selected from step (b).

Any essential plant gene can be identified or screened using the method of the invention. An important aspect of this method is the use of a constitutive promoter and a recombinant construct capable of reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency.

Essential plant genes are defined above.

Constitutive promoters are defined above. Preferably, the constitutive promoter is a high level or strong constitutive promoter wherein expression of the gene under the control of the promoter results in production of high levels of mRNA.

Any recombinant construct comprising a constitutive promoter which is capable of reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency can be used to practice the invention. In a preferred embodiment, the recombinant construct can be any of the recombinant constructs of the invention comprising a promoter operably linked to a DNA sequence provided that the promoter is a constitutive promoter. The term high degree of frequency is defined above.

Any plant cells can be transformed using standard transformation methods as described above.

The number of plant cells transformed with a recombinant construct comprising a constitutive promoter wherein the recombinant construct is designed to reduce expression of an essential plant gene is quantified and compared to the number of plant cells transformed using a control in which expression of the essential plant gene is not reduced. If the number of plant cells transformed with the control substantially exceeds the number of plant cells transformed with the recombinant construct designed to reduce expression of an essential plant gene, then an essential plant gene has been identified/screened. By "substantially exceeds", it is meant at least a five-fold difference and, preferably, a ten-fold difference. Also preferred would be a 4-fold, 6-fold, 7-fold, 8-fold, 9-fold, or greater than a 10-fold difference. Thus, the number of plant cells transformed with the control should be at least five-fold greater than the number of plant cells transformed with the recombinant construct designed to reduce expression of an essential plant gene.

EXAMPLES

The present invention is further defined in the following Examples, in which all parts and percentages are by weight and degrees are Celsius, unless otherwise stated. It should be understood that these Examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only. From the above discussion and these Examples, one skilled in the art can ascertain the essential characteristics of this invention, and without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions. The disclosures contained within the references used herein are hereby incorporated by reference.

EXAMPLE 1

Transformation Of Somatic Soybean Embryo Cultures

Generic stable soybean transformation protocol:

Soybean embryogenic suspension cultures are maintained in 35 ml liquid media (SB55 or SBP6) on a rotary shaker, 150 rpm, at 28°C with mixed fluorescent and incandescent lights on a 16:8 h day/night schedule. Cultures are subcultured every four weeks by inoculating approximately 35 mg of tissue into 35 ml of liquid medium.

TABLE 1

Stock Solutions (g/L):	
MS Sulfate 100X Stock	
$MgSO_4$ $7H_2O$	37.0
$MnSO_4$ H_2O	1.69
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0.86
$CuSO_4$ $5H_2O$	0.0025
MS Halides 100X Stock	
$CaCl_2$ $2H_2O$	44.0
KI	0.083
$CoCl_2$ $6H_20$	0.00125
KH_2PO_4	17.0
H_3BO_3	0.62
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0.025
MS FeEDTA 100X Stock	
Na_2EDTA	3.724
$FeSO_4$ $7H_2O$	2.784
B5 Vitamin Stock	
10 g m-inositol	
100 mg nicotinic acid	
100 mg pyridoxine HCl	
1 g thiamine	

SB55 (per Liter, pH 5.7)
10 ml each MS stocks
1 ml B5 Vitamin stock
0.8 g NH_4NO_3
3.033 g KNO_3
1 ml 2,4-D (10mg/mL stock)
60 g sucrose
0.667 g asparagine
SBP6
same as SB55 except 0.5 ml 2,4-D
SB103 (per Liter, pH 5.7)
1X MS Salts
6% maltose
750 mg $MgCl_2$
0.2% Gelrite
SB71-1 (per Liter, pH 5.7)
1X B5 salts
1 ml B5 vitamin stock
3% sucrose
750 mg $MgCl_2$
0.2% Gelrite

Soybean embryogenic suspension cultures are transformed with pTC3 by the method of particle gun bombardment (Klein et al (1987) *Nature* 327:70). A DuPont Biolistic PDS1000/HE instrument (helium retrofit) is used for these transformations.

To 50 ml of a 60 mg/ml 1 μm gold particle suspension is added (in order); 5 μl DNA(1 μg/μl), 20 μl spermidine (0.1 M), and 50 μl $CaCl_2$ (2.5 M). The particle preparation is agitated for 3 min, spun in a microfuge for 10 sec and the supernatant removed. The DNA-coated particles are then washed once in 400 μl 70% ethanol and re suspended in 40 μl of anhydrous ethanol. The DNA/particle suspension is sonicated three times for 1 sec each. Five μl of the DNA-coated gold particles are then loaded on each macro carrier disk. For selection, a plasmid conferring resistance to hygromycin phosphotransferase (HPT) may be co-bombarded with the silencing construct of interest.

Approximately 300-400 mg of a four week old suspension culture is placed in an empty 60x15 mm petri dish and the residual liquid removed from the tissue with a pipette. For each transformation experiment, approximately 5-10 plates of tissue are normally bombarded. Membrane rupture pressure is set at 1000 psi and the chamber is evacuated to a

vacuum of 28 inches of mercury. The tissue is placed approximately 3.5 inches away from the retaining screen and bombarded three times. Following bombardment, the tissue is placed back into liquid and cultured as described above.

Eleven days post bombardment, the liquid media is exchanged with fresh SB55 containing 50 mg/ml hygromycin. The selective media is refreshed weekly. Seven weeks post bombardment, green, transformed tissue is observed growing from untransformed, necrotic embryogenic clusters. Isolated green tissue is removed and inoculated into individual flasks to generate new, clonally propagated, transformed embryogenic suspension cultures. Thus each new line is treated as an independent transformation event. These suspensions can then be maintained as suspensions of embryos maintained in an immature developmental stage or regenerated into whole plants by maturation and germination of individual somatic embryos.

Independent lines of transformed embryogenic clusters are removed from liquid culture and placed on a solid agar media (SB103) containing no hormones or antibiotics. Embryos are cultured for four weeks at 26°C with mixed fluorescent and incandescent lights on a 16:8 h day/night schedule. During this period, individual embryos are removed from the clusters and screened for alterations in their fatty acid compositions (Example 3). Co-suppression of Fad2 results in a reduction of polyunsaturated fatty acids and an increase in oleic acid content.

It should be noted that any detectable phenotype, resulting from the co-suppression of a target gene, can be screened at this stage. This would include, but not be limited to, alterations in protein content, carbohydrate content, growth rate, viability, or the ability to develop normally into a soybean plant.

EXAMPLE 2

Transformation of Maize

Generic stable maize transformation protocol:

Transformation of plasmid DNA in Hi-II strains of maize follows the standard Hi-II bombardment transformation protocol (Songstad D. D. et al, (1996) *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 32:179-183). Cells are transformed by culturing maize immature embryos (approximately 1-1.5 mm in length) onto 560P medium containing N6 salts, Erikkson's vitamins, 0,69 g/l proline, 2 mg/l 2,4-D and 3% sucrose. After 4-5 days of incubation in the dark at 28°C, embryos are removed from 560P medium and cultured, scutellum up, onto 560Y medium which is equivalent to 560P but contains 12% sucrose. Embryos are allowed to acclimate to this medium for 3 h prior to transformation. The scutellar surface of the immature embryos is targeted using particle bombardment with either a mixture containing UBI:moPAT:pinII + UBI:GUS:pinII plasmids, or with a combination of these two plasmids plus any one of the constructs of the present invention (UBI is the ubiquitin-1 promoter, Christensen et al (1989) *Plant Mol Bio* 12:619-632; moPAT refers to a "monocot-optimized

phosphinothricin acyltransferase" gene conferring resistance to the herbicide glufosinate ammonium, referenced in PCT Application No. WO 98/30701 published on July 16, 1998; the pinII (proteinase inhibitor) terminator is described in An et al (1989) *Plant Cell 1*:115-122; and the GUS gene (beta-glucuronidase) is described in Jefferson et al (1986) *PNAS* 83:8447-8451). Embryos are transformed using the PDS-1000 Helium Gun from Bio-Rad at one shot per sample using 650PSI rupture disks. DNA delivered per shot averages about 0.1667 ug. An equal number of embryos per ear are bombarded with either the control DNA (PAT/GUS) or the mixture of control with any one of the constructs of the present invention. Following bombardment, all embryos are cultured and maintained on 560L medium (N6 salts, Eriksson's vitamins, 0.5 mg/l thiamine, 20 g/l sucrose, 1 mg/l 2,4-D, 2.88 g/l proline, 2.0 g/l gelrite, and 8.5 mg/l silver nitrate). After 2-7 days post-bombardment, all the embryos from both treatments are transferred onto N6-based medium containing 3 mg/l bialaphos Pioneer 560P medium described above, with no proline and with 3 mg/l bialaphos). Plates are maintained at 28°C in the dark and are observed for colony recovery with transfers to fresh medium occurring every two weeks.

Transient maize assays:

High type II callus is maintained by subculturing onto fresh 560P medium every two weeks. Healthy callus is pushed through a 0.77 mm^2 nylon mesh and resuspended in MS culture medium with 2 mg/l 2,4-D at a density of 3 grams of tissue/40 ml medium. The cell suspension are then pipetted in 4 ml aliquots (each containing approximately 300 mg of cells) onto glass filter papers for bombardment using a vacuum apparatus. These filters are then placed on 560P medium and cultured in the dark at 26°C. After 2-4 days the filters are removed from the culture medium and excess liquid is removed using a vacuum apparatus. Filters with cells are then shot (using the DuPont Biolistics PDS1000/He gun) according to established methods (see example above) using 1 μm gold particles and 650 psi rupture disks. Immediately after bombardment filters are returned to 560P culture medium and cultured in the dark at 26°C. All DNA's are adjusted to obtain a final concentration of 1 μg/total DNA/particle prep tube (6 shots). The typical experiment is shot as follows:

GUS DNA + control DNA + Luciferase DNA

GUS DNA+ silencing construct DNA + Luciferase DNA

Two days after bombardment cells are scraped from filters and protein is extracted, and enzyme activity is determined, using the luciferase assays outlined in the Dual-Luciferase Reporter Assay protocol (Promega Corp., Madison, WI). The same extract is also used to perform fluorometric GUS assays using the protocol of Rao and Flynn (1990) *Biotechniques* 8:38-40. Data presented in Example 8 below is plotted as the ratio of GUS/Luciferase units.

EXAMPLE 3

The Phenotype of Transgenic Soybean Somatic Embryos Is Predictive of Seed Phenotypes From Resultant Regenerated Plants

Mature somatic soybean embryos are a good model for zygotic embryos. While in the globular embryo state in liquid culture, somatic soybean embryos contain very low amounts of triacylglycerol or storage proteins typical of maturing, zygotic soybean embryos. At this developmental stage, the ratio of total triacylglyceride to total polar lipid (phospholipids and glycolipid) is about 1:4, as is typical of zygotic soybean embryos at the developmental stage from which the somatic embryo culture was initiated. At the globular stage as well, the mRNAs for the prominent seed proteins, α' subunit of β-conglycinin, kunitz trypsin inhibitor 3, and seed lectin are essentially absent. Upon transfer to hormone-free media to allow differentiation to the maturing somatic embryo state, triacylglycerol becomes the most abundant lipid class. As well, mRNAs for α'-subunit of β-conglycinin, kunitz trypsin inhibitor 3 and seed lectin become very abundant messages in the total mRNA population. On this basis somatic soybean embryo system behaves very similarly to maturing zygotic soybean embryos *in vivo*, and is therefore a good and rapid model system for analyzing the phenotypic effects of modifying the expression of genes in the fatty acid biosynthesis pathway.

Most importantly, the model system is also predictive of the fatty acid composition of seeds from plants derived from transgenic embryos. This is illustrated with two different antisense constructs in two different types of experiment that were constructed following the protocols set forth in the PCT Publication Nos. WO 93/11245 and WO 94/11516. Liquid culture globular embryos were transformed with a chimeric gene comprising a soybean microsomal Δ^{15} desaturase as described in PCT Publication No. WO 93/11245 which was published on June 10, 1993, the disclosure of which is hereby incorporated by reference (experiment 1,) or a soybean microsomal Δ^{12} desaturase as described in PCT Publication No. WO 94/11516 which was published on May 26, 1994, the disclosure of which is hereby incorporated by reference (experiment 2). Both gene constructs were introduced in antisense orientation under the control of a seed-specific promoter (β-conglycinin promoter) and gave rise to mature embryos. The fatty acid content of mature somatic embryos from lines transformed with vector only (control) and the vector containing the antisense chimeric genes as well as of seeds of plants regenerated from them was determined.

One set of embryos from each line was analyzed for fatty acid content and another set of embryos from that same line was regenerated into plants. Fatty acid analysis of single embryos was determined either by direct trans-esterification of individual seeds in 0.5 mL of methanolic H_2SO_4 (2.5%) or by hexane extraction of bulk seed samples followed by trans-esterification of an aliquot in 0.8 mL of 1% sodium methoxide in methanol. Fatty acid methyl esters were extracted from the methanolic solutions into hexane after the addition of

an equal volume of water. In all cases, if there was a reduced 18:3 content in a transgenic embryo line when compared to an untransformed control, then a corresponding reduction in 18:3 content was also observed in the segregating seeds of the plant derived from that transformed line (Table 2).

TABLE 2

Percent 18:3 Content Of Embryos and Seeds of Control and Δ^{15} Antisense Construct Transgenic Soybean Lines

Transformant Line	Embryo Average (SD, n=10)	Seed Average (SD, n=10)
Control	12.1 (2.6)	8.9 (0.8)
Δ^{15} antisense, line 1	5.6 (1.2)	4.3 (1.6)
Δ^{15} antisense, line 2	8.9 (2.2)	2.5 (1.8)
Δ^{15} antisense, line 3	7.3 (1.1)	4.9 (1.9)
Δ^{15} antisense, line 4	7.0 (1.9)	2.4 (1.7)
Δ^{15} antisense, line 5	8.5 (1.9)	4.5 (2.2)
Δ^{15} antisense, line 6	7.6 (1.6)	4.6 (1.6)

*[Seeds which were segregating with wild-type phenotype and without a copy of the transgene are not included in these averages]

In addition, different lines containing the same antisense construct, were used for fatty acid analysis in somatic embryos and for regeneration into plants. About 55% of the transformed embryo lines showed an increased 18:1 content when compared with control lines (Table 3). Soybean seeds, of plants regenerated from different somatic embryo lines containing the same antisense construct, had a similar frequency (53%) of high oleate transformants as the somatic embryos (Table 3). On occasion, an embryo line may be chimeric. That is, 10-70% of the embryos in a line may not contain the transgene. The remaining embryos that do contain the transgene, have been found in all cases to be clonal. In such a case, plants with both wild type and transgenic phenotypes may be regenerated from a single, transgenic line, even if most of the embryos analyzed from that line had a transgenic phenotype. An example of this is shown in Table 4, in which, of 5 plants regenerated from a single embryo line, 3 have a high oleic phenotype and two were wild type. In most cases, all the plants regenerated from a single transgenic line will have seeds containing the transgene. Thus, it was concluded that an altered fatty acid phenotype observed in a transgenic, mature somatic embryo line is predictive of an altered fatty acid composition of seeds of plants derived from that line.

TABLE 3

Oleate Levels in Somatic Embryos and Seeds of Regenerated Soybeans Transformed With, or Without, Δ^{12} Desaturase Antisense Construct

	# of Vector Lines	# of Lines with High 18:1	Average* %18:1
Somatic embryos:			
Control	19	0	12.0
Δ^{12} antisense	20	11	35.3
Seeds of regenerated plants:			
Control	6	0	18.2
Δ^{12} antisense	17	9	44.4

*average 18:1 of transgenics is the average of all embryos or seeds transformed with the Δ^{12} antisense construct in which at least one embryo or seed from that line had an 18:1 content greater than 2 standard deviations from the control value (12.0 in embryos, 18.2 in seeds). The control average is the average of embryos or seeds which do not contain any transgenic DNA but have been treated in an identical manner to the transgenics.

TABLE 4

Analysis of Seeds From Five Independent Plants Segregating From Plant Line 4

Plant #	Average seed 18:1%	Highest seed 18:1 %
1	18.0	26.3
2	33.6	72.1
7	13.6	21.2
9	32.9	57.3
11	24.5	41.7

Mean of 15-20 seeds from 5 different plants regenerated from a single embryo line. Only plants # 2, 9 and 11 have seeds with a high 18:1 phenotype.

EXAMPLE 4

Analysis of Nucleic Acid Sequences

Nucleic acid sequences comprising the target regions or the complementary regions are analyzed by conducting BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al (1993) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; see also www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) searches for similarity to sequences contained in the BLAST "nr" database (comprising all non-redundant GenBank CDS translations, sequences derived from the 3-dimensional structure Brookhaven Protein Data Bank, the last major release of the SWISS-PROT protein sequence database, EMBL, and DDBJ databases). The nucleic sequences are analyzed for similarity to all publicly available DNA sequences contained in the "nr" database using the BLASTN algorithm provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The DNA sequences can also be translated in all reading frames and compared for similarity to

all publicly available protein sequences contained in the "nr" database using the BLASTX algorithm (Gish and States (1993) *Nat. Genet.* 3:266-272) provided by the NCBI. For convenience, the P-value (probability) of observing a match of a cDNA sequence to a sequence contained in the searched databases merely by chance as calculated by BLAST are reported herein as "pLog" values, which represent the negative of the logarithm of the reported P-value. Accordingly, the greater the pLog value, the greater the likelihood that the cDNA sequence and the BLAST "hit" represent homologous proteins.

EXAMPLE 5

A Comparison of Reduced Fad2 Expression Using

Antisense vs. "Classical" Co-suppression vs. "Complementary Region" Co-suppression

The following are some comparisons of antisense, "classical" co-suppression, and "complementary region" co-suppression (CRC) in similar experiments involving a soybean fatty acid desaturase (Fad). Fad2-1 is a gene locus encoding a Δ-12 desaturase from soybean that introduces a double bond into the oleic acid side-chain to form a polyunsaturated fatty acid. Reduction in the expression of Fad2-1 results in the accumulation of oleic acid (18:1, or an 18 carbon fatty acid tail with a single double bond) and a corresponding decrease in polyunsaturated fatty acid content.

The antisense constructs have all, or a portion, of the Fad2-1 coding region in a reverse orientation behind a strong promoter. It is believed that expression of the "antisense" RNA interferes with normal translation of the homologous endogenous gene via a hybridization event. The "classical" co-suppression construct have all, or a portion, of Fad2-1 in the normal sense orientation behind a strong promoter. It is believed that the expression of the "co-suppressing" RNA activates an uncharacterized mechanism that results in the partial, or total, elimination of the introduced RNA, as well as all RNAs having substantially similar sequences. The CRC construct used contains a portion of the Fad2-1 coding region (300 bp) duplicated in the reverse complement orientation, forming a complementary region specific for Fad2-1.

The plasmids used in these experiments were made using standard cloning methods well known to those skilled in the art (Sambrook et al (1989) *Molecular Cloning*, CSHL Press, New York). A starting plasmid pKS18HH (U.S. Patent No. 5,846,784 the contents of which are hereby incorporated by reference) contains a hygromycin B phosphotransferase (HPT) obtained from *E. coli* strain W677 under the control of a T7 promoter and the 35S couliflower mosaic virus promoter. Plasmid pKS18HH thus contains the T7 promoter/HPT/T7 terminator cassette for expression of the HPT enzyme in certain strains of *E. coli*, such as NovaBlue(DE3) [from Novagen], that are lysogenic for lambda DE3 (which carries the T7 RNA Polymerase gene under lacV5 control). Plasmid pKS18HH also contains the 35S/HPT/NOS cassette for constitutive expression of the HPT enzyme in plants, such as soybean. These two expression systems allow selection for growth in the presence

of hygromycin to be used as a means of identifying cells that contain the plasmid in both bacterial and plant systems. pKS18HH also contains three unique restiction endonuclease sites suitable for the cloning other chimeric genes into this vector. Plasmid ZBL100 (PCT Application No. WO 00/11176 published on March 2, 2000) is a derivative of pKS18HH with a reduced NOS 3' terminator. Plasmid pKS67 is a ZBL100 derivative with the insertion of a beta-conglycinin promoter, in front of a NotI cloning site, followed by a phaseolin 3' terminator (described in PCT Application No. WO 94/11516, published on May 26, 1994). PKS91 is a derivative of pKS67 with a polymerase chain reaction (PCR) hairpin fragment of the soybean Fad2 gene inserted into the Not I site. The primers used in PCR reactions with soybean Fad2-1 DNA as follows (all sequences are 5' to 3'):

PCR(A)

GAATTCGCGGCCGCATGGGAGGTAGAGGTC	SEQ ID NO:1
GGAAAACCATGCAACCCATTGGTACTTGCT	SEQ ID NO:2

PCR(B)

AGCAAGTACCAATGGGTTGCATGGTTTTCC	SEQ ID NO:3
AGCAAGTACCAATGGATACTTGTTCCTGTA	SEQ ID NO:4

PCR(A/AS)

TACAGGAACAAGTATCCATTGGTACTTGCT	SEQ ID NO:5
GAATTCGCGGCCGCATGGGAGGTAGAGGTC	SEQ ID NO:6

The products of the three reactions (A)+(B)+(A/AS) are ligated together, digested with the restriction enzyme Not I, and the 1.3 kb fragment is cloned into the Not I site of KS67. The plasmid pKS91 was used in the experiments presented in this section. The 2.5 kb plasmid pKS17 contains pSP72 (obtained from Promega Biosystems) and the T7 promoter/HPT/T7 3' terminator region, and is the original vector into which the 3.2 kb BamHI-SalI fragment containing the 35S/HPT/NOS cassette was cloned to form pKS18HH. The plasmid pKS102 is a pKS17 derivative that is digested with XhoI and SalI, treated with mung-bean nuclease to generate blunt ends, and ligated to insert the following linker:

GGCGCGCCAAGCTTGGATCCGTCGACGGCGCGCC SEQ ID NO:7

The plasmid pKS83 has the 2.3 kb BamHI fragment of ML70 containing the Kti3 promoter/NotI/Kti3 3' terminator region (described in PCT Application No. WO 94/11516, published on May 26, 1994) ligated into the BamHI site of pKS17. The plasmid pKS103 is a derivative of pKS83 with the 1.3 kb NotI fragment of pKS91 (containing the Fad2 complementary sequence) ligated into the NotI site.

In order to have comparable numbers of antisense lines to compare to the more numerous co-suppression constructs, it was necessary to include antisense experiments in which Fad 6 was co-bombarded with Fad 2-1. Fad6 is a gene encoding Δ-12 desaturase found in plastids (as opposed to Fad2 which is found in the microsomal compartment). It was believed that suppression of Fad2 and Fad6 simultaneously might give a stronger, or different, phenotype than Fad2 suppression alone. However, it has since been determined that Fad6 does not produce a phenotype, therefore the phenotypes obtained from antisense experiments with both Fad2 and Fad6 only reflect changes in Fad2-1 content.

Control embryos (286 individuals) had an average 18:1 content of 9% with a standard deviation (SD) of 6.2% (actual range 4-22%). Thus, an oleic acid content of 25% was chosen to represent a positive reduction in Fad2-1 which results in increased 18:1 that is more than 2 SDs from the mean, and higher than the highest control value seen. If a line has at least 1 embryo with an 18:1 content of 25% or more, it is counted as an antisense or a cosuppression event. Two experiments were combined to generate about 30 lines.

TABLE 5

Positive Transformed Lines With Reduced Fad2-1 Expression

	Antisense	Co-suppression	CRC
Fad2-1 lines with >25% 18:1 content	9 out of 31	9 out of 28	31 out of 33
Percent total	29%	32%	94%

Another point to consider when analyzing transgenic plants with reduced expression due to antisense or co-suppression is chimerism. In the antisense and cosuppression experiments above the positive events lines detected may have only contained a single embryo out of ten with increased oleic acid content. Since all of these experiments had 10 embryos per line analyzed it is possible to graphically represent chimerism data by plotting actual embryo numbers against oleic content (greater or less than 25% which would be indicative of a tranformant reduced in Δ-12 expression). Therefore, if a line has little or no chimerism then all of its embryos will have a suppressed phenotype as opposed to being wild types. The data appear to be quite convincing that CRC (the grey box) transformants give consistently higher oleic acid contents with less chirmeric events:

Another issue is the efficiency with which a line exhibits the reduced expression phenotype. The results from the experiments here and in Example 6 confirm that the constructs containing the complementary regions in proximity to the target sequence were more effective at producing very high 18:1 content in embryos than either antisense or "classical" co-suppression (i.e. as opposed to complementary region containing co-suppression, CRC). The level of suppression achieved in an experiment is reflected in the corresponding increase of oleic acid content in the plants. The higher the average 18:1

content, the greater the degree of suppression. The complementary region containing constructs had oleic acid contents of 50% which is over 5 SDs from the control mean.

TABLE 6

Positive Transformed Lines With High Efficiency Reduction in Fad2-1 Expression

	Antisense	Co-suppression	CRC
Fad2-1 lines with >50% 18:1 content	1 out of 31	3 out of 28	29 out of 33
Percent total	3%	11%	88%

It appears that CRC is the most efficient and effective way of producing high 18:1 content in embryos with reduced Fad2-1 content. As was shown in Example 3 there is a phenotypic correlation between embryo oleic acid content and seed oleic acid content in transgenic plant. Thus experiments yielding embryonic lines with greater than 51% are most desirable since they appear to guarantee a seed oleic of greater than 80%:

It is noted that most positive seed lines detected are close to (or greater than) 80% oleic. Those few that aren't appear to be derived from embryo lines with a maximum oleic content ranging from 30% to 50%. To date no lines having a positive phenotype that had maximum embryo content of oleic acid less than 30%, and lines in the production system with 51% or more oleic acid content have always given rise to the best seed phenotypes. Additionally, the top five embryo lines from production (all greater than 50% oleic) gave the best phenotype in seed (greater than 80%) and the bottom four embryo lines (all less than 50% oleic in embryos) all gave less than 80% oleic acid content in seed.

EXAMPLE 6

Target and Complementary Sequences Can Both Co-suppress Their Endogenous Homologs

The inclusion of a complementary region into the target region of a co-suppression construct results in the improvement of efficiency and uniformity in the resultant transformants (Example 5). The next step is to test if more than one gene can be suppressed using this approach. Preliminary results using a 300 nucleotide complementary region from Fad2-1 surrounding a 600 nucleotide target from the soybean thioesterase gene results in the suppression of both genes. This result was interesting for two reasons. First the complementary region from Fad2 was interrupted with thioesterase sequence, unlike the construct presented in Example 5. Second, the non-complementary target sequence (thioesterase) was inhibited in all lines that exhibited Fad2 reduction of expression, implying that there was equal efficiency of target and complementary region reduction of expression.

To further test if any target sequence expression can be efficiently repressed with any complementary region a construct was made using Fad2-1 as the target in combination with a complementary region from the soybean eceriferum3 (cer3) locus. Cer3 encodes one of

21 gene products known to be involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (Hannoufa et al (1996) *Plant J* 10:459-67). The inhibition of a single cer3 gene has no visible phenotype in soybean. Also, cer3 is involved in a biosynthetic pathway that has no known interactions with the fatty acid metabolic pathway containing Fad2 activity. The plasmid pKS100 is a derivative of pKS67. PCR reactions are run with the following primers (5'-3' orientations) and cer3 DNA:

PCR(A+B)

GAATTCGCGGCCGCGGCACGAGATTTGAGG	SEQ ID NO:8
TTGCCCAATGTTTATGCATATGTAGAACTG	SEQ ID NO:9

PCR(A/AS)

CAGTTCTACATATGCATAAACATTGGGCAA	SEQ ID NO:10
GAATTCGCGGCCGCGGCACGAGATTTGAGG	SEQ ID NO:11

The product of the two reactions are ligated together, digested with NotI, and cloned into the NotI site of pKS67. Next, the 516 bp ScaI fragment from soybean Fad2-1 is ligated into a FspI digested pKS100 (within the Cer3 DNA, removing a small portion of the complementary sequence) to form pBS58. Restriction enzyme digestions were used to select the plasmid containing the Fad2 fragment in the sense or antisense orientation. It is believed that Fad2 expression is reduced efficiently in all constructs tested in soybeans.

EXAMPLE 7

Suppression in Soybean of Fad2 By ELVISLIVES Complementary Region

Constructs have now been made which have "synthetic complementary regions" (SCR). Since the Fad 2 CR/TE2 target suppressed both endogenous genes in the one line examined, and since Cer3/Fad2 constructs suppress Fad2, it was deduced that it may be possible to use any complementary sequence to reduce the expression of a target. In this example the target sequence is placed between complementary sequences that are not known to be part of any biologically derived gene or genome (i.e. sequences that are "synthetic" or conjured up from the mind of the inventor). The target DNA would therefore be in the sense or antisense orientation and the complementary RNA would be unrelated to any known nucleic acid sequence. It is possible to design a standard "suppression vector" into which pieces of any target gene for suppression could be dropped. The plasmids pKS106, pKS124, and pKS133 exemplify this. One skilled in the art will appreciate that all of the plasmid vectors contain antibiotic selection genes such as, but not limited to, hygromycin phosphotransferase with promoters such as the T7 inducible promoter.

pKS106 uses the beta-conglycinin promoter while the pKS124 and 133 plasmids use the Kti promoter, both of these promoters exhibit strong tissue specific expression in the seeds of soybean. pKS106 uses a 3' termination region from the phaseolin gene, and pKS124

and 133 use a Kti 3' termination region. pKS106 and 124 have single copies of the 36 nucleotide EagI-ELVISLIVES sequence surrounding a NotI site (the amino acids given in parentheses are back-translated from the complementary strand): SEQ ID NO:12.

```
  EagI   E   L   V   I   S   L   I   V   E   S    NotI
CGGCCG GAG CTG GTC ATC TCG CTC ATC GTC GAG TCG
GCGGCCGC

(S) (E) (V) (I) (L) (S) (I) (V) (L) (E) EagI
CGA CTC GAC GAT GAG CGA GAT GAC CAG CTC CGGCCG
```

pKS133 has 2X copies of ELVISLIVES surrounding the NotI site: SEQ ID NO:13

```
 EagI  E  L  V  I  S  L  I  V  E  S    EagI   E  L  V  I  S
cggccggagctggtcatctcgctcatcgtcgagtcg gcggccg gagctggtcatctcg

 L  I  V  E  S    NotI    (S)(E (V)(I)(L)(S)(I)(V)(L)(E)    EagI
ctcatcgtcgagtcg gcggccgc cgactcgacgatgagcgagatgaccagctc cggccgc

(S)(E)(V)(I)(L)(S)(I)(V)(L)(E)  EagI
cgactcgacgatgagcgagatgaccagctc cggccg
```

The idea is that the single EL linker (SCR) can be duplicated to increase stem lengths in increments of approximately 40 nucleotides. A series of vectors will cover the SCR lengths between 40 bp and the 300 bp. Various target gene lengths are also under evaluation. It is believed that certain combinations of target lengths and complementary region lengths will give optimum suppression of the target, although preliminary results would indicate that the suppression phenomenon works well over a wide range of sizes and sequences. It is also believed that the lengths and ratios providing optimum suppression may vary somewhat given different target sequences and/or complementary regions.

The plasmid pKS106 is made by putting the EagI fragment of ELVISLIVES (SEQ ID NO:12) into the NotI site of pKS67. The ELVISLIVES fragment is made by PCR using two primers and no other DNA:

5'-GAATTCCGGCCGGAGCTGGTCATCTCGCTCATCGTCGAGTCGGCGGCCGCC GACTCGACGATGAGCGAGATGACCAGCTCCGGCCGGAATTC-3' SEQ ID NO:14

5'-GAATTCCGGCCGGAG-3' SEQ ID NO:15

The product of the PCR reaction is digested with EagI (5'-CGGCCG-3') and then ligated into NotI digested pKS67. The pKS111 is made by inserting a 599 nucleotide

fragment from the delta-12 desaturase gene (Fad2, nucleotides 399-997), in an antisense orientation into the NotI site of pKS106. The Fad2 fragment is made by PCR using the following primers and Fad2 DNA as a template:

GAATTCGCGGCCGCTGAGTGATTGCTCACGAGT SEQ ID NO:16

GAATTCGCGGCCGCTTAATCTCTGTCCATAGTT SEQ ID NO:17

The PCR product is digested with NotI (5'-GCGGCCGC-3') and ligated into NotI digested pKS106. The total length of complementary sequence is 47 nucleotides (with the 8 nucleotides from the NotI site and 3 additional flanking bases). Co-suppression of Fad2 results in a decrease in the production of polyunsaturated fatty acids, and a corresponding increase in the accumulation of oleic acid (18:1) in soybeans. (see Example 3 above). Oleic acid concentrations in 18 of the 22 lines transformed with pKS111 were 2-5 times that found for the vector only controls, indicating co-suppression in 82% of the recovered transgenic plants. It appears that the placement of a single SCR (ELVISLIVES or EL) surrounding a short segment of Fad2 (600 bp) is sufficient to give co-suppression at efficiencies equal to the efficiencies achieved using the CRC constructs of Example 5. The term "ELVISLIVES" and "EL" are used interchangeably herein.

Additional plasmids can be used to test this example. For example, pKS121 contains the Kti3 promoter/NotI/Kti3 3' terminator fragment analogous to pKS83 inserted into the BamHI-SalI digested pKS102. The EagI digested ELVISLIVES cloning site made from SEQ ID NOs:14 and 15 is inserted into the NotI site of pKS121 to form pKS124. The Fad2 fragment from pKS111 is ligated into NotI digested pKS124 to form pKS132. The EagI digested EL PCR product can be ligated into NotI digested pKS124 to form the 2XEL pKS133. An additional 2XEL vector, pKS151, is similar to pKS133 except for the addition of a second hygromycin phosphotransferase gene with a 35S-CaMV promoter. Any synthetic sequence, or naturally occurring sequence, can be used in an analogous manner. The addition of the 599 bp soybean Fad2 fragment from pKS111 into a NotI digested pKS133 produces pKS136.

The efficiency of Fad2 suppression using 1XEL (pKS132) was compared to Fad2 suppression using the 2XEL (pKS136) construct. Hygromycin resistant lines of soybean embryos were isolated from independent transformation experiments with pKS132 and pKS136. Out of 98 lines containing pKS132, 69% displayed the high oleic phenotype. Out of 54 lines containing pKS136, 70% displayed the high oleic acid phenotype. Thus, both 1X and 2XEL constructs efficiently suppressed the Fad2 target gene.

EXAMPLE 8

Length of the Fad2 Target Sequence Affects Suppression Efficiency

The length of the target was tested to determine the effect on the efficiency of suppression in an EL construct. PCR reactions were performed using the primers shown in Table 7 to create 25, 50, 75, 150, 300, and 600 fragments of Fad2 to place between 2XEL complementary regions. The PCR products were cut with Not I and ligated into pBluescript and the sequence of the fragments was verified. Not I digested fragments were then ligated into the NotI of pKS151.

TABLE 7

Primers for PCR of Soybean Fad2

Primer Sequence	Length	SEQ ID NO
5'-GAATTCGCGGCCGCCCAATCTATTGGGTTCTC-3' common 5'-end primer position 363 in Fad2 sequence	-	18
5'-GAATTCGCGGCCGCAACCTTGGAGAACCCAAT-3 3'-end primer for 25 bp fragment from 363-387 of Fad2	25	19
5'-GAATTCGCGGCCGCATCACCCACACACCAGTG-3' 3'-end primer for 50 bp fragment from 363-412 of Fad2	50	36
5'-GAATTCGCGGCCGCGGCATGGTGACCACACTC-3' 3'-end primer for 75 bp fragment from 363-437 of Fad2	75	20
5'-GAATTCGCGGCCGCTGAGAAATAAGGGACTAA-3' 3'-end primer for 150 bp fragment from 363-512 of Fad2	150	21
5'-GAATTCGCGGCCGCGAGTGTGACGAGAAGAGA-3' 3'-end primer for 300 bp fragment from 363-662 of Fad2	300	22
5'-GAATTCGCGGCCGCTTCTGATGAATCGTAATG-3' 3'-end primer for 600 bp fragment from 363-962 of Fad2	600	23

TABLE 8

Effect of Target Length on Suppression by 2XEL

Fad2 Target Length	# Lines Tested	High Oleic
25	8	0%
50	8	0%
75	8	13%
150	8	13%
300	29	34%
600	20	60%

The results in Table 8 show a clear correlation between target length and efficiency of suppression. The longest (600 bp) fragment of Fad2 is nearly twice as likely to be suppressed in the EL construct than a 300 bp fragment, while 50 bp and shorter fragments are not effective.

EXAMPLE 9

Multiple Target Sequences Can be Suppressed by 2XEL

A construct was assembled to test whether multiple target sequences can be used between EL complementary sequences to achieve simultaneous suppression. A 969 bp

fragment from a soybean delta-9 desaturase was inserted into pKS136 next to the 599 bp Fad2 fragment to form pBS68. Both desaturase fragments were flanked by 2XEL complementary regions (2xEL - Fad2 - Delta 9 - 2XEL the sequence of which is shown in SEQ ID NO:24).

Delta-9 desaturase catalyzes the double-bond at the 9-position of 18-carbon fatty acids to form oleic acid (18:1) from stearic acid (18:0), analogous to the delta-12 Fad2 which catalyzes the 12-position double bond that converts oleic acid to linoleic acid (18:2). Suppression of the unique Fad2 gene results in an accumulation of oleic acid at the expense of polyunsaturated fatty acids. Suppression of delta-9 desaturases results in an accumulation of stearic acid at the expense of all unsaturated fatty acids. However, there are several delta-9 desaturases in soybean (at least three) so it is unclear how the suppression of one member would affect oil composition. Transformation protocols and oil composition analyses were performed as previously outlined in Examples 1 and 3, respectively.

Transformation of soybean with pBS68 resulted in 113 hygromycin resistant lines. Of these 72 showed some oil phenotype (64%). The phenotypes of the 72 suppressed lines were: 18 were high stearate, 23 were high oleate, and 31 were both high oleate and high stearate. Therefore, multiple targets can be efficiently suppressed by a single EL construct.

EXAMPLE 10

Suppression of Soybean Galactinol Synthase Genes in ELVISLIVES Constructs

Raffinose saccharides are a group of D-galactose-containing oligosaccharide derivatives of sucrose that are widely distributed in plants. Raffinose saccharides are characterized by the general formula: [O-β-D-galactopyranosyl-(1→6)$_n$-α-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-fructofuranoside where n=0 through n=4 are known respectively as sucrose, raffinose, stachyose, verbascose, and ajugose.

Although abundant in many species, raffinose saccharides are an obstacle to the efficient utilization of some economically-important crop species. Raffinose saccharides are not digested directly by animals, primarily because alpha-galactosidase is not present in the intestinal mucosa [Gitzelmann et al (1965) *Pediatrics* 36:231-236; Rutloff et al (1967) *Nahrung* 11:39-46]. However, microflora in the lower gut are readily able to ferment the raffinose saccharides resulting in an acidification of the gut and production of carbon dioxide, methane and hydrogen gases [Murphy et al (1972) *J. Agr. Food. Chem.* 20:813-817; Cristofaro et al (1974) in Sugars in Nutrition, H. L. Sipple and K. W. McNutt, Eds. Academic Press, New York, Chap. 20, 313-335; Reddy et al (1980) *J. Food Science* 45:1161-1164]. The resulting flatulence can severely limit the use of leguminous plants in animal, particularly human, diets. It is unfortunate that the presence of raffinose saccharides restricts the use of legumes in human diets because many of these species are otherwise excellent sources of protein and soluble fiber. Varieties of edible beans free of raffinose

saccharides would be more valuable for human and animal diets and would facilitate broader access to the desirable nutritional qualities of edible leguminous plants.

The biosynthesis of raffinose saccharides has been well characterized [see Dey (1985) in Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants, P. M. Dey and R. A. Dixon, Eds. Academic Press, London, pp. 53-129]. The committed reaction of raffinose saccharide biosynthesis involves the synthesis of galactinol from UDP-galactose and myo-inositol. The enzyme that catalyzes this reaction is galactinol synthase (inositol 1-alpha-galactosyltransferase; EC 2.4.1.123). Synthesis of raffinose and higher homologues in the raffinose saccharide family from sucrose is thought to be catalyzed by distinct galactosyltransferases (for example, raffinose synthase and stachyose synthase). Studies in many species suggest that galactinol synthase is the key enzyme controlling the flux of reduced carbon into the biosynthesis of raffinose saccharides [Handley et al (1983) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108:600-605; Saravitz, et al (1987) *Plant Physiol.* 83:185-189]. Altering the activity of galactinol synthase, either as a result of overexpression or through antisense inhibition, would change the amount of raffinose saccharides produced in a given tissue.

Related galactinol synthase genes already known in the art include sequences disclosed in US Pat. Nos. 5,773,699 and 5,648,210, Kerr et al, "Nucleotide Sequences of Galactinol Synthase from Zucchini and Soybean" and Sprenger and Keller (2000) *Plant J* 21:249-258. Presumably related sequences are also disclosed in PCT Publication No. WO 98/50553, Lightner, "Corn Glycogenin". Two genes encoding soybean galactinol synthases have been previously identified (SEQ ID NOs:30 and 32, with the predicted translation products shown in SEQ ID NOs:31 and 33; presented in US Pat No. U.S. Provisional Application No. 60/196550, filed April 11, 2000). Unlike the unique soybean Fad2 gene, it is known that there are multiple galactinol synthase genes in soybean. Because there are multiple genes encoding galactinol synthases, it is believed that suppression of more than one gene may be required to detect an effect on raffinose sugar levels.

A plasmid construct was assembled containing fragments of two galactinol synthase soybean genes Gas1 (390 bp from 13-402 of SEQ ID NO:30) and Gas2 (399 bp, from 129-527 of SEQ ID NO:32) cloned in the NotI site of a 2XEL cassette. The promoter region was a late embryo promoter (Lea) from soybean. The Lea promoter (Lee et al (1992) *Plant Physiol* 100:2121-2122; Genbank Accession No. M97285) was amplified from genomic A2872 soybean DNA with the following primers:

SEQ ID NO:25 5'-ATT AAC CTC AAT TCT TCT AAG (position 25-45 of M97285)

SEQ ID NO:26 5'-TTC AAA GAT CAA TTA TTT CC (position 995-1112 M97285)

and a phaseolin 3'-end (amplified with primers shown in SEQ ID NOs:27 and 28) was added. The entire Lea promoter - 2XEL - Gas1 - Gas2 - 2XEL - phaseolin 3'-end cassette was then cloned into the BamHI site of pKS136 to create the pKS149 vector (the sequence of the complete EL region of pKS149 is shown in SEQ ID NO:29). When introduced into

plants pKS136 will inhibit both Fad2 (controlled by the Kti promoter) and Gas genes (controlled by the Lea promoter). Since the Kti promoter is active in embryos, it is possible to screen the embryos for high oleic phenotype, as described in the previous examples. Of the 119 lines isolated as hygromycin resistant 65% were found to have a high oleic phenotype.

These suppressed lines should also contain the Gas suppression cassette, allowing for the assay of raffinose sugars in the seedlings (Lea is not active during the early embryo stage). Raffinose sugars (galactinol, raffinose, stachyose, etc.) can be detected using thin layer chromatography. Plant samples are extracted with hexane then dried. The dried material is then resuspended in 80% methanol, incubated at room temperature for 1-2 hours, centrifuged, and 1-2 microliters of the supernatant is spotted onto a TLC plate (Kieselgel 60 CF, from EM Scientific, Gibbstown, NJ; catalog no. 13749-6). The TLC is run in ethylacetate:isopropanol:20% acetic acid (3:4:4) for 1-1.5 hours. The air dried plates are sprayed with 2% sulfuric acid and heated until the charred sugars are detected. As shown in Figure 2 the two lines labeled GAS-EL show reduced levels of raffinose sugars (lowest band) when compared to a control known to have very low raffinose sugars (Low 4). It is estimated that there is a 60% reduction of raffinose sugars in these lines when compared to wild-type soybean.

EXAMPLE 11

ELVISLIVES Constructs Can Be Used to Screen Essential Plant Genes

Acetolactate synthase (ALS), also known as acetohydroxyacid synthase (AHAS), catalyzes the first common step in the biosynthesis of the branched chain amino acids isoleucine, leucine, and valine (Keeler et al, *Plant Physiol* 1993 102: 1009-18). Inhibition of native plant ALS by several classes of structurally unrelated herbicides including sulfonylureas, imidazolinones, and triazolopyrimidines, is lethal (Chong CK, Choi JD *Biochem Biophys Res Commun* 2000 279:462-7). Hence suppression of the gene encoding ALS in soybean should also be lethal. Thus, a well-validated herbicide target like ALS can inserted into EL vectors to test whether the transformation screening process can be used to identify essential plant genes. If so, other essential plant genes could be screened in a high-throughput method to identify novel potential herbicide targets. The term "essential plant genes" as used herein refers to genes encoding a product that is required for normal plant growth, development, and/or viability. In addition to ALS, examples of essential plant genes would include, but not be limited to, rate-limiting enzymes in amino acid, nucleic acid, or lipid biosynthesis. It is also believed that many genes with unknown function may be essential.

If a soy EL-ALS-EL construct is expressed during selection on hygromycin, very few events should be recovered, even though the HPT gene is present. If the EL-ALS-EL transcriptional unit is not expressed until late embryogenesis then recovery of transformation

events should be similar in number to events obtained with vector controls, containing only the HPT gene. Constitutive expression of EL-ALS-EL can be accomplished by using a 35S promoter (pKS161). Expression of EL-ALS-EL restricted to late embryogenesis/germination can be accomplished with the previously described LEA promoter (pKS163).

To make KS161 the EL linker (SEQ ID NO:12) was cloned into the NotI site of pKS50 to produce pKS137 (a single EL complementary region with a 1 kb 35S CaMV promoter and a 700 bp nos 3'-end on a plasmid with 2 HPT genes one with a T7 promoter and the second with a 35S promoter). A 208bp Hind III/EcoR I fragment from a soybean ALS gene (SEQ ID NO:35, fragment is from position 891-1114) was then cloned into the Hind III/EcoR I sites of pKS137 to produce pKS161. To make pKS163 the EL linker (SEQ ID NO:12) was cloned into the NotI site of pKS127 to produce KS139 (a single EL complementary region with the Lea promoter and the phaseolin 3'-end from Example 10 on a plasmid with 2 HPT genes one with a T7 promoter and the second with a 35S promoter). The 208 bp Hind III/EcoR I fragment from soybean ALS gene (SEQ ID NO:35, the HindIII/EcoRI fragment is from position 896-1103) was then cloned into the Hind III/EcoR I sites of KS139 to produce KS163.

KS161 and KS 163 were transformed into 821 tissue (Example 1). The transformation efficiency for this tissue is normally in the range of 200-500 clones/gram of tissue. The results of two separate transformation experiments with KS161 and KS163, 4 weeks after bombardment and transfer to hygromycin-containing medium are:

Expt. 1	
KS161 (35S ALS EL)	16 clones/gram tissue
KS163 (LEA ALS EL)	247 clones/gram tissue
Expt. 2	
KS161 (35S ALS EL)	43 clones/gram tissue
KS163 (LEA ALS EL)	467 clones/gram tissue

In both experiments the 35S EL-ALS vector resulted in a >90% decrease in clone numbers, presumably because of suppression of the endogenous ALS gene throughout embryo formation stages. Therefore, the difference in clone numbers obtained for a novel gene fragment inserted into a 35S-EL construct (KS137) and a LEA-EL construct (KS139) can be used as a measure of whether the corresponding endogenous gene is essential or not, and thus whether or not it is a potential herbicide target. The effect of an unknown gene fragment on transformation efficiency can be measured within a few weeks of particle bombardment and thus this is a rapid means of identifying new herbicide target candidates.

A typical screen consists of bombarding tissue with KS137 and KS139 as empty-vector controls, KS161 as a positive (ALS) control and various gene fragments, amplified by PCR to contain Hind III and EcoR I sites, cloned into the HindIII/EcoRI sites of KS137 and KS139.

The improved frequency of suppression achieved with the EL constructs allows for the possibility of a reliable screening method. A significant percentage of the hygromycin recovered transformation events must be suppressed by the target sequence contained within pKS137 or pKS139 in order for there to be a statistically definitive difference between the two experiments. The term "high degree of frequency" as used herein, with respect to the suppression efficiency, refers to the percentage of transformed lines that exhibit the target suppressed phenotype. High frequency percentages are expected to be in a range of at least 15-95% and any integer percentage found within the range. Preferred embodiments would include at least 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, and 95%.

EXAMPLE 12

Suppression of Cellulose Synthase in Maize Using EL Constructs

Cellulose synthase genes encode a family of proteins involved in cellulose formation in plants (Pear, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 93, 12637-12642; Saxena, et al, (1990), *Plant Molecular Biology* 15, 673-684). Several maize genes encoding cellulose synthases (cesA) have been recently cloned and characterized (PCT Publication No. WO 00/09706, published on February 24, 2000). Fragments from four of these genes, cesA1, cesA4, cesA5, and cesA8, were used to test whether 1XEL could direct the suppression of these genes in maize.

One kb fragments from the 5'-end of the cDNA clones (including 5'-UTR and ORF sequences) for cesA1, cesA4, cesA5, and cesA8 were each cloned separately into the internal NotI site of 1XEL (SEQ ID NO:12) constructs. Each of these "EL-cesA-EL" cassettes was inserted into a plasmid containing a f3.7 promoter (a weak constitutive promoter exhibiting some preference for stalk-specific expression), a proteinase inhibitor 3'-end (pinII from potato, An et al (1989) *Plant Cell* 1: 115-122), and a 35S:BAR:pinII selection marker. A control plasmid containing an IN2 promoter driving a GUS gene with a pinII 3'-end was also made.

Results from maize transformation experiments with each of the constructs are shown in Table 9. Twenty-five lines were isolated for each of the four cesA gene constructs and 18 lines were isolated for the control. The height of the plants and stalk diameter were on average smaller in the lines containing the suppression constructs than in the control. Ear heights were shorter in the cesA1 and cesA5 containing lines. The average cellulose percentage of total dry matter is normally 46% in control plants. All of the cesA constructs had lines that were below 46% cellulose with cesA1>cesA5>cesA8>cesA4. The lines that exhibited low cellulose

percentages were tested by DNA Southern blot analyses to determine which contained a single-copy transgene insertion. All had at least one line that had both low cellulose and a single transgene.

TABLE 9
Summary of CesA Suppression By EL Constructs

Construct	height (cm)	Ear (cm)	Stalk (mm)	Cellulose <46%	Single transgene
Control	171	44	16		
CesA1	150	40	14	9	3
CesA4	164	46	13	3	2
CesA5	148	41	13	7	2
CesA8	166	46	15	5	1

These results show that cellulose levels are altered in plants containing cesA gene fragments contained within 1XEL constructs. This is interpreted as meaning that cesA suppression in maize has a detectable phenotype, and that EL-controlled suppression is active in maize. It should be noted that the f3.7 promoter is a weak promoter compared to others used in this application (35S-CaMV, Kti, etc.) and that cesA is a large multigene family. These factors may have an effect on the frequency and/or extent of suppression.

EXAMPLE 13

Transient Suppression of GFP in Maize Using GUS Complementary Region

All expression cassettes used in this example comprise a maize ubiquitin promoter (nt 1-899), a maize ubiquitin 5' untranslated leader sequence (nt 900-982) and a maize ubiquitin intron 1 (nt 983-1992). In plasmid PHP7921 the coding sequence (nt 2015-2731) is GFP (green fluorescent protein) with codons optimized for expression in maize. In plasmid PHP3953 the coding sequence (nt 2013-3821) is GUS. Both cassettes include the polyadenylation signal sequences from the proteinase inhibitor II gene of *S. tuberosum* (PINII TERM, nt 2737-3047 in PHP7921 and nt 3883-4192 in PHP3953).

Standard recombinant DNA methodologies well known to those skilled in the art were used throughout the construction of the expression cassettes for this work. Orientations of fragment insertions and the final structures of the plasmid constructs were determined using standard agarose gel analysis and/or sequencing of the plasmids.

Plasmid PHP7921 was used to create a complementary region (CR) of a small portion of the GFP coding sequence as follows: plasmid DNA was digested with XhoI and treated with the Klenow fragment of DNA polymerase I to release a 244 bp blunt-ended fragment representing nt 2436-2675 near the 3' end of the GFP coding sequence. This fragment was then inserted back into PHP7921 at the HpaI site (nt 2735) just downstream of the stop codon of GFP. A recombinant plasmid was identified that had the inserted fragment

in the reverse orientation relative to the original sequence. This plasmid was designated PHP16391.

Expression cassettes for GUS containing a heterologous GFP-CR were constructed as follows: the entire GFP-CR of PHP16391 was isolated as a BsrGI fragment (nt 2464-2947, 483 bp). This fragment comprises sequences capable of forming a CR with a 214 bp stem and a 55 nt loop. The fragment was rendered blunt-ended as above using Klenow and inserted into the GUS expression cassette of PHP3953 at three different sites. Plasmid PHP16561 has the GFP-CR inserted in the BamHI site (filled in) of PHP3953 (nt 2006), just 5' to the start codon. Plasmid PHP16562 has the GFP-CR inserted in the PacI site (T4 polymerase-treated to render blunt) at nt 3919 of PHP3953 just 3' to the stop codon. Similarly, plasmid PHP16563 has the GFP-CR inserted in the SnaBI site at nt 2398 of PHP3953 within the GUS coding sequence.

High type II callus was maintained by subculturing onto fresh 560P (N6 salts, Erikkson's vitamins, 0,69 g/l proline, 2 mg/l 2,4-D and 3% sucrose) medium every two weeks. Healthy callus was extruded through a 0.77 mm^2 nylon mesh, weighed, and resuspended in MS culture medium with 2 mg/l 2,4-D at a density of 3 grams of tissue/40 ml medium. Cells were uniformly suspended by pipetting the solution up-and-down through a large-bore pipette, and 4 ml aliquots (300 mg) were then collected on glass filter papers using a vacuum apparatus. These filters, each containing approximately 300 mg of cells, were then placed on 560P medium and cultured in the dark at 26°C. After 2-4 days the filters were removed from the culture medium and excess liquid was removed using a vacuum apparatus. DNA was then delivered into the cells using a DuPont Biolistics particle gun using a standard Hi-II bombardment transformation protocol (Songstad D. D. et al, In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 32:179-183, 1996) modified by using 1 um gold particles. Immediately after bombardment the filters were returned to 560P culture medium and cultured in the dark at 26°C. All DNA's were combined in equal ratios to obtain a final concentration of 1 ug of total DNA/particle preparation (0.33 ug of each DNA combined in each preparative tube was used for 6 shots). The experiment was shot as follows: From each treatment 10 plates were bombarded (5 from each of two DNA preps).

Treatment	DNA's
#1 Control	PHP3953 (GUS) + PHP10256(rLuciferase) + PHP7921 (GFP)
#2 GUS w/5'CRC	PHP3953 (GUS) + PHP10256 (rLuciferase) + PHP16561(CR-GUS)
#3 GUS w 3' CRC	PHP3953 (GUS) + PHP10256 (rLuciferase) + PHP16562(GUS-CR)
#4 GUS w/CRC in cds	PHP3953 (GUS) + PHP10256 (rLuciferase) + PHP16563(GU-CR-S)

For analysis, the plates within a treatment were grouped into 5 pairs (each pair containing plates shot with different DNA preparations for the same plasmid treatment).

Two days after bombardment, all the tissue from the two paired plates was combined and resuspended in 5 ml of culture medium. After mixing with a wide-bore pipette, a 1 ml aliquot was transferred into a 1.5 ml Eppendorf tube. The cells were centrifuged at 1000 RPMs for 2 minutes in a microfuge and the supernatant (culture medium) decanted. To each tube, 150 ul of "Promega Luciferase Passive Lysis Buffer" was added, temperature-equilibrated on ice, and the cells were broken apart using a hand-drill powered Kontes-tube plastic pestil (extraction and subsequent luciferase assays followed Promega's Dual-Luciferase Reporter Assay protocol (Technical Bulletin #TM040). The cell debris was pelleted by centrifugation in the Microfuge at 3000 RPM for 3 minutes and the supernatant was pipetted off. Aliquots of this extract were used for the fluorometric quantitation of both GUS and luciferase (50 and 20 ul, respectively). GUS enzyme activity was determined as a rate measurement between 10 and 40 minutes after adding substrates, and data was expressed as pmol MU/min/ml/extract (slope). Fluorometric GUS assays were performed on a LabSystems FLUOROSKAN Ascent FL according to the protocol of Rao and Flynn (Biotechniques 1990 8:38-40. Fluorometric analysis of luciferase activity collected using an Analytical Luminescence Laboratory Monolight 2010, following the manufacturer's instructions and the Promega protocol. Assessing both markers for each replicate provided an internal control (luciferase) against which relative GUS activity could be rated. Thus, data was plotted as the ratio of GUS/Luciferase units (because the absolute fluorometric units for *Renilla* luciferase were so high, all the raw values for luciferase activity were divided by 10 before using to normalize GUS activity).

TABLE 10

Complementary Regions of GFP Reduce Target GUS Activity in a 3' (#3) and Internal Orientation (#4)

Treatment	Pmol. MU/min/ml extract slope/rLuci Ave.	Standard deviation
#1	74.14	27.66
#2	82.05	20.99
#3	20.22	17.87
#4	9.67	3.02

Repeat Expt

Treatment	Pmol. MU/min/ml extract slope/rLuci Ave.	Standard deviation
#1	86.93	6.94
#2	77.3	22.62
#3	20.03	7.32
#4	11.2	2.32

It appears from the results (see Table 10) of these transient expression experiments that the placement of a complementary region 5' to a target does not reduce the expression of the target gene. However, it is believed that under optimized conditions, or in a stable transformation experiment, placement of a complementary region 5' to a target is sufficient to reduce expression of the target.

EXAMPLE 14

Suppression of Maize PDS By A Modified Soybean Complementary Region

An additional suppression construct was created using a 205 bp HindIII-BstEII fragment from the soybean Kti promoter as the complementary region surrounding a multiple cloning site. Two copies of the Kti fragment were ligated in an inverted repeat arrangement and subsequently modified by PCR to remove inconvenient restriction sites and add cloning sites at both ends and in the region between the two complementary sequences to form the SHH3 cassette (see SEQ ID NO:34). The resulting plasmid (PHP17962) was used as a source of the SHH3 sequence. The Kti sequence is not normally found in the maize genome, therefore no suppression of endogenous maize genes is expected from the SHH3 region alone. However, when a portion of an endogenous target sequence is inserted into the cloning sites between the complementary Kti sequences, the homologous endogenous gene transcript should be affected.

To test the utility of the SHH3 in silencing an endogenous gene, a 1385 bp NheI fragment representing about 80% of the coding sequence of the phytoene desaturase gene (PDS-1) of Z. mays (Pioneer EST cnlcz91R, Genbank Accession No. L39266) was treated with Klenow enzyme as previously described to render the ends blunt and then ligated into the EcoRV site of SHH3 to generate PHP17894. The SHH3-PDS fragment was then moved as a 1865 bp HpaI fragment into an intermediate vector construct to place it under the control of the ubiquitin promoter:ubiquitin intron1 (U.S. 5,510,474 and 5,614,399) with polyadenylation signals provided by the pinII terminator (An et al (1989) *Plant Cell 1*: 115-122). The resulting plant transcription unit was moved into a binary vector (PHP15578) containing a CaMV35S - bialaphos selectable marker element to generate PHP17914. This construct was electroporated into competent cells of *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 carrying the superbinary plasmid pSB1 ((Ishida et al (1996) *Nature Biotech* 14:745-750). This process generates a cointegrate plasmid comprising the combined sequences of PHP17914 and pSB1. This cointegrate plasmid, designated PHP17939, was used to transform immature embryos of Z. mays as follows.

Transformation of Maize Mediated by *Agrobacterium*

Freshly isolated immature embryos of maize, about 10 days after pollination (DAP), were incubated with the *Agrobacterium*. The preferred genotype for transformation is the highly transformable genotype Hi-II (Armstrong (1991) *Maize Gen Coop Newsletter* 65:92-93). An F_1 hybrid created by crossing with an Hi-II with an elite inbred may also be

used. After *Agrobacterium* treatment of immature embryos, the embryos were cultured on medium containing toxic levels of herbicide. Only those cells which receive the herbicide-resistance gene, and the linked gene(s), grow on selective medium. Transgenic events so selected are propagated and regenerated to whole plants, produce seed, and transmit transgenes to progeny.

Preparation of *Agrobacterium*

The engineered *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 was constructed as per U.S. Patent No. 5,591,616 to contain the PDS gene suppressed by the complementary region shown in SEQ ID NO:34 and a selectable marker gene. Typically either BAR (D'Halluin et al (1992) *Methods Enzymol.* 216:415-426) or PAT (Wohlleben et al (1988) *Gene* 70:25-37) may be used as a selectable marker.

To use the engineered construct in plant transformation, a master plate of single bacterial colonies was first prepared by inoculating the bacteria on minimal AB medium [minimal AB medium contains the following ingredients: 850.000 ml of deionized water; 50.000 ml of stock solution 800A; 9 g of Phytagar which is added after Q.S. to volume; 50.000 ml of stock solution 800B #; 5.000 g of glucose #; and 2.000 ml of spectinomycin 50/mg/ml stock #. Directions are: dissolve ingredients in polished deionized water in sequence; Q.S. to volume with polished deionized water less 100 ml per liter; sterilize and cool to 60°C. Ingredients designated with a # are added after sterilizing and cooling to temperature. Stock solution 800A contains the following ingredients: 950.000 ml of deionized water; 60.000 g of potassium phosphate dibasic K2HPO4; and 20.000 g of sodium phos. monobasic, hydrous. Directions are: dissolve ingredients in polished deionized water in sequence; adjust pH to 7.0 with potassium hydroxide; Q.S. to volume with polished deionized water after adjusting pH; and sterilize and cool to 60°C. Stock solution 800B contains the following ingredients: 950.000 ml of deionized water; 20.000 g of ammonium chloride; 6.000 g of magnesium sulfate 7-H2O, MgSO4, 7H2O; 3.000 g of potassium chloride; 0.200 g of calcium chloride (anhydrate); and 0.050 g of ferrous sulfate 7-hydrate. Directions are: dissolve ingredients in polished deionized water in sequence; Q.S. to volume with polished deionized water; and sterilize and cool to 60°C] and then incubating the bacteria plate inverted at 28°C in darkness for about 3 days. A working plate was then prepared by selecting a single colony from the plate of minimal A medium [minimal A medium contains the following ingredients: 950.000 ml of deionized water; 10.500 g of potassium phosphate dibasic K2HPO4; 4.500 g of potassium phosphate monobasic KH2PO4; 1.000 g of ammonium sulfate; 0.500 g of sodium citrate dihydrate; 10.000 ml of sucrose 20% solution #; and 1.000 ml of 1M magnesium sulfate #. Directions are: dissolve ingredients in polished deionized water in sequence; Q.S. to volume with deionized water; sterilize and cool to 60°C. Ingredients designated with a # are added after sterilizing and cooling to temperature] and streaking it across a plate of YP medium [minimal YP medium

contains the following ingredients: 950.000 ml of deionized water; 5.000 g of yeast extract (Difco); 10.000 g of peptone (Difco); 5.000 g of sodium chloride; 15.000 g of bacto-agar, which is added after Q.S. to volume; and 1.000 ml of spectinomycin 50 mg/ml stock #. Directions are: dissolve ingredients in polished deionized water in sequence; adjust pH to 6.8 with potassium hydroxide; Q.S. to volume with polished deionized water after adjusting pH; sterilize and cool to 60°C. Ingredients designated with a # are added after sterilizing and cooling to temperature]. The YP-medium bacterial plate was then incubated inverted at 28°C in darkness for 1-2 days.

Agrobacterium for plant transfection and co-cultivation was prepared 1 day prior to transformation. Into 30 ml of minimal A medium in a flask was placed 50 μg/ml spectinomycin, 100 μM acetosyringone, and about a 1/8 loopful of *Agrobacterium* from a 1 to 2-day-old working plate. The *Agrobacterium* was then grown at 28°C at 200 rpm in darkness overnight (about 14 hours). In mid-log phase, the *Agrobacterium* was harvested and resuspended at 3 to 5 X 10^8 CFU/ml in 561Q medium + 100 μM acetosyringone using standard microbial techniques and standard curves.

Immature Embryo Preparation

Nine to ten days after controlled pollination of a corn plant, developing immature embryos are opaque and 1-1.5 mm long and are the appropriate size for *Agro*-infection. The husked ears were sterilized in 50% commercial bleach and 1 drop Tween for 30 minutes, and then rinsed twice with sterile water. The immature embryos were aseptically removed from the caryopsis and placed into 2 ml of sterile holding solution comprising of medium 561Q + 100 μM acetosyringone [medium 561 Q contains the following ingredients: 950.000 ml of D-I Water, Filtered; 4.000 g of Chu (N6) Basal Salts (Sigma C-1416); 1.000 ml of Eriksson's Vitamin Mix (1000x Sigma-1511); 1.250 ml of Thiamine.HCL.4 mg/ml; 3.000 ml of 2, 4-D 0.5 mg/ml (No. 2A); 0.690 g of L-proline; 68.500 g of Sucrose; and 36.000 g of Glucose. Directions are: dissolve ingredients in polished deionized water in sequence; adjust pH to 5.2 w/*KOH*; Q.S. to volume with polished deionized water after adjusting pH; and filter sterilize (do not autoclave)].

Agrobacterium Infection and Co-cultivation of Embryos

Holding solution was decanted from excised immature embryos and replaced with prepared *Agrobacterium*. Following gentle mixing and incubation for about 5 minutes, the *Agrobacterium* was decanted from the immature embryos. Immature embryos were then moved to a plate of 562P medium [medium 562 P contains the following ingredients: 950.000 ml of D-I Water, Filtered; 4.000 g of Chu (N6) Basal Salts (Sigma C-1416); 1.000 ml of Eriksson's Vitamin Mix (1000x Sigma-1511); 1.250 ml of Thiamine.HCL.4 mg/ml; 4.000 ml of 2, 4-D 0.5 mg/ml; 0.690 g of L-proline; 30.000 g of Sucrose; 3.000 g of Gelrite, which is added after Q.S. to volume; 0.425 ml of Silver Nitrate 2 mg/ml #; and 1.000 ml of Aceto Syringone 100 mM #. Directions are: dissolve ingredients in polished

deionized water in sequence; adjust pH to 5.8 w/KOH; Q.S. to volume with polished deionized water after adjusting pH; and sterilize and cool to 60°C. Ingredients designated with a # are added after sterilizing and cooling to temperature], scutellum surface upwards, and incubated at 20°C for 3 days in darkness followed by incubation at 28°C for 3 days in darkness on medium 562P + 100 mg/ml carbenecillin (see U.S. Patent 5,981,840).

Selection of Transgenic Events

Following incubation, the immature embryos were transferred to 563O medium [medium 563 O contains the following ingredients: 950.000 ml of D-I Water, Filtered; 4.000 g of Chu (N6) Basal Salts (Sigma C-1416); 1.000 ml of Eriksson's Vitamin Mix (1000x Sigma-1511); 1.250 ml of Thiamine.HCL.4 mg/ml; 30.000 g of Sucrose; 3.000 ml of 2, 4-D 0.5 mg/ml (No. 2A); 0.690 g of L-proline; 0.500 g of Mes Buffer; 8.000 g of Agar (Sigma A-7049, Purified), which is added after Q.S. to volume; 0.425 ml of Silver Nitrate 2 mg/ml #; 3.000 ml of Bialaphos 1 mg/ml #; and 2.000 ml of Agribio Carbenicillin 50 mg/ml #. Directions are: dissolve ingredients in polished deionized water in sequence; adjust to pH 5.8 w/koh; Q.S. to volume with polished deionized water after adjusting pH; sterilize and cool to 60°C. Ingredients designated with a # are added after sterilizing and cooling to temperature] for selection of events. The transforming DNA possesses a herbicide-resistance gene, in this example the BAR gene, which confers resistance to bialaphos. At 10- to 14-day intervals, embryos were transferred to 563O medium. Actively growing putative transgenic embryogenic tissue were visible in 6-8 weeks.

EXAMPLE 15

Suppression of Maize PDS By A Modified Soybean Complementary Region

Regeneration of T_0 Plants

Transgenic embryogenic tissue is transferred to 288W medium [medium 288 W contains the following ingredients: 950.000 ml of D-I H_2O; 4.300 g of MS Salts; 0.100 g of Myo-Inositol; 5.000 ml of MS Vitamins Stock Solution (No. 36J); 1.000 ml of Zeatin.5 mg/ml; 60.000 g of Sucrose; 8.000 g of Agar (Sigma A-7049, Purified), which is added after Q.S. to volume; 2.000 ml of IAA 0.5 mg/ml #; 1.000 ml of .1 Mm ABA #; 3.000 ml of Bialaphos 1 mg/ml #; and 2.000 ml of Agribio Carbenicillin 50 mg/ml #. Directions are: dissolve ingredients in polished deionized water in sequence; adjust to pH 5.6; Q.S. to volume with polished deionized water after adjusting pH; sterilize and cool to 60°C. Add 3.5 g/L of Gelrite for cell biology. Ingredients designated with a # are added after sterilizing and cooling to temperature] and incubated at 28°C in darkness until somatic embryos matured, or about 10 to 18 days. Individual matured somatic embryos with well-defined scutellum and coleoptile are transferred to 272 embryo germination medium [medium 272 contains the following ingredients: 950.000 ml of deionized water; 4.300 g of MS Salts; 0.100 g of Myo-Inositol; 5.000 of MS Vitamins Stock Solution; 40.000 g of Sucrose; and 1.500 g of Gelrite, which is added after Q.S. to volume. Directions are: dissolve ingredients

in polished deionized water in sequence; adjust to pH 5.6; Q.S. to volume with polished deionized water after adjusting pH; and sterilize and cool to 60°C] and incubated at 28°C in the light. After shoots and roots emerge, individual plants are potted in soil and hardened-off using typical horticultural methods. Plants are then evaluated for the PDS-silenced phenotype.

Phytoene desaturase catalyzes a rate-limiting step in the biosynthesis of carotenoids in plants (Misawa, et al *The Plant Journal* (1993) 4(5):833-840). It is a known target of bleaching herbicides such as norflurazon. Cosuppression of the endogenous phytoene desaturase by the introduced SHH3-flanked PDS1 gives a similar bleached phenotype when young plants are incubated in the light (Thomas, et al (2001) *The Plant Journal 25(4)*:417-425; Kumagi et al (1995) *PNAS USA* 92:1679-1683; Ruiz et al (1998) *Plant Cell* 10:937-946).

CLAIMS

What is claimed is:

1. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:
   (a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,
   (b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are in proximity to (a),
   wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

2. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:
   (a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,
   (b) an RNA region unrelated to any endogenous RNA in the host and located 5' to (a), and
   (c) the reverse complement of the RNA in (b) located 3' to (a),
   wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

3. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:
   (a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and
   (b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located 5' to (a),
   wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

4. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:
   (a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and
   (b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located 3' to (a),
   wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

5. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:
   (a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and
   (b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located within (a),
   wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

6. The recombinant construct of any of Claims 1-5 wherein the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host comprise a synthetic, non-naturally occurring RNA sequence.

7. The recombinant construct of any of Claims 1-5 wherein the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host do not comprise plant viral RNA.

8. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) transforming a host with any of the recombinant constructs of Claims 1-5; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

9. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) transforming a host with the recombinant construct of Claim 6; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

10. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) transforming a host with the recombinant construct of Claim 7; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

11. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are in proximity to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

12. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) an RNA region unrelated to any endogenous RNA in the host and located 5' to (a), and

(c) the reverse complement of the RNA in (b) located 3' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

13. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located 5' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

14. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located 3' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

15. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host, and which are located within (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

16. The RNA of any of Claims 11-15 wherein the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host comprise a synthetic, non-naturally occurring RNA sequence.

17. The RNA of any of Claims 11-15 wherein the RNA region or regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host do not comprise plant viral RNA.

18. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host any of the RNA of Claims 11-15; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

19. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host the recombinant construct of Claim 16; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

20. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host the recombinant construct of Claim 17; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

21. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and said regions are in proximity to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

22. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host,

(b) an RNA region encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and located 5' to (a), and

(c) the reverse complement of the nucleic acid in (b) located 3' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

23. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which regions are located 5' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

24. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which regions are located 3' to (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

25. A recombinant construct comprising a promoter operably linked to a DNA sequence which, when expressed by a host, produces an RNA having:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which regions are located within (a),

wherein the expressed RNA reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

26. The recombinant constructs of Claims 21-25 wherein the nucleic acid sequence in the genome of the host is a sequence which is not expressed by the host.

27. The recombinant constructs of Claims 21-25 wherein the nucleic acid sequence in the genome of the host is sequence which is expressed by the host.

28. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) transforming a host with any of the recombinant constructs of Claims 21-25; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

29. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) transforming a host with the recombinant construct of Claim 26; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

30. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) transforming a host with the recombinant construct of Claim 27; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

31. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and which regions are in proximity to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

32. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by a host,

(b) an RNA region encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any

sequence that is substantially similar to the target mRNA and is located 5' to (a), and

(c) the reverse complement of the RNA in (b) located 3' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

33. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA and which regions are located 5' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

34. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which regions are located 3' to (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

35. An RNA comprising:

(a) homology to at least one target mRNA expressed by the host, and

(b) two complementary RNA regions which are encoded by any nucleic acid sequence in the genome of the host provided that said sequence does not encode the target mRNA or any sequence that is substantially similar to the target mRNA, and which are located within (a),

wherein the RNA, when introduced into the host, reduces the expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

36. The RNA of any of Claims 31-35 wherein the nucleic acid sequence in the genome of the host is a sequence which is not expressed by the host.

37. The RNA of any of Claims 31-35 wherein the nucleic acid sequence in the genome of the host is a sequence which is expressed by the host.

38. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host any of the RNA of Claims 31-35; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

39. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host the RNA of Claim 36; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

40. A method for reducing expression of a target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA which comprises:

(a) introducing into a host the RNA of Claim 37; and

(b) selecting hosts which have reduced expression of the target mRNA or any substantially similar endogenous mRNA.

41. A method for identifying or screening an essential plant gene which comprises:

(a) transforming a plant cell with a recombinant construct comprising a constitutive promoter wherein said construct is capable of reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency;

(b) quantifying all transformed plant cells from step (a);

(c) quantifying all transformed plant cells from a control which does not reduce expression of an essential plant gene; and

(d) comparing the quantification of transformed plant cells selected from step (b) with the quantification of transformed plants cells selected from step (c) wherein the quantification of transformed plants cells selected from step (c) should substantially exceed the quantification of transformed plant cells selected from step (b).

42. A method for identifying or screening an essential plant gene which comprises:

(a) transforming a plant cell with the recombinant construct of any of Claims 1-5 which further comprises a constitutive promoter which is capable of reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency;

(b) quantifying all transformed plant cells from step (a);

(c) quantifying all transformed plant cells from a control which does not reduce expression of an essential plant gene; and

(d) comparing the quantification of transformed plant cells selected from step (b) with the quantification of transformed plants cells selected from step (c) wherein the quantification of transformed plants cells selected from step (c) should substantially exceed the quantification of transformed plant cells selected from step (b).

43. A method for identifying or screening an essential plant gene which comprises:

(a) transforming a plant cell with the recombinant construct of any of Claim 6 which further comprises a constitutive promoter which is capable of

reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency;

(b) quantifying all transformed plant cells from step (a);

(c) quantifying all transformed plant cells from a control which does not reduce expression of an essential plant gene; and

(d) comparing the quantification of transformed plant cells selected from step (b) with the quantification of transformed plants cells selected from step (c) wherein the quantification of transformed plants cells selected from step (c) should substantially exceed the quantification of transformed plant cells selected from step (b).

44. A method for identifying or screening an essential plant gene which comprises:

(a) transforming a plant cell with the recombinant construct of any of Claim 7 which further comprises a constitutive promoter which is capable of reducing expression of an essential plant gene with a high degree of frequency;

(b) quantifying all transformed plant cells from step (a);

(c) quantifying all transformed plant cells from a control which does not reduce expression of an essential plant gene; and

(d) comparing the quantification of transformed plant cells selected from step (b) with the quantification of transformed plants cells selected from step (c) wherein the quantification of transformed plants cells selected from step (c) should substantially exceed the quantification of transformed plant cells selected from step (b).

45. The recombinant construct of Claims 1-5 wherein the DNA sequences encoding the two complementary RNA sequences are comprised within any of the sequences set forth in SEQ ID NOs: 12, 13, or 34.

FIGURE 1

CRC Lines Exhibit Less Chimerism Than Antisense or "Classical" Co-suppression

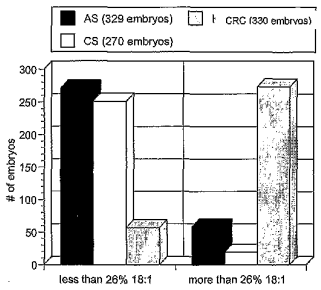
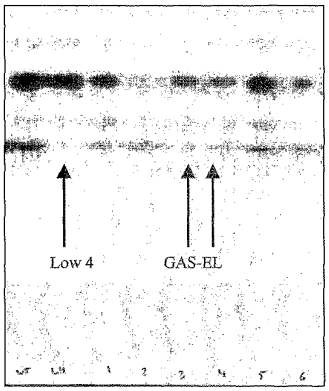


FIGURE 2



SEQUENCE LISTING

<110> E.I. du Pont de Nemours and Company

<120> RECOMBINANT CONSTRUCTS AND THEIR USE IN REDUCING GENE EXPRESSION

<130> BB1449 PCT

<140>
<141>

<160> 17

<170> Microsoft Office 97

<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ELVISLIVES PCR primer

<400> 1
gaattcgcgg ccgcatggga ggtagaggtc 30

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1

<400> 2
ggaaaaccat gcaacccatt ggtacttgct 30

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1

<400> 3
agcaagtacc aatgggttgc atggttttcc 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1

<400> 4
agcaagtacc aatggatact tgttcctgta 30

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1

<400> 5
tacaggaaca agtatccatt ggtacttgct 30

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: pKS102 linker

<400> 6
gaattcgcgg ccgcatggga ggtagaggtc 30

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of Cer3

<400> 7
ggcgcgccaa gcttggatcc gtcgacggcg cgcc 34

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of Cer3

<400> 8
gaattcgcgg ccgcggcacg agatttgagg 30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of Cer3

<400> 9
ttgcccaatg tttatgcata tgtagaactg 30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of Cer3

<400> 10
cagttctaca tatgcataaa cattgggcaa 30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ELVISLIVES complementary region of pKS106 and pKS124

<400> 11
gaattcgcgg ccgcggcacg agatttgagg 30

<210> 12
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ELVISLIVES complementary region of pKS106 and pKS124

<400> 12
cggccggagc tggtcatctc gctcatcgtc gagtcggcgg ccgccgactc gacgatgagc 60
gagatgacca gctccggccg 80

<210> 13
<211> 154
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ELVISLIVES complementary region of pKS133

<400> 13
cggccggagc tggtcatctc gctcatcgtc gagtcggcgg ccggagctgg tcatctcgct 60
catcgtcgag tcggcggccg ccgactcgac gatgagcgag atgaccagct ccggccgccg 120
actcgacgat gagcgagatg accagctccg gccg 154

<210> 14
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ELVISLIVES PCR primer

<400> 14
gaattccggc cggagctggt catctcgctc atcgtcgagt cggcggccgc cgactcgacg 60
atgagcgaga tgaccagctc cggccggaat tc 92

<210> 15
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ELVISLIVES PCR primer

<400> 15
gaattccggc cggag 15

<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1

<400> 16
gaattcgcgg ccgctgagtg attgctcacg agt 33

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1

<400> 17
gaattcgcgg ccgcttaatc tctgtccata gtt 33

<210> 18
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1, 5'-end

<400> 18
gaattcgcgg ccgcccaatc tattgggttc tc 32

<210> 19
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1, 3'-end of 25 nucleotide fragment

<400> 19
gaattcgcgg ccgcaacctt ggagaaccca at 32

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1, 3'-end 75 nucleotide fragment

<400> 20
gaattcgcgg ccgcggcatg gtgaccacac tc 32

<210> 21
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1, 3'-end of 150 nucleotide fragment

<400> 21
gaattcgcgg ccgctgagaa ataagggact aa 32

<210> 22
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1, 3'-end 300 nucleotide fragment

<400> 22
gaattcgcgg ccgcgagtgt gacgagaaga ga 32

<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1, 3'-end 600 nucleotide fragment

<400> 23
gaattcgcgg ccgcttctga tgaatcgtaa tg 32

<210> 24
<211> 1717
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ELVISLIVES complementary region of pBS68

<400> 24
cggccggagc tggtcatctc gctcatcgtc gagtcggcgg ccgctgagtg attgctcacg 60
agtgtggtca ccatgccttc agcaagtacc aatgggttga tgatgttgtg ggtttgaccc 120
ttcactcaac actttagtc ccttatttct catggaaaat aagccatcgc cgccatcact 180
ccaacacagg ttcccttgac cgtgatgaag tgtttgtccc aaaaccaaaa tccaaagttg 240
catggttttc caagtactta aacaaccctc taggaagggc tgtttctctt ctcgtcacac 300
tcacaatagg gtggcctatg tatttagcct tcaatgtctc tggtagaccc tatgatagtt 360
ttgcaagcca ctaccaccct tatgctccca tatattctaa ccgtgagagg cttctgatct 420
atgtctctga tgttgctttg ttttctgtga cttactctct ctaccgtgtt gcaaccctga 480
aagggttggt ttggctgcta tgtgtttatg gggtgccttt gctcattgtg aacggttttc 540
ttgtgactat cacatatttg cagcacacac actttgcctt gcctcattac gattcatcag 600
aatgggactg gctgaaggga gctttggcaa ctatggacag agattaagcg gccgcatgcc 660
tccagaaaag aaagaaattt tcaagtcctt ggagggatgg gcctcggagt gggtcctacc 720
gctgctgaag cccgtggagc aatgctggca gccacaaaac ttcctccctg acccctccct 780
tccgcatgaa gagttcagcc atcaggtgaa ggagcttcgc gaacgcacta aagagttacc 840
tgatgagtac tttgtggtgc tggtgggtga tatggtcacc gaggacgcgc ttcccactta 900
ccagaccatg atcaacaacc ttgatggagt gaaagatgac agcggcacga gcccgagccc 960
gtgggccgtg tggacccggg cctggaccgc cgaggaaaac agacacgggg atctgctcag 1020
aacttatttg tatctctctg ggagggttga catggctaag gtcgaaaaga ccgtacatta 1080
cctcatttca gctggcatgg accctgggac agacaacaac ccatatttgg ggtttgtgta 1140
cacgtcattc caagagcgag caacatttgt ggcgcacggg aacacggctc ggctcgcgaa 1200
ggagggcggg gatccagtgc tggcgcgcgc gcctatgcgg gaccatcgca gcggacgaga 1260
agcggcacga gaacgcgtac tcaagaatcg tggagaagct tctggaagtg gaccccaccg 1320
gggcaatggt ggccataggg aacatgatgg agaagaagat cacgatgccg gcgcacctta 1380
tgtacgatgg ggatgacccc aggctattcg agcactactc cgctgtggcg cagcgcatag 1440
gcgtgtacac cgccaacgac tacgcagaca tcttggattt ctcgttgacg gtgaagattg 1500
gagaagcttg aaggattgat gcctgagggg aagcgggccc caggatttcc gtgtgtgggt 1560
tgcccccgag gattaggagg ttccaagaac gcgctgatga gcgagcgcgt aagatgaaga 1620
agcatcatgc cgttaagttc agttggattt tcaataaaga attgcttttg tgagcggccg 1680
ccgactcgac gatgagcgag atgaccagct ccggccg 1717

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Lea promoter 5'-end

<400> 25
attaacctca attcttctaa g 21

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Lea promoter 3'end

<400> 26
ttcaaagatc aattatttcc 20

<210> 27
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of phaseolin terminator 5'-end

<400> 27
catggccacg tgcatgaagt at 22

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of phaseolin terminator 3'-end

<400> 28
atcctgaag tgtctcattt ta 22

<210> 29
<211> 963
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: ELVISLIVES complementary region of pKS149

<400> 29
cggccggagc tggtcatctc gctcatcgtc gagtcggcgg ccgctgagct gatttaaatc 60
accactgtca aaaccaccat caccgacgct caagccaagg tcgccaccga tcatggtcgt 120
gcctacgtca ccttcctcgc cggaaacggt gactatgtga aaggtgtcgt tggcttggca 180
aaaggtctga gaaaagtgaa gagcatgtac cctctggtgg ttgcagtgct acccgatgtt 240
ccccaagatc accgcaacat tctcacctcc caaggttgca ttgttagaga gattgagccc 300
gtgtaccccc cagagaatca aacccagttt gccatggcat attacgtcat caactattcc 360
aagctacgta tttgggagtt tgtggagtac agcaagatga tatacctaga cggtgatatc 420
caagtttttg acaacattga ccacttggga tcgatcctga gctgatttaa accaccgttg 480
ttgccaatgt caccaccgag caattaccca aggctcgtgg aggaagtggg cgtgccttcg 540
tgacctttct tgctgggaac ggtgattacg taaagggtgt cgtgggtttg gccaaaggac 600
tgagaaaggc caaaagcatg tacccttggg tggttgctgt gttaccagat gttcctgaag 660
aacatcgtga gattctcaaa tcccaaggtt gcattgtcag ggagattgaa cctgtgtacc 720
ctcctgagaa ccagacccag ttcgtcatgg cctattatgt catcaattac tccaagctac 780
gtatttggga gttcgtggag tacaagaaga cgatatacct agacggtgac atccaagtat 840
ttggaaacat agaccacttg tttgatctgt gagctgattt aagcggccgc cgactcgacg 900
atgagcgaga tgaccagctc cggccgccga ctcgacgatg agcgagatga ccagctccgg 960
ccg 963

<210> 30
<211> 987
<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 30
atggctccta atatcaccac tgtcaaaacc accatcaccg acgctcaagc caaggtcgcc 60
accgatcatg gtcgtgccta cgtcaccttc ctcgccggaa acggtgacta tgtgaaaggt 120
gtcgttggct tggcaaaagg tctgagaaaa gtgaagagca tgtaccctct ggtggttgca 180
gtgctacccg atgttcccca agatcaccgc aacattctca cctcccaagg ttgcattgtt 240
agagagattg agcccgtgta ccccccagag aatcaaaccc agtttgccat ggcatattac 300
gtcatcaact attccaagct acgtatttgg gagtttgtgg agtacagcaa gatgatatac 360
ctagacggtg atatccaagt ttttgacaac attgaccact tgtttgactt gcctgataac 420
tacttctatg cggtgatgga ctgtttctgt gagccaactt ggggccacac taaacaatat 480
cagatcggtt actgccagca gtgcccccat aaggttcagt ggcccactca ctttgggccc 540
aaacctcctc tctatttcaa tgctggcatg tttgtgtatg agcccaattt ggctacttac 600
cgtgacctcc ttcaaacagt ccaagtcacc cagcccactt cctttgctga acaggatttt 660
ttgaacatgt acttcaagga caaatatagg ccaattccta atgtctacaa tcttgtgctg 720
gccatgctgt ggcgtcaccc tgagaacgtt gagcttgaca aagttaaagt ggttcactac 780
tgtgctgctg ggtctaagcc ttggaggtac actgggaagg aggagaatat ggagagagaa 840
gatatcaaga tgttagtgaa aaagtggtgg gatatatatg aggatgagac tttggactac 900
aacaatccac tcaatgtgga taagttcact gcggcactta tggaggttgg tgaagtcaag 960
ttcgtccgtg ccccatctgc tgcttaa 987

<210> 31
<211> 328
<212> PRT
<213> Glycine max

<400> 31
Met Ala Pro Asn Ile Thr Thr Val Lys Thr Thr Ile Thr Asp Ala Gln
1 5 10 15

Ala Lys Val Ala Thr Asp His Gly Arg Ala Tyr Val Thr Phe Leu Ala
20 25 30

```
Gly Asn Gly Asp Tyr Val Lys Gly Val Val Gly Leu Ala Lys Gly Leu
         35                  40                  45

Arg Lys Val Lys Ser Met Tyr Pro Leu Val Val Ala Val Leu Pro Asp
     50                  55                  60

Val Pro Gln Asp His Arg Asn Ile Leu Thr Ser Gln Gly Cys Ile Val
 65                  70                  75                  80

Arg Glu Ile Glu Pro Val Tyr Pro Pro Glu Asn Gln Thr Gln Phe Ala
                 85                  90                  95

Met Ala Tyr Tyr Val Ile Asn Tyr Ser Lys Leu Arg Ile Trp Glu Phe
            100                 105                 110

Val Glu Tyr Ser Lys Met Ile Tyr Leu Asp Gly Asp Ile Gln Val Phe
        115                 120                 125

Asp Asn Ile Asp His Leu Phe Asp Leu Pro Asp Asn Tyr Phe Tyr Ala
    130                 135                 140

Val Met Asp Cys Phe Cys Glu Pro Thr Trp Gly His Thr Lys Gln Tyr
145                 150                 155                 160

Gln Ile Gly Tyr Cys Gln Gln Cys Pro His Lys Val Gln Trp Pro Thr
                165                 170                 175

His Phe Gly Pro Lys Pro Pro Leu Tyr Phe Asn Ala Gly Met Phe Val
            180                 185                 190

Tyr Glu Pro Asn Leu Ala Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Gln Thr Val Gln
        195                 200                 205

Val Thr Gln Pro Thr Ser Phe Ala Glu Gln Asp Phe Leu Asn Met Tyr
    210                 215                 220

Phe Lys Asp Lys Tyr Arg Pro Ile Pro Asn Val Tyr Asn Leu Val Leu
225                 230                 235                 240

Ala Met Leu Trp Arg His Pro Glu Asn Val Glu Leu Asp Lys Val Lys
                245                 250                 255

Val Val His Tyr Cys Ala Ala Gly Ser Lys Pro Trp Arg Tyr Thr Gly
            260                 265                 270

Lys Glu Glu Asn Met Glu Arg Glu Asp Ile Lys Met Leu Val Lys Lys
        275                 280                 285

Trp Trp Asp Ile Tyr Glu Asp Glu Thr Leu Asp Tyr Asn Asn Pro Leu
    290                 295                 300

Asn Val Asp Lys Phe Thr Ala Ala Leu Met Glu Val Gly Glu Val Lys
305                 310                 315                 320

Phe Val Arg Ala Pro Ser Ala Ala
                325
```

<210> 32
<211> 1350
<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 32
gcacgagaaa caaccaacct cttcagtgat ctttgattag tactaagcta aaccatttct 60
tattccctca aaatcaaaac ctttttcttt ctagctattt ccctttttcaa atcatgccac 120
ctaacatcac caccgttgtt gccaatgtca ccaccgagca attacccaag gctcgtggag 180
gaagtgggcg tgccttcgtg accttttcttg ctgggaacgg tgattacgta aagggtgtcg 240
tgggtttggc caaaggactg agaaaggcca aaagcatgta ccctttggtg gttgctgtgt 300
taccagatgt tcctgaagaa catcgtgaga ttctcaaatc ccaaggttgc attgtcaggg 360
agattgaacc tgtgtaccct cctgagaacc agacccagtt cgccatggcc tattatgtca 420
tcaattactc caagctacgt atttgggagt tcgtggagta caagaagacg atatacctag 480
acggtgacat ccaagtattt ggaaacatag accacttgtt tgatctgcct gataattatt 540
tctatgcggt gatggattgt ttctgcgaga agacttggag ccacacccct cagttccaga 600
ttgggtactg ccaacagtgc cctgataagg ttcaatggcc ctctcacttt ggttccaaac 660
ctcctctata tttcaatgct ggcatgtttg tttatgagcc taatctcgac acctaccgtg 720
atcttctcca aactgtccaa ctcaccaagc ccacttcttt tgctgagcag gactttctca 780
acatgtactt caaggacaag tacaagccaa taccgaacat gtacaacctt gtgctggcca 840
tgttgtggcg tcaccctgaa aatgttgaac ttgataaagt tcaagtggtt cattactgtg 900
ctgctgggtc taagccttgg aggttcactg ggaaggaaga gaacatggat agggaagata 960
tcaagatgct tgtgaagaag tggtgggaca tatatgaaga tgagacactg gactacaata 1020
acaactctgt caacgtggaa cgtttcacat cggcactatt ggatgctggg ggctttcagt 1080
ttgtgccagc accttctgct gcctaatatg cttattattt acagctacaa attaatgtta 1140
attaacgaca aagtatatgt attgttattt gctttttttc gttttgggt cttatatatg 1200
aaggaacaac gtctatggtt ttaatttgga tgaccttctt gtatacaaag ccacatgtga 1260
tctcatacag ctttgatta ttattaagaa attagaggac cttttattat gagtccttta 1320
cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1350

<210> 33
<211> 358
<212> PRT
<213> Glycine max

<400> 33
Ser Leu Ile Ser Thr Lys Leu Asn His Phe Leu Phe Pro Gln Asn Gln
1 5 10 15

Asn Leu Phe Leu Ser Ser Tyr Phe Pro Phe Gln Ile Met Pro Pro Asn
20 25 30

Ile Thr Thr Val Val Ala Asn Val Thr Thr Glu Gln Leu Pro Lys Ala
35 40 45

Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ala Phe Val Thr Phe Leu Ala Gly Asn Gly
50 55 60

Asp Tyr Val Lys Gly Val Val Gly Leu Ala Lys Gly Leu Arg Lys Ala
65 70 75 80

Lys Ser Met Tyr Pro Leu Val Val Ala Val Leu Pro Asp Val Pro Glu
85 90 95

Glu His Arg Glu Ile Leu Lys Ser Gln Gly Cys Ile Val Arg Glu Ile
100 105 110

Glu Pro Val Tyr Pro Pro Glu Asn Gln Thr Gln Phe Ala Met Ala Tyr
115 120 125

```
Tyr Val Ile Asn Tyr Ser Lys Leu Arg Ile Trp Glu Phe Val Glu Tyr
    130                 135                 140

Lys Lys Thr Ile Tyr Leu Asp Gly Asp Ile Gln Val Phe Gly Asn Ile
145                 150                 155                 160

Asp His Leu Phe Asp Leu Pro Asp Asn Tyr Phe Tyr Ala Val Met Asp
                165                 170                 175

Cys Phe Cys Glu Lys Thr Trp Ser His Thr Pro Gln Phe Gln Ile Gly
            180                 185                 190

Tyr Cys Gln Gln Cys Pro Asp Lys Val Gln Trp Pro Ser His Phe Gly
        195                 200                 205

Ser Lys Pro Pro Leu Tyr Phe Asn Ala Gly Met Phe Val Tyr Glu Pro
    210                 215                 220

Asn Leu Asp Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Gln Thr Val Gln Leu Thr Lys
225                 230                 235                 240

Pro Thr Ser Phe Ala Glu Gln Asp Phe Leu Asn Met Tyr Phe Lys Asp
                245                 250                 255

Lys Tyr Lys Pro Ile Pro Asn Met Tyr Asn Leu Val Leu Ala Met Leu
            260                 265                 270

Trp Arg His Pro Glu Asn Val Glu Leu Asp Lys Val Gln Val Val His
        275                 280                 285

Tyr Cys Ala Ala Gly Ser Lys Pro Trp Arg Phe Thr Gly Lys Glu Glu
    290                 295                 300

Asn Met Asp Arg Glu Asp Ile Lys Met Leu Val Lys Lys Trp Trp Asp
305                 310                 315                 320

Ile Tyr Glu Asp Glu Thr Leu Asp Tyr Asn Asn Asn Ser Val Asn Val
                325                 330                 335

Glu Arg Phe Thr Ser Ala Leu Leu Asp Ala Gly Gly Phe Gln Phe Val
            340                 345                 350

Pro Ala Pro Ser Ala Ala
        355
```

<210> 34
<211> 515
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SHH3 complementary region of PHP17939

<400> 34
gttaacagct ttatttgttc taggttgttc atgaaatatt tttttggttt tatctccgtt 60
gtaagaaaat catgtgcttt gtgtcgccac tcactattgc agctttttca tgcattggtc 120
agattgacgg ttgattgtat ttttgttttt tatggttttg tgttatgact taagtcttca 180

tctctttatc tcttcatcag gtttgacggt tacttaatat ggtgcatgca tgggtacatc 240
actagaaacc atggaaggta ccaagatatc aacgcggaaa agatcgtaca aatggcatgt 300
taaataaccg tcaaacctga tgaagagata aagagatgaa gacttaagtc ataacacaaa 360
accataaaaa acaaaaatac aatcaacgt caatctgacc aatgcatgaa aaagctgcaa 420
tagtgagtgg cgacacaaag cacatgattt tcttacaacg gagataaaac caaaaaaata 480
tttcatgaac aacctagaac aaataaagcg ttaac 515

<210> 35
<211> 1968
<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 35
atgccacaca acacaatggc ggccaccgct tccagaacca cccgattctc ttcttcctct 60
tcacacccca ccttccccaa acgcattact agatccaccc tccctctctc tcatcaaacc 120
ctcaccaaac ccaaccacgc tctcaaaatc aaatgttcca tctccaaacc ccccacggcg 180
gcgcccttca ccaaggaagc gccgaccacg gagcccttcg tgtcacggtt cgcctccggc 240
gaacctcgca agggcgcgga catccttgtg gaggcgctgg agaggcaggg cgtgacgacg 300
gtgttcgcgt acccccggcgg tgcgtcgatg gagatccacc aggcgctcac gcgctccgcc 360
gccatccgca acgtgctccc gcgccacgag cagggcggcg tcttcgccgc cgaaggctac 420
gcgcgttcct ccggcctccc cggcgtctgc attgccacct ccggcccccgg cgccaccaac 480
ctcgtgagcg gcctcgccga cgctttaatg gacagcgtcc cagtcgtcgc catcaccggc 540
caggtcgccc gccggatgat cggcaccgac gccttccaag aaaccccgat cgtggaggtg 600
agcagatcca tcacgaagca caactacctc atcctcgacg tcgacgacat cccccgcgtc 660
gtcgccgagg ctttcttcgt cgccacctcc ggccgccccg gtccggtcct catcgacatt 720
cccaaagacg ttcagcagca actcgccgtg cctaattggg acgagcccgt taacctcccc 780
ggttacctcg ccaggctgcc caggcccccc gccgaggccc aattggaaca cattgtcaga 840
ctcatcatgg aggcccaaaa gcccgttctc tacgtcggcg gtggcagttt gaattccagt 900
gctgaattga ggcgctttgt tgaactcact ggtattcccg ttgctagcac tttaatgggt 960
cttggaactt ttcctattgg tgatgaatat tcccttcaga tgctgggtat gcatggtact 1020
gtttatgcta actatgctgt tgacaatagt gatttgttgc ttgcotttgg ggtaaggttt 1080
gatgaccgtg ttactgggaa gcttgaggct tttgctagta gggctaagat tgttcacatt 1140
gatattgatt ctgccgagat tgggaagaac aagcaggcgc acgtgtcggt ttgcgcggat 1200
ttgaagttgg ccttgaaggg aattaatatg attttggagg agaaaggagt ggagggtaag 1260
tttgatcttg gaggttggag agaagagatt aatgtgcaga aacacaagtt tccattgggt 1320
tacaagacat tccaggacgc gatttctccg cagcatgcta tcgaggttct tgatgagttg 1380
actaatggag atgctattgt tagtactggg gttgggcagc atcaaatgtg ggctgcgcag 1440
ttttacaagt acaagagacc gaggcagtgg ttgacctcag ggggtcttgg agccatgggt 1500
tttgattgc ctgcggctat tggtgctgct gttgctaacc ctgggggctgt tgtggttgac 1560
attgatgggg atggtagttt catcatgaat gttcaggagt tggccactat aagagtggag 1620
aatctccag ttaagatatt gttgttgaac aatcagcatt tgggtatggt ggttcagttg 1680
gaggataggt tctacaagtc caatagagct cacacctatc ttggagatcc gtctagcgag 1740
agcgagatat tcccaaacat gctcaagttt gctgatgctt gtgggatacc ggcagcgcga 1800
gtgacgaaga aggaagagct tagagcggca attcagagaa tgttggacac ccctggcccc 1860
taccttcttg atgtcattgt gccccatcag gagcatgtgt tgccgatgat tcccagtaat 1920
ggatccttca aggatgtgat aactgagggt gatggtagaa cgaggtac 1968

<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for amplification of soybean Fad2-1, 3'-end 50 nucleotide fragment

<400> 36
gaattcgcgg ccgcatcacc cacacaccag tg 32

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/000904 A3

(51) International Patent Classification[7]: C12N 15/82, A01H 5/00

(21) International Application Number: PCT/US01/19962

(22) International Filing Date: 22 June 2001 (22.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/213,961 23 June 2000 (23.06.2000) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY** [US/US]; 1007 Market Street, Wilmington, DE 19898 (US). **PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.** [US/US]; 800 Capital Square, 400 Locust Street, Des Moines, IA 50309 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GLASSMAN, Kimberly, F.** [US/US]; 1202 NW Campus Drive, Ankeny, IA 50021 (US). **GORDON-KAMM, William, J.** [US/US]; 3916 67th Street, Urbandale, IA 50322 (US). **KINNEY, Anthony, J.** [GB/US]; 609 Lore Avenue, Wilmington, DE 19809 (US). **LOWE, Keith** [US/US]; 6407 Harbor Oaks Drive, Johnston, IA 50121 (US). **STECCA, Kevin, L.** [US/US]; 808 N. Gwynn Court, Bear, DE 19701 (US). **NICHOLS, Scott, E.** [US/US]; 6799 Ceres Circle, Johnston, IA 50131 (US).

(74) Agent: **CHRISTENBURY, Lynne, M.**; E.I. du Pont de Nemours and Company, Legal Patent Records Center, 4417 Lancaster Pike, Wilmington, DE 19805 (US).

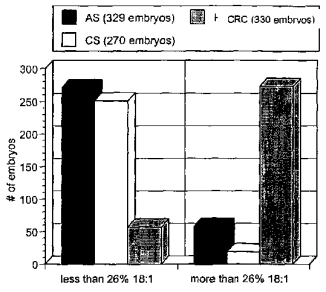
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: RECOMBINANT CONSTRUCTS AND THEIR USE IN REDUCING GENE EXPRESSION

CRC Lines Exhibit Less Chimerism Than Antisense or "Classical" Co-suppression



(57) Abstract: Recombinant constructs useful for reducing the expression of endogenous mRNA and any substantially similar endogenous mRNA are disclosed. In particular, a recombinant construct comprising, inter alia, a suitable nucleic acid sequence and its reverse complement can be used to alter the expression of any homologous, endogenous RNA (i.e., the target RNA) which is in proximity to this suitable nucleic acid sequence.

WO 02/000904 A3

WO 02/000904 A3

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
23 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/19962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 A01H5/00

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)
IPC 7 C12N A01H

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CAB Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MONTGOMERY M K ET AL: "Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression" TRENDS IN GENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 14, no. 7, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 255-258, XP004124680 ISSN: 0168-9525 the whole document ---	1-40, 42-45
A	WO 99 61631 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;NOVARTIS AG (CH); HEIFETZ PETER BERN) 2 December 1999 (1999-12-02) the whole document ---	1-40, 42-45
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 June 2002	11 09. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Oderwald, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/19962

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E,L	WO 02 16565 A (DU PONT ;BOOTH JOHN R (US); HITZ WILLIAM D (US); CAHOON REBECCA E) 28 February 2002 (2002-02-28) L: priority examples 9,10 ---	1-40, 42-45
E,L	EP 1 174 510 A (DU PONT) 23 January 2002 (2002-01-23) L: priority examples 9,10 -----	1-40, 42-45

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/19962

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.:

1-40, 42-45

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/19962

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-40,42-45

A recombinant construct which produces an RNA having a.) homology to at least one target RNA and b.) two complementary RNA regions which are unrelated to any endogenous RNA in the host or which are encoded in the genome of the host provided that the sequence does not encode the target sequence. A method for reducing expression of a target mRNA, an RNA, a method for identifying or screening an essential plant gene comprising said construct.

2. Claim : 41

A method for identifying or screening an essential plant gene.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/19962

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9961631	A	02-12-1999	AU	4368399 A	13-12-1999
			BR	9910729 A	13-02-2001
			CA	2328058 A1	02-12-1999
			CN	1307641 T	08-08-2001
			WO	9961631 A1	02-12-1999
			EP	1080208 A1	07-03-2001
			HU	0102103 A2	28-09-2001
			JP	2002516112 T	04-06-2002
			PL	344312 A1	22-10-2001
			TR	200003481 T2	20-04-2001
WO 0216565	A	28-02-2002	AU	8662701 A	04-03-2002
			WO	0216565 A2	28-02-2002
EP 1174510	A	23-01-2002	EP	1174510 A2	23-01-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	1/02	Ｃ１２Ｑ	1/68	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	1/68	Ｃ１２Ｎ	5/00	Ａ	

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

(74)代理人 100060782
弁理士 小田島 平吉
(72)発明者 グラスマン，キンバリー・エフ
アメリカ合衆国アイオワ州５００２１アンクニー・ノースウエストキヤンパスドライブ１２０２
(72)発明者 ゴードン－カム，ウイリアム・ジエイ
アメリカ合衆国アイオワ州５０３２２アーバンデイル・シツクステイセブンスストリート３９１６
(72)発明者 キニー，アンソニー・ジエイ
アメリカ合衆国デラウエア州１９８０９ウイルミントン・ロアアベニユー６０９
(72)発明者 ロエ，キース
アメリカ合衆国アイオワ州５０１２１ジヨンストン・ハーバーオークスドライブ６４０７
(72)発明者 ステツカ，ケビン・エル
アメリカ合衆国デラウエア州１９７０１ベア・ノースグウインコート８０８
(72)発明者 ニコルス，スコツト・イー
アメリカ合衆国アイオワ州５０１３１ジヨンストン・セレスサークル６７９９

Ｆターム(参考) 4B024 AA08 AA11 AA20 CA12 DA01 FA02
4B063 QA18 QQ04 QR35 QR78 QR80 QS38
4B065 AA88 AB01 BA02 CA46 CA53